

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARMARA BÖLGESİNDEN TOPLANAN RUMİNANTLARDAKİ *PASTEURELLA*
MULTOCİDA ENFEKSİYONLARININ REAL TIME PZR İLE TEŞHİSİ VE MULTİLOCUS
SEQUENCE TYPİNG YÖNTEMİ İLE FİLOGENETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : Aslı GÖNÜLKIRMAZ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : .../07/2024

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Emine YALÇIN

Temmuz 2024
GİRESUN

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARMARA BÖLGESİNDEN TOPLANAN RUMİNANTLARDAKİ *PASTEURELLA*
MULTOCIDA ENFEKSİYONLARININ REAL TİME PZR İLE TEŞHİSİ VE MULTİLOCUS
SEQUENCE TYPİNG YÖNTEMİ İLE FİLOGENETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Aslı GÖNÜLKIRMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji

Bu tez 03/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.
Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Emine YALÇIN
Üye

Prof. Dr.
Kürşad YAPAR
Üye

Doç. Dr.
Dilek ÇAVUŞOĞLU
Üye

Dr. Öğretim Üyesi
Fatih KUTLUER
Üye

Prof. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Aslı GÖNÜLKIRMAZ

03/07/2024

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde elde ettiğim tüm kazanımlarda engin bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra manevi desteğini de eksik etmeyen, çalışmamda daima çözümçül yaklaşımlarıyla verimli olmamı sağlayan Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Emine YALÇIN'a,

Ege'de bir köy ilkokulunun sıralarında, güzel ahlakla birlikte bilimin de önemini kavratan, fedakar ilkokul öğretmenim babam Musa GÖNÜLKIRMAZ, manevi desteklerini esirgemeyen annem Mediha GÖNÜLKIRMAZ ve çalışma sürecimde kendisine ayıracağım vakitten fedakarlık ederek bana destek olan sabırla çalışmamın bitmesini bekleyen oğlum Doruk'a,

Çalışmamın kritik bir döneminde, emeğimi en az benim kadar önemseyerek tamamlamama destek olan kıymetli arkadaşım, meslektaşım Cihangir KAYA'ya,

Doktora tezimin yürütücü kuruluşu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde çalışmama katkısı bulunan tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: TAGEM/HSGY AD/T1/23/A5/P1/2714

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. <i>P. multocida</i> 'nın genel özellikleri	3
2.1.1 Tarihçe ve sınıflandırma	3
2.1.2. Morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikler	4
2.2. <i>P. multocida</i> enfeksiyonlarının epidemiyolojisi	5
2.3. <i>P. multocida</i> enfeksiyonlarının patogenezi.	6
2.4. Virülens faktörleri	9
2.4.1. Kapsül	9
2.4.2. Lipopolisakkrit (LPS)	10
2.4.3. Toksin (PMT).....	11
2.4.4. Adezinler ve fimbriya	11
2.5. <i>P. multocida</i> enfeksiyonlarında klinik bulgular	13
2.5.1. Sığırlarda pnömoni	13
2.5.2. Hemorajik septisemi	14
2.5.3. Koyun ve keçilerde pnömoni	14
2.5.4. Diğer hayvanlar.....	15
2.6. <i>P. multocida</i> 'nın identifikasyonu	15

2.6.1. Konvansiyonel yöntemler	15
2.6.2. Moleküler yöntemler.....	17
2.7. <i>P. multocida</i> enfeksiyonlarında kontrol.....	18
 BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Çalışma alanı ve materyali	20
3.2. Referans suşlar	20
3.3. Besiyerleri	20
3.4. Çözelti ve ayırıcılar	21
3.5. DNA ekstraksiyonu	21
3.6. Real Time PZR analizi	21
3.7. MLST Analizi	22
3.8. Diğer gereçler	22
3.9. İzolasyon	23
3.10. İdentifikasyon	23
3.10.1. Mac-Conkey agarda üreme	24
3.10.2. Hemoliz testi	24
3.10.3. Gram Boyama.....	24
3.10.4. Oksidaz testi	25
3.10.5. Triple Sugar Iron (TSI) agar testi	25
3.10.6. Üreaz testi.....	25
3.10.7. İndol testi	25
3.10.8. Katalaz testi	26
3.11. Vitec II Cihazı ile İdentifikasyon	26
3.12. DNA izolasyonu.....	26
3.13. Real Time PZR.....	27
3.14. Minimum tespit limitinin belirlenmesi	28
3.15 MLST analizi.....	29
3.15.1 MLST analizi öncesi DNA amplifikasyonu	29
3.15.2. Gradient PZR.....	30
3.15.3. MLST analizinde kullanılacak PZR ürününün görüntülenmesi	31

3.15.4. MLST analizi için hazırlanan PZR ürünün sekans verilerinin okunması, değerlendirilmesi ve allel numaralarının belirlenmesi	32
--	----

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
------------------------------------	----

4.1. İzolasyon ve identifikasyon bulguları	33
--	----

4.2. Real Time PZR bulguları	35
------------------------------------	----

4.3. Multiloqus Sequence Typing bulguları	37
---	----

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
----------------------------------	----

KAYNAKLAR.....	53
----------------	----

ÖZGEÇMİŞ	66
----------------	----

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

APPS	:	Serum akut faz proteinleri
BAL	:	Bronkoalveolar lavaj
BRD	:	Sığır solunum yolu hastalıkları
ECP	:	Enzootik buzağı pnömonisi
FC	:	Kuşlarda kanatlı kolerası
LOD	:	Limit of Detection
MLST	:	Multilocus Sequence Typing
PVKE	:	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü
SSHK	:	Sığır solunum yolu hastalığı kompleksi
TTW	:	Trakeal yıkantı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Limit of Detection (LOD) görseli	29
Şekil 3.2. Gradyent PZR programı	31
Şekil 4.1. Kanlı agarda <i>P. multocida</i> mukoid karakterde koloni morfolojisi .	33
Şekil 4.2. <i>P. multocida</i> gram boyama sonrası Gam negatif kokobasillerin mikroskop görüntüsü	34
Şekil 4.3. <i>P. multocida</i> Triple sugar iron (TSI) biyokimyasal test sonuçları...	34
Şekil 4.4. İndol negatif test sonucu	34
Şekil 4.5. <i>P. multocida</i> örneğine ait VITEK 2 Compact biyokimyasal test rapor örneği	35
Şekil 4.6. Real -Time PZR analiz sonucu amplifikasyon eğrileri ve Ct değerleri	37
Şekil 4.7. Sekans öncesi elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	39
Şekil 4.8. MLST analizi için yapılan sekans analizi örneği	39

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	Real-Time PZR ile Teşhis primer ve prob özellikleri	22
Tablo 3.2.	MLST primer özellikleri	22
Tablo 3.3.	Real time PZR Programı	28
Tablo 3.4.	MLST ön basamağı amplifikasyon programı	30
Tablo 4.1.	Pozitif tespit edilen örneklerin bilgileri	36
Tablo 4.2.	Sekans edilen örneklerin bilgileri	38
Tablo 4.3.	Sekans tipi belirlenemeyen örneklerin tablosu	40

**MARMARA BÖLGESİNDEN TOPLANAN RUMİNANTLARDAKİ
PASTEURELLA MULTOCIDA ENFEKSİYONLARININ REAL TIME PZR
İLE TEŞHİSİ VE MULTİLOCUS SEQUENCE TYPİNG YÖNTEMİ İLE
FİLOGENETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada Marmara Bölgesi il ve ilçe teşkilatlarından Pendik Veteriner Kontrol Entitüsü'ne bakteriyolojik teşhis amacıyla gelen, 166 adet sığır ve koyuna ait pömonili akciğer dokularında *P. multocida* etkeninin varlığı klasik kültürel (konvansiyonel) yöntem ve Real time PZR yöntemiyle eş zamanlı olarak çalışılmıştır. Çalışılan dokulardan kültür yöntemiyle 5 (%3,01) tanesi pozitif olarak identifiye edilirken, 42 (%25.3) tanesi Real time PZR ile pozitif olarak tespit edilmiştir. İki yöntem sonuçları değerlendirildiğinde pozitiflik oranları arasındaki farkın kaydadeğer olduğu görülmüştür. Multilocus Sequence Typing metoduyla yapılan saha izolatlarının kendi içlerindeki ve Robert type 1 *P. multocida* (Pendik Veteriner Kontrol Entitüsünde üretimi yapılmış olan) aşı suşuyla aralarındaki genetik farklılıkların değerlendirilebilmesi amacıyla seçilen 15 pozitif saha izolatu ve aşı suşu birlikte sekanslanmıştır. Sonuç olarak *P. multocida*'nın teşhisinde konvansiyonel yöntemlerin birçok değişken faktöre bağlı olarak etken varlığını belirlemede yeterli olamadığı gözlemlendiğinden Real time PZR yöntemiyle desteklenmesinin, *P. multocida* varlığının tespitinde ve enfeksiyonlarıyla mücadelede daha verimli olacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Multilocus Sequence Typing, *Pasteurella multocida*, Real time PZR

INVESTIGATION OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* INFECTIONS IN RUMINANTS COLLECTED FROM MARMARA REGION BY REAL TIME PCR AND DETERMINATION OF PHYLOGENY WITH MULTILOCUS SEQUENCE TYPING

SUMMARY

In this study, the presence of *P. multocida* agent in the pneumonia lung tissues of 166 cattle and sheep, which came to Pendik Veterinary Control Institute from the provincial and district organizations of the Marmara Region for bacteriological diagnosis, was studied simultaneously with the classical cultural (conventional) method and the Real-time PCR method. While 5 (3.01%) of the studied tissues were identified as positive by culture method, 42 (25.3%) were identified as positive by Real time PCR. When the results of the two methods were evaluated, it was seen that the difference between the positivity rates was significant. In order to evaluate the genetic differences between the field isolates made by the Multilocus Sequence Typing method and the Robert type 1 *P. multocida* (produced at Pendik Veterinary Control Institute) vaccine strain, 15 selected positive field isolates and vaccine strains were sequenced together. As a result, since it was observed that conventional methods in the diagnosis of *P. multocida* were not sufficient to determine the presence of *P. multocida* due to many variable factors, it was thought that supporting it with the Real time PCR method would be more efficient in detecting the presence of *P. multocida* and in combating its infections.

Keywords: Multilocus Sequence Typing, *Pasteurella multocida*, Real time PCR

BÖLÜM 1.GİRİŞ

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde solunum sistemi hastalıklarının ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı tüm dünya çapında iyi bilinmektedir (Yates, 1982; Frank, 1986; Batmaz, 2006). Bugün hala çalışılmakta olan Sığır Solunum Yolu Hastalığı Kompleksi (SSHK)'nin geçmişi 1800'lü yıllara dayanırken aynı zamanda en geniş çapta araştırılmış hastalık gruplarından da biridir. *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* ve *Mycoplasma bovis* SSHK ile en çok yakın ilişkili olan bakterilerdir. Bu bakterilerin solunum sistemi hastalıklarındaki klinik vakalardan yapılan izolasyonları (Welsh ve ark., 2004; Janzen, 1997), aşılama denemeleri (O'Connor ve ark., 2001; Ribble ve ark., 1988) ve serolojik (Booker ve ark., 1999; Martin ve ark., 1989) çalışmaları içeren kriterlerle yakından ilişkilidir. Sonraki çalışmalarda *Bibersteinia trehalosi* de bu gruba dahil edilmiştir. Her yerde yaygın olarak bulunan bu fırsatçı patojen bakteriler üst solunum yolu bölgesinde kommensal olarak bulunmaktayken hayvanların maruz kaldığı rutubetli havalar, kötü gıda ve bakım koşulları, uzun süren yolculuklar gibi artan stres faktörleri ve viral enfeksiyonların gözlemlendiği durumlarda hızla çoğalarak akciğerlere göç edebilirler ve tek başına da hastalık oluşturabilirler (Confer, 2009; Hodgson ve ark., 2005).

P. multocida enzootik pnömoni ve shipping fever hastalıklarını kapsayan sığırların solunum yolu hastalığı kompleksine neden olan bakteriyel etkenlerin başında gelmektedir (Dabo ve ark., 2008). Etkeninin tam olarak tanımlanamadığı sığır solunum yolu hastalıkları (BRD) vakaları çoğunlukla 'shipping fever' olarak değerlendirilmektedir fakat bu hastalık kompleksinin gözlemlendiği durumların enzootik buzağı pnömonisini de kapsıyor olabileceği dikkate alınmalıdır. Dolayısıyla solunum yolu hastalıkları besi sığırlarında özellikle sütten kesilme sonrası, nakliye edilmeleri ve olumsuz ahır koşullarına maruz kaldıkları durumlarda 'shipping fever' olarak değerlendirilmelidir. Enzootik buzağı pnömonisi (ECP), 'shipping fever' ile çok

benzemektedir fakat aslında teşhisten ziyade daha çok bir tanımlamadır. Bu bağlamda buzağların sütten kesiminde ‘shipping fever’ öncesi ECP’nin şekillendiği vakaları düşünürsek ikisini ayırt etmek oldukça güçleşmektedir. Bununla birlikte sütten kesim öncesi besi danalarında pnömoniye nadiren ratlanmaktadır. Nitekim ECP çoğunlukla kapalı alanda yetiştirilen buzağlarda artan solunum sistemi hastalıklarını kapsamaktadır. Belirsiz doğa koşullarında yetiştirici, hastalığı zamanında fark edemediği için veteriner hekimler tarafından vaktinde tespit edilmesi oldukça zorlaşmaktadır. Tanı kriterleri ise bu doğrultuda genellikle iki hastalık için de benzerdir (Van Donkersgoed ve ark., 1993; Virtala ve ark., 1999; Svensson ve ark., 2006).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çiftlik hayvanları solunum yolu hastalıkları halen ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Sporadik ve enzootik karakterde seyreden Pastörelloz da ülkemiz hayvancılığında büyük önem arz etmektedir. Sığırlarda hastalık hemen her yaştaki hayvanlarda görülebiliyorken koyunlarda hastalığa daha çok sütten kesilmiş kuzular yakalanmaktadır (Aydın ve ark., 2006). Bu çalışmada Marmara Bölgesindeki 11 il ve ilçelerdeki taşra teşkilatından Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne (PVKE) gelen sığır ve koyun pnömonili akciğer örnekleri kültürel ve moleküler yöntemlerle (Real-time PZR) incelendi. Pozitif olduğu tespit edilen saha izolatlarıyla, PVKE’de önceki yıllarda üretilmiş olan type 1 (Robert) patojen aşısı suşunun DNA’ları birlikte dizilenerek sonrasında Multilocus Sequence Typing (MLST) yöntemi ile filogenetik çalışmalar tamamlandı. İzolatların moleküler düzeyde incelemeleri yapılarak teşhise katkıda bulunması, Marmara Bölgesi bazındaki gen çeşitliliğini ortaya koyarak ülkemizde yapılacak olan aşısı çalışmalarına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *P. multocida*'nın Genel Özellikleri

2.1.1.Tarihçe ve sınıflandırma

Pastörellozis'e neden olan mikroorganizmalar adlarını "Pasteur"den almaktadır (Aydın ve ark., 2006). *Pasteurella multocida* ilk defa 1881 yılında Pasteur tarafından epidemiyolojik öneme sahip bir vaka olan kümes hayvanları kolera salgınınında, attenüe ettiği bakteriyi tavuklarda immun yanıt sistemini uyaracak bir aşı olarak geliştirmeye çalıştığı ilk denemeler esnasında izole edilmiştir (Collins ve ark., 1981). Daha sonrasında *P. multocida* taksonomisi ve adlandırılması konusunda birçok değişikliğe uğramıştır (Fajfar Whetstone ve ark., 1995). Neredeyse yarım asır sonra 1929'da yaygın morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı *P. septica*, on yıl kadar sonra da *P. multocida* olarak gruplandırılmıştır (Weber ve ark., 1984; Fajfar-Whetstone ve ark., 1995). *Pasteurella multocida* türü, Gammaproteobacteria sınıfı, *Pasteurellaceae* ailesi içerisinde yer almaktadır. Bu ailenin taksonomisinde birçok değişiklikler olmuş, gelecekte de daha çok olabileceği üzere güncel olarak 30 adet cins düzeyinde bakteri grubu tanımlanmıştır. Veteriner hekimlikte önem taşıyanlar ise *Actinobacillus*, *Avibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Mannheimia*, *Pasteurella* ve *Bibersteinia* cinsleri ve bunlara ait birçok türdür. Taksonomik revizyon devam ederken *Pasteurella* cinsine ait *P. multocida*'nın da dahil olduğu 13 tür halihazırda bulunmaktadır (Quinn ve ark., 2011; William ve ark., 2022). *P. multocida*, *Pasteurella* sensu stricto üyeleri arasında birçok yabani ve evcil hayvanın bulunduğu geniş konakçı spektrumuna sahip en patojen üyedir (Mutters ve ark., 1985; Bisgaard, 1991). Şekeri (D-sorbitol ve dulcitol) fermente etme özelliğine göre *P. multocida* subs *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica* ve *P. multocida* subsp. *gallicida* olmak üzere üç alt türü tanımlanmıştır. 16S rRNA gen sekansı ve fenotip

karşılaştırılmasını baz alarak, kaplan ısırıklarıyla ilişkili izolatları tanımlayabilmek adına dördüncü bir alt tür olan *P. multocida* subsp. *tigris* Captini ve ark. (2002) tarafından tanımlanmıştır. Kapsül yapısı serolojik, lipopolisakkarit (LPS) kompozisyonunu ise serotip olarak sınıflandırmak için esas alınan yapılardır (Heddleston ve ark., 1972). *P. multocida* pasif hemaglutinasyonla geleneksel olarak beş kapsüller (A, B, D, E ve F) serogruba ayrılırken, jel difüzyon tekniği ile de 16 somatik serotipe (1-6) ayrılmıştır (Carter, 1955; Heddleston ve Rebers, 1972). Afrika ve Asya'da *P. multocida* serogrup B ve E sığırlarda ve su bufalolarında hemorajik sepsisemi ile ilişkilidir (Carter ve de Alwis, 1989; Shewen ve Conlon, 1993). Dünya çapında, *P. multocida* serogrup A izolatları sığır solunum yolu hastalıklarının majör nedenlerinden biridir (Frank, 1989).

2.1.2. Morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikler

Morfolojik olarak, *P. multocida*, gram negatif 0.2 x 1-2 µm boyutunda kokoid ya da küçük çomakçıklar ve nadiren de flamentar tarzda bulunan sporsuz, hareketsiz, kapsüllüdür. Dokudan hazırlanan sürme preparatlar Giemsa ile boyandığında bipolar boyanma özelliği gösterir. Aerob veya fakültatif anaerob olup optimum 37 °C' de pH 7.2-7.8 koşullarında 24-48 saatte üreyen bir bakteridir. Kültür aşamasında *P. multocida*'yı izolasyon için Nutrient agar, kanlı agar ve çikolata agar en fazla tercih edilen besiyerleri olsa da süregelmış deneyimler, %5 koyun ya da %10 sığır kanı katılmış kanlı agarda *Pasteurella* türlerinin izolasyon şansının makul oranda arttığı belirtilmiştir (Muhairwa ve ark., 2000; 2001; Dziva ve ark., 2000; 2001). Sıvı besi yerlerinde bulanıklık ve tortu oluştururken katı besi yerlerinde yuvarlak parlak düzgün 1 µm çapında grimsi koloniler meydana gelir, zamanla orta kısımlarında koyu bir saha oluşur ve kanlı agarda hemoliz görülmez. Bunun yanı sıra *P. multocida* konakçıya bağlı değişkenlik göstererek kanlı agarda mukoid ya da mukoid karakterde olmayan koloniler oluşturmaktadır. Mukoid koloniler sıklıkla sığır, domuz ve tavşan pnömonik akciğer lezyonlarından izole edilirken, mukoid olmayan koloniler daha çok kanatlı hayvanlardan izolasyonda gözlenmektedir. Öyle ki V faktör bağımlı izolatların bildirildiği de göz ardı edilmemelidir (Krause ve ark., 1987). Katı besi yerinde Mukoid (M) tipi (kronik olgularda), smooth (S) ve iridesans

(F) tipi (akut olgularda), Rough tipi (R) olmak üzere 4 koloni formu vardır ve dissosiasyona meyilli olup M>S>I>R şeklinde değişime uğrarlar. İçeriğindeki safra tuzları nedeniyle MacConkey agarda üreyemezler (Garrity ve ark., 2007; Aydın, 2006). Biyokimyasal özellikleri kapsamında, üreaz negatif iken ornitin dekarboksilaz ve indol pozitifdir. Laktoz ve maltozu fermente edemezken, glikoz, sukroz ve mannitolu kullanırlar. Ayrıca D-trehaloz, L-arabinoz ve D-ksiloz fermentasyonları da değişkendir. Oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitifdir. Çevre koşulları ve güneş ışığında uzun zaman canlılığını korurlar fakat deterjanlara duyarlıdırlar (Dziva ve ark., 2000; 2001; Quinn ve ark., 2011; Markey ve ark., 2013)

2.2. *P. multocida* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

P. multocida enfeksiyonları ekolojik ve ekonomik açıdan ciddi öneme sahiptir. Sığır solunum yolu hastalıklarında rol oynayan en önemli patojen bakterilerden birisidir (Srikumaran ve ark., 2007; McDaniel ve ark., 2018) Enfeksiyonlar konakçı, çevre ve çeşitli patojen etkenlerin etkileşimine bağlı kompleks bir etiyolojiye sahiptir. Solunum yolu hastalıkları ile ilişkili olarak yapılan araştırma çalışmaları sınırlı kalmıştır. İnsanlar, evcil ve yabani hayvanlar gibi geniş konakçı spektrumuna sahip ve yaygın olarak bulunuyor olması da bu daralmaya katkıda bulunmuştur. Bununla birlikte Dünya çapında prevelant kommensal ve fırsatçı patojen olarak değerlendirilmektedir (Harper ve ark., 2006; Wilson ve ark., 2013; Su ve ark., 2020). Bakterinin üst solunum yolu sisteminde kommensal olarak bulunuyor olması hastalık tanısını güçleştirmekteyken pnömoni ile ilişkilendirilebilmesi için Trakeal Yıkantı (TTW), Bronkoalveolar Lavaj (BAL) gibi postmortem kültür ya da invazif ölçümler gerekmede, fakat bu tür ölçümler sürü sığırları için pratik bir uygulama değildir. *P. multocida* primer ya da sekonder olarak patojen özelliğe sahiptir. İsmindeki “multocida” kelimesi “çok sayıda ölüm” anlamını taşımaktadır. Bu bakteri türü aynı zamanda birçok hayvan türünde hastalık oluşturma kabiliyetine sahip olup ruminantlardan ağırlıklı olarak sığırlarda hemorajik septisemi, enzootik pnömoni, pastörelloz (shipping fever) ve solunum yolu hastalığı kompleksine neden olmaktadır kuşlarda kanatlı kolerası (FC), domuz ve tavşanlarda atrofik rinite yol açmaktadır. Bununla birlikte birçok türde görülen ısırık yaralarına ilişkin insanları da

kapsayan lokal ya da sistemik enfeksiyonlara, alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Christensen ve ark., 2005; Wilson ve Ho, 2013). Özellikle çiftlik hayvanları ve su kuşları bakterinin yol açtığı geniş kapsamlı ölümcül salgınlara karşı duyarlıdırlar fakat domuz, koyun ve keçide sığırlara kıyasla salgınlara daha az rastlanmaktadır (Wobeser, 1992). Enfeksiyonlar büyük ve küçük ruminantlarda çoğunlukla sporadik olarak seyrederken kimi zaman enzootik boyuta ulaşarak, her yaş grubunda ve her iki cinsiyette de görülebilmektedir. Enfeksiyonları atlatan sürülerde sağlıklı hayvanların yarısının üst solunum yolu, farinks ve tonsillerinde patojen olarak etken yaşamaya devam ederken, yüksek mortaliteye sahiptir. Hiç enfeksiyon görülmeyen sürülerde bile hayvanların ortalama %3-5 arası orandaki bir kısmı taşıyıcı olabilmektedir. İnfeksiyöz etkeni taşıyan hayvanların burun akıntıları, salyaları ile saçılım olurken, bulaşma daha çok solunum sistemi, sindirim sistemi ve deri yoluyla meydana gelmektedir (Aydın ve ark., 2006). Diğer bir yandan yabani çift tırnaklı türlerde salgınlar devam etmekteyken nesli kritik olan Sayga Antilopları'nda da HS nedeniyle kitlesel ölümler meydana gelmiştir (Kock ve ark., 2018). Hayvanların yaşam alanındaki rutubet ve nem de enfeksiyonların artışına neden olmaktadır. Öyle ki *P. multocida* son zamanlarda Çin'in Güney bölgesinde binlerce yabani rodentin ölümüne yol açan salgına neden olmuştur (DuYong ve ark., 2020).

2.3. *P. multocida* Enfeksiyonlarının Patogenezi

P. multocida üst solunum yolu florasında kommensal olarak bulunurken sonradan patojenite kazanabilen çözümlenmesi güç bir bakteri olup *Pasteurella* türleri arasında en patojen olanıdır (Markey ve ark., 2013). Kommensal suşlar ile patojen suşlar arasında herhangi bir farkın olup olmadığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır fakat geniş kapsamda konakçı türüne sahip olması ve oluşturduğu enfeksiyonlardaki spesifik semptomların sayısı ve kapsamı bakımından dikkat çekicidir. Yeni doğmuş buzağılar (young dairy calves), süttten yeni kesilmiş ve nakliye edilen besi sığırları ya da buzağılarda görülen zorlu pnömoni vakalarının *P. multocida* kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi ve sığır pnömonisine yol açan *M. haemolytica* ve

Histophilus somni gibi diğer bakteriyel patojenlerden ayırt edilmesi çoğunlukla güçtür. Aslında bu patojenlerden birden fazlasının pnömonik akciğerlerde, solunum yolu virüsleri ve/veya *Mycoplasma spp.* ile ilişkili olarak sıklıkla izole ediliyor olmaları, *P. multocida*'nın sığır pnömonilerinde primer patojen olup olmadığı sorusunu kuvvetlendirmiştir (Gagea ve ark., 2006; Lopez ve ark., 2007). *P. multocida*'nın tek başına deneysel olarak sığır pnömonisini oluşturması ve doğal yollarla edinilmiş bu pnömoni vakalarında bakterinin diğer enfeksiyöz ajanlar olmadan izole edilmesi genç ya da strese maruz kalan sığırlarda primer patojen olabileceğini göstermiştir. Aniden ortaya çıkan bronkopnömonilere de daha çok *P. multocida*'nın yol açtığı bilinmektedir. Bakterinin primer etken olduğu ya da öncelikli olarak rol aldığı hastalıklar; kanatlı kolerası, sığırlarda hemorajik septisemi, domuz atrofik riniti ve tavşan pastörellozu olarak bildirilmiştir. *P. multocida*'nın hastalık gelişimine katkıda bulunduğu faktörler henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da büyük oranda katılım sağladığı; ruminantların alt solunum yolu enfeksiyonları, tip B'nin yol açtığı non-hemorajik septisemi ve farklı kapsül tüplerini içeren sporadik septisemi gibi enfeksiyonlar mevcuttur (Wilkie ve ark., 2012). Bakterinin akciğerlerde oluşturduğu patolojik lezyonlar araştırmacılar tarafından farklı yorumlanırken daha belirgin biçimde genellikle değişken miktarda intra-alveoler hemorajiler şekillenmektedir. Bununla birlikte alveoler lümen, nötrofil ve makrofaj içlerinde *P. multocida* hücreleri ve antijeni tespit edilmiştir. Sağlam ve dejenere bakterilerden her ikisi de fagositlerin fagozomları içerisinde ve hücre içi *P. multocida*'nın fagositler içinde hayatta kaldığı görüldü (Haritani ve ark., 1989; Dowling ve ark., 2004). Sığır pnömonisinin doğal vakalarında meydana gelen apselerin *P. multocida*'dan ziyade daha çok *M. haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes* veya *Mycoplasma bovis* enfeksiyonları ile ilişkili olduğunu immunohistokimyasal çalışmalar göstermiştir (Haritani ve ark., 1990; Adegboye ve ark., 1995; Gagea ve ark., 2006).

Aminoasit metabolizmasına bağlı olarak patojen ve konakçı arasında gerçekleşen cross talk hakkındaki bilgiler son yıllarda bir hayli ilerleme kaydetmiştir. He ve ark. (2019) tarafından farelerde yapılan deneysel çalışmada; *P. multocida* ile oluşturdukları enfeksiyonunun farelerin akciğerlerindeki L-serin, glisin ve treonin

metabolizmasında önemli değişikliklere yol açtığını belirtmişlerdir. Çalışmadaki ilginç gözlemlerden birisi de L-serinin *P. multocida*'nın akciğerlere kolonizasyonunu azaltmış olmasıdır. Enfeksiyon sırasında azalan L-serinin ekzojen olarak takviye edilmesi halindeyse farelerin yaşamda kalma oranlarının anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca yine düşük L-serin seviyesine bağlı olarak akciğerlerdeki makrofaj ve nötrofil aracılı inflamatuvar yanıtın da azaldığını belirtmişlerdir. *P. multocida*'nın patojenitesinin önemine dikkat çeken Finlandiya'daki bir başka çalışmada ise; Sığır solunum yolu hastalığına sahip buzağların solunum yolu hastalıkları klinik semptomları ile serum akut faz proteinleri (APPS) arasındaki ilişki araştırılmıştır. *M. haemolytica*, *M. movis* ve Bovine respiratuar sinsityal virüs (BRSV) gibi bilinen patojenlere rastlanmazken *P. multocida*'nın tek başına var olması, klinik bulgular ve APPs konsantrasyonundaki yükseliş çalışmanın anlamlı sonuçlarından birisi olmuştur (Nikunen ve ark., 2007). Bakterilerde meydana gelen biyofilm üretimi son yıllarda *P. multocida* açısından da önem kazanmıştır. Biyofilm üretim mekanizması ile ilgili yapılan çalışmalar halen sayıca fazla olmamakla beraber bakterinin biyofilm üretiminin tespit edildiği sığırların solunum yolu hastalıklarını kapsayan çalışmalar mevcuttur. Dolayısıyla bakterinin konakçada oluşturduğu önemli virülens faktörleri arasında olduğu düşünülmektedir (Rajagopal ve ark., 2013; Petruzzi ve ark., 2020). *P. multocida* için patojenik kapsamda yapılan çalışmaları değerlendirdiğimizde transpozon mutajenezi, in vivo ekspresyon ve tüm genom sekansı yoluyla araştırılan gen veya gen kümelerinin *P. multocida*'nın virülensinin aydınlatılabilmesi bakımından önemli yöntemler olduğu düşünülmektedir (Fuller ve ark., 2000; Hunt ve ark., 2001; Harper ve ark., 2003). Varsayılan virülens faktörlerini kodlayan, evrensel olarak altı *P. multocida* genomunun hepsinde bulunan bu genler; dış membran proteinlerini kodlayan genler (ompA, ompH ve ompW), demir edinim genleri (exbB-exbD-tonB, hgbA, fur), tiamin metabolizması genleri (tbpA, tiP ve tiQ) ve adezyon/Flp pilus birleştirme genleri (tadZABCDEFG) olarak bildirilmiştir (Boyce ve ark., 2001; Boyce ve ark., 2002; Boyce ve ark., 2004; Boyce ve ark., 2012). Biyofilm oluşumu, kolonizasyon ve patogeneizde anahtar rolünü üstlendiği bilinen Tad gen lokusunun homologları, diğer birçok Pasturellalar ve gram-negatif bakterilerin genlerinde de mevcuttur (Tomich ve ark., 2007). Bakterinin potansiyel virülens genlerine dair, *H.*

influenzae'nın filogenetiğine ilişkin yapılmış listedeki virülens genlerinden de çıkarım yapılabilmektedir (Wong ve ark., 2012). Virülens özellikleriyle bağlantılı olan özgün genler daha önce sekanslanan her *P. multocida* genomunun neredeyse tamamında tespit edilmiştir. Bu duruma sığır akciğerinden izole edilen, geniş konjugatif bütünleşirici element (ICE) içeren, *P. multocida* 3695 suşu örnek oluşturmaktadır. Bununla beraber aynı konakçı niş özelliğine sahip *M. haemolytica* PHL213 ve *Histophilus somni* 2336 suşlarında da benzer ICE'ne rastlanmıştır (Michael ve ark., 2012a; Michael ve ark., 2012b).

2.4. Virülens Faktörleri

P. multocida enfeksiyonlarının patojenitesini etkileyen en önemli unsurlar sahip olduğu virülens faktörleridir. Kapsül, lipopolisakkarit (LPS), toksin (PMT), fimbria ve adezinler, demir bağlama proteinleri, sialik asit metabolizma proteinleri, hyaluronidaz ve dış membran proteinleri gibi birçok virülens geni mevcuttur. Bunlardan majör olanları kapsül, LPS, PMT, OMPs tip IV fimbriya (pili) ve adezinler olarak sıralayabiliriz (Harper ve ark., 2006; Dabo ve ark., 2008).

2.4.1. Kapsül

Primer virülens faktörü olan polisakkarit yapıda ve bünyesinde yüksek oranda su barındıran kapsül, bakterinin su kaybını ve fagositoza uğramasını önlerken diğer yandan da serum komplementlerinin bakterisidal aktivitelerinde rol alır. Kapsül biyosentezinin azaldığı durumlarda virülens kaybına uğrayan bakteri türü seruma direncini yitirmektedir (Watt ve ark., 2003; Chung ve ark., 2001). Genellikle kapsül sahibi olan bakteri türleri olmayan varyantlarına kıyasla daha yüksek virülense sahiptirler. *P. multocida* kapsüller tip antijenlerine göre A, B, D, E ve F' den oluşan beş serogruba ayrılmıştır (Boyce ve ark., 2000; Harper ve ark., 2006; Chung ve ark., 2001). *P. multocida* kapsül tip A'nın sığır solunum yolu hastalıklarının primer etkenlerinden biri olduğu yaygın olarak bilinirken, domuz pnömonisi ve kanatlı kolerasında da izole edilmektedir. Kapsüller Tip B ve E suşları ise daha çok sığırların

ve su bufalolarının hemorajik sepsis vakalarıyla ilişkilidir. Kapsül Tip F bağışıklığı düşen kanatlılarda ve buzağılarda fibrinli peritonit vakalarında görülürken, Kapsül Tip D 'ye domuzların atrofik rinitlerinde rastlanmaktadır (Dabo ve ark., 2008). Kapsül tip A, D ve F tipleri yakın ilişkili olup sırasıyla hyaluronik asit, heparin ve kondroitinden oluşmaktadırlar. Bu polimer yapıların aynı zamanda ökaryotların hücre dışı matrislerinde de bulunuyor olmalarının bakterinin yüzeyindeki bileşenleri maskeleyerek konakçının antikor yanıtının yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Bahsedilen veriler birlikte değerlendirildiğinde kapsülün bakterinin konakçı hücreye adezyonunu arttırmasındaki ve bakteriyi konakçının bağışıklığından uzak tutmasındaki kritik rolünü desteklemektedir (Harper ve ark., 2003).

2.4.2. Lipopolisakkrit (LPS)

Birçok gram negatif bakteride olduğu gibi *P. multocida*'nın dış membranının dış yüzeyi ağırlıklı olarak LPS moleküllerinden oluşmaktadır ve lipid A bileşeni güçlü bir endotoksindir (Horadagoda ve ark., 2001). *P. multocida* suşlarının LPS molekülü, iç çekirdek yapılarında farklılık gösteren iki LPS glikoforma (A ve B) sahipken (Harper ve ark., 2004; 2007a), dış antijen yapısının suşlar arasında değişkenlik göstermesine bağlı olarak 16 farklı LPS serovar grubuna ayrılmasına yol açmıştır. LPS, serum komplementlerine karşı direnç sağlayabilen önemli bir virülens faktörüdür (Muhairwa ve ark., 2002; Harper ve ark., 2007a; 2007b). Yakın zamanda hemorajik sepsis olgusundan LPS'nin lipid A yapısına sahip olduğu *P. multocida*'nın izole edildiği bildirilmiştir (Tawab ve ark., 2020). Ancak bu yapının türler arasında korunup korunmadığı bilinmemektedir. İlginç bir biçimde bazı LPS mutantları kanatlıların sistemik enfeksiyonlarında bir hayli zayıf virülense sahipken farelerde hala sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. *P. multocida*'nın hücre yüzeyindeki bu önemli bileşenine karşı farklı hayvan türlerinde farklı yanıtların geliştiği gözlenmiştir (Harper ve Boyce, 2017).

Saflaştırılmış *P. multocida* LPS'nin oldukça antijenik bir yapı kazanarak yaygın vasküler değişiklikler ve ölüm vakalarına yol açabildiği ancak zayıf bir immünojen

olduğu belirtilmiştir. Protein ve ribozomlarla oluşturduğu kompleks yapılarla hem humoral hem de hücrel immun yanıtı daha iyi uyararak koruyucu bağışıklığı sağlayabilirken, LPS ve protein tek başlarına ayrı ayrı uygulandıklarında koruma sağlayamadıkları bildirilmiştir (Heddleston ve Rebers, 1975; Tsuji ve Matsumoto, 1988; Ryu ve Kim, 2000). Konakçının yanıtının bakteriyi uzaklaştırmaya yetmediği enfeksiyonun ilerlediği durumda oluşan yüksek miktarda sistemik LPS birikimi, endotoksik şoka yol açabilmektedir ve aşırı üretilen inflamatuvar mediyatörleri doku hasarı, organ yetmezliği, septik şok ve ölümle sonuçlanabilmektedir (Harper ve ark., 2004). Ayrıca LPS kanatlı kolerası ve sığırların hemorajik septisemi hastalıklarının patogeneğinde önemli role sahip olduğu belirtilmiştir (Markey ve ark., 2013). Bakterinin konakçı hücreye adezyonu LPS içeriğindeki fosfokolin aracılığıyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Galdiero ve ark., 2000).

2.4.3. Toksin (PMT)

P. multocida'nın dermonekrotik toksini PMT, lizojenik bir bakteriyofaj içinde bulunan tox A geni tarafından kodlanır. *P. multocida* atrofik rinit (AR) izolatlarının genomuna entegre olabilen bu toksin, domuzların atrofik rinitine yol açan kapsül tip D ve A ya aittir (Pullinger ve ark., 2004; Seo ve ark., 2009). A-B toksin ailesine ait olan toksin üst solunum yolunda *P. multocida* hücreleri tarafından pasif olarak salınmaktadır. B alanı konak hücrelere bağlanmayı kolaylaştırırken, A alanı toksinin sitozole taşınmasını sağlayarak toksik etki göstermektedir (Wilson ve Ho, 2012). Fakat PMT'nin AR'dan başka önem taşıdığı *P. multocida* enfeksiyonlarına dair kesin bir bulgu henüz yoktur.

2.4.4. Adezinler ve fimbriya

Filamentous hemagglutininler adezyonda önemli bir role sahiptir. Etkenin enfeksiyon oluşturabilmesi için konakçı dokusuna yapışması temel bir önkoşuldur. *P. multocida*'nın memeli ve kanatlı konakçılarından bir dizi hücre tipine adezyonu gerçekleştirdiğine dair birçok çalışma mevcuttur (Wilkie ve ark., 2012). *P. multocida*'nın filamentöz hemagglütinini, hindilerde daha az oranda olmak üzere fare

suşlarında da virülense katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Fuller ve ark., 2000; Tatum ve ark., 2005). Smith ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada birçok *P.multocida* genomunun pfhB1 ve pfhB2 filamentöz hemaglutinin genlerini içeriyor olmasına rağmen HS vakalarından elde edilen izoaltlarda rastlanmadığı bildirilmiştir. Diğer bakteri türlerinde kodlanan bu hemaglutinin proteinlerinin PfhB1 ve PfhB2 konakçı hücrelerine bağlandığı ve antifagositik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Dodd ve ark., 2014; Melvin ve ark., 2015).

Pili (fimbriya) yapıları tutunmada önemli bir role sahiptir. Birçok gram negatif bakterilerde Tip 4 fimbriya uzun filamentöz yapılara sahiptir ve ayrıca tutunmada rol almaktadır (Hatfaludi ve ark., 2010). Birçok *P.multocida* genomu tip 4 pili üretimi ve bağlanma yapışma (Tad) pili üretimi için gerekli, tip 4 filament süper ailesine ait olan genleri kapsamaktadır. Hastalık oluşturmadaki rolleri henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da iki ayrı mutajenez çalışması Tad pilinin virülens açısından farelerdeki ve tavuklardaki önemini göstermiştir (Fuller ve ark., 2000; Harper ve ark., 2003). Tad sistemi hakkındaki bilgiler sınırlıdır fakat diğer patojenlerde bu sistem konakçı kolonizasyonu ve biofilm oluşumu açısından önemlidir (Tomich ve ark., 2007). Dış membran proteinleri (OMPS) gram-negatif bakterilerde hücre dışıyla etkileşimleri açısından önem taşırlar. OMP'ler hücre membran stabilitesi ve birtakım moleküllerin taşınmasında rol alırlar. Çözünmüş maddelerin rastgele difüzyonu ve bakteriye özgü bağlayıcı maddelerin taşınması bu porinler tarafından gerçekleştirilmektedir (Boyce ve ark., 2006). *P. multocida*'nın dış zar proteinlerinden birisi OmpA proteini immünojenik ve antijenik açıdan büyük önem taşımaktadır. Omp A korunmuş bir yapıya sahip, membran dış yüzeyiyle temas halinde önemli bir iyon kanalı olmakla birlikte in vivo koşullarda da ekspresyonu yapılabilen çok yönlü bir OMP'dir (Dabo ve ark., 1997). Bakterinin konak hücreye kolonizasyonunu arttırdığı bildirilen adezinler gibi OmpA' da bakterinin konakçı hücrenin dış matriks bileşenlerine bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Hücrenin yapısal bütünlüğüne katkı sağlayan Omp A serumun bakterisidal etkilerine karşı da direnebilen bir dış membran proteindir (Dabo ve ark., 2003; Harper ve ark., 2006; Nazierbieke ve ark., 2008; Sthitmatee ve ark., 2008). Bu ve bazı OMP'lere karşı gelişen yüksek antikör yanıtları virulent *P.multocida* ile mücadelelerindeki

dirençleriyle tutarlı bir korelasyon sergilemektedirler (Dabo ve ark., 1997; 2003; 2005). OmpH de korunmuş, homotimetrik kanal oluşturan ve koruyucu antijenik potansiyele sahip diğer önemli dış yüzey OMP porinidir (Chevalier ve ark., 1993). Öyle ki bugüne dek *P.multocida* yönünden araştırılan sığır izolatlarının tümünde istisnasız tespit edildiği bildirilmiştir (Lugtenberg ve ark., 1984; Chevalier ve ark., 1993; Ewers ve ark., 2006). Bu bağlamda OmpH proteini aşı adayı olmak gibi dikkat çekici bir potansiyele sahiptir (Luo ve ark., 1997; Vasfi-Marandi ve Mittal, 1997). Demir virülens genlerinin ekspresyonunu düzenleyen maddelerden biri olması sebebiyle, demir edinimi bakterinin patogenezi açısından önemlidir. Dolayısıyla, *P. multocida*'nın demir aracılığıyla düzenlenen dış membran proteinleri (IROMP'ler) de virülens faktörleri arasında değerlendirilmektedir (Garrido ve ark., 2008; Puchalski ve ark., 2010).

2.5. *P. multocida* Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular

2.5.1. Sığırlarda pnömoni

P. multocida ya da *M. haemolytica* enfeksiyonlarının sığır solunum yolu hastalıkları kompleksi olarak da bilinen 'shipping fever' hastalığının gelişimine katkıda bulundukları bilinmektedir. Sığırlarda özellikle de süten yeni kesilmiş buzağılarda transport, toplanma ve stresli bakım koşulları nedeniyle bronkopnömoni ya da fibrinli plöropnömoni olguları şekillenir. Genellikle transport sonrası bir iki hafta içerisinde ateşle birlikte iştahsızlık ve halsizlik başlar ve daha sonra burun akıntısı öksürük gibi respiratorik semptomlar tutarsız biçimde şekillenebilir. Enfeksiyonun daha ileri aşamalarında ateş düşebilir fakat solunum stresi belirtileri halen ortadadır. Etkene ilk ve şiddetli biçimde maruz kalan akciğerin özellikle apikal loblarının üs kısmındaki bölgeden normal olmayan akciğer sesleri alınabilir (Crosby ve ark., 2022; Harper ve ark., 2023).

2.5.2. Hemorajik sepsisemi

Hemorajik sepsisemi *P. multocida*'nın akut sistemik enfeksiyonu olup çoğunlukla Güney ve Güneydoğu Asya'da serotip B, Afrika'da ise serotip E kaynaklı görülür. Daha çok tropikal bölgelerde mevsimsel epidemiler halinde ortaya çıkan HS, yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreder. Hastalığın klinik semptomları yüksek ateş, depresyon, subkutanöz ödem, hipersalivasyon ve ishal ya da ani ölüm olarak gözlemlenir. *P. multocida* konakçının her tarafına yayılarak karşı konulması zor sistemik enfeksiyon ya da ölüme yol açabilmektedir. Perakut HS enfeksiyonları ilk 4-12 saat içerisinde hızlıca yayılarak önceden bir klinik belirti vermeden ani ölüme yol açabilmektedir. Enfeksiyon ateş, depresyon, iştahsızlık, kayıtsızlık, iştah kaybı ve burun akıntısı gibi semptomlarla seyredebildiği gibi geç dönem klinik belirtileri olarak; güç ve hızlı solunum, mukopurulent burun akıntısı, tükrük bezlerinde şişkinlik, düşük göğüs ve ön ayaklar gözlenir. Hastalığa yakalanan hayvan yere boylu boyunca uzanmış yatar vaziyetteyse, sepsisemi ve septik şok belirtileri gösteriyorsa ölümün şekillenmesi neredeyse kaçınılmazdır. HS' yi atlatan hayvanlar bakterinin saçılımına devam ederken bazıları da gelecek salgınlara kaynak olabilecek kronik taşıyıcı olurlar (De Alwis, 1992).

2.5.3. Koyun ve keçilerde pnömoni

Sığırlarda olduğu gibi koyunlarda ve keçilerde pnömoni transport sonrası ya da enzootik veya epizootik hayvan gruplarıyla birlikte aynı ortamda bulunmalarına bağlı olarak meydana gelmektedir. *M. haemolytica*, *B. trehalosi* ve *P. multocida* en sık görülen etkenlerdir. Buzağılarda olduğu gibi viral patojenlerle birlikte enfeksiyon, çevresel stres faktörleri, konakçı immünitesi yetersizliği bakterinin küçük ruminantlarda bronkopnömoniye yol açmasını arttırıcı faktörlerdir. Koyun pastörellozunda farklı olarak yavru atma meydana gelebilir. Kronik olgularda anemi ve kaşeksi sonucu ölüm şekillenebilir. Prognozu genellikle iyi değildir (Aydın, 2006).

2.5.4. Diğer hayvanlar

Genç domuzlarda *P. multocida* enfeksiyonlarında konkalar yıkımlanırken, sekonder olarak nazal enfeksiyonlara da yol açan atrofik rinit görülmektedir. Bunun yanında bakterinin domuzlarda yol açtığı pnömoniler ruminantlardaki vakalara benzerdir. Kanatlılarda sistemik enfeksiyon koleraya yol açarken tavşanlarda nezle şeklinde seyretmektedir (Crosby ve ark., 2022).

2.6. *P. multocida*'nın İdentifikasyonu

2.6.1. Konvansiyonel yöntemler

Bakterilerin konvansiyonel olarak izolasyonuna öncelikle etkenin genel ya da bakteriye özgü selektif besi yerlerinde üretilmesiyle başlanır ve daha sonra identifikasyonuna yönelik birtakım biyokimyasal testler uygulanır. Birçok bakteri için bahsi geçen kültür yöntemi halen en güvenilir yöntem olarak kabul edilmekte ve WOAHA tarafından altın standart olarak bildirilmektedir (Aydın, 2006; Dziva ve ark., 2000; 2001). Nitekim *P. multocida*'da için de kültürel yöntem altın standarttır. *Pasteuralla* türlerinin temel olarak laboratuvar ortamında üretilebilmesi için nutrient agar, kanlı agar ve çikolata agar gibi besiyerlerinin tercihi olumlu sonuçlar verse de %5 ya da %10 sığır yada koyun kanı eklenmiş kanlı agarların istikrarlı biçimde başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür (Muhairwa ve ark., 2000; Dziva ve ark., 2000; 2001). *P. multocida*'nın klinik örneklerden primer olarak izolasyonu konakçıdaki mevcut diğer istenmeyen bakterilerin de üremesiyle komplike bir hal alabildiği için bu durumu önleyecek selektif besiyerleri kullanılmaktadır. Bunun yanında Pasteurellalar için Klindamisin, Gentamisin, Neomisin, Amikasin, Vankomisin ve Kanamisin gibi antimikrobiyallerin birlikte ya da ayrı ayrı ilave edildiği selektif besiyerleriyle *P. multocida* için ördeklerde yapılan çalışma sonuçlarının tutarlı olmadığı gözlenmiş ve konakçı mikroflorasının besiyeri seçiciliğini etkilediği kanısına varılmıştır (Avril ve ark., 1990; Muhairwa ve ark., 2000; 2001; 2022).

İzolasyon aşamasında çeşitli *Pasteurella* türlerini ayırt etmek için Baldrias (1988) besiyerlerini karşılaştırarak yaptığı fare inokülasyon çalışmasında koyun kanlı agarının diğerlerine nazaran açık ara en verimli besiyeri olduğu gözlemlenmiştir. Son zamanlardaysa kanlı agara ek olarak Dextrose Starch agar, Trypticase Soy agar, Çikolata agar ve Casein Sucrose Yeast agar da primer izolasyon için tavsiye edilmiştir (Christensen ve Bisgaard, 2005; De Alwis, 1999; Garrity, 2007; Quinn ve ark., 2011). *P. multocida*'nın izolasyonu için kullanılacak numune seçimleri etkene spesifik hastalığa bağlı olmaktadır. Dolayısıyla üst solunum yolu enfeksiyonuyla seyrettiği durumlarda bronşial lavaj, nazo faringeal swap, eksudat ya da tonsillar doku genellikle en uygun izolat olarak tercih edilmektedir (Lariviere ve ark., 1993; DeLong ve Manning, 1994; De Jong, 1999; Jamaludin ve ark., 2005). Hemorajik sepsis ya da kanatlı kolerası gibi sepsis vakalarında ise kan ya da henüz yeni ölmüş hayvanların öncelikli akciğer olmak üzere diğer iç organları da tercih edilmektedir. Hastalığın erken evresinde etkenin kanda tespit edilmesi oldukça güç olduğu gibi antibiyotik tedavisi gören hasta hayvanlarda da baskılanmaya bağlı olarak etkene rastlanmayabilmektedir. Aerobik koşullarda 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben *P. multocida* kanlı agarda düzgün, yuvarlak, gri renkli, nonhemolitik mukoid veya nonmukoid koloniler oluşturmaktadır. MacConkey agarda üreme özelliğine sahip değildir. Mikroskopik muayenede gram negatif, kısa, oval, bipolar boyanabilen kokobasiller şeklinde görülmektedir. Eski kültürlerde değişken şekiller gösterebilmekte, kan içermeyen besiyerlerinde de daha küçük koloniler oluşturmaktadır. Bipolar boyanma metilen mavisi ile daha belirgindir. *P. multocida*'nın fenotipik identifikasyonu esnasında yapılan biyokimyasal testlerin konakçıya ve izolata göre değişkenlik gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Kültürde üreyen kolonilerin identifikasyonunda fenotipik identifikasyon temelinde daha hızlı ve güvenilir sonuçlar veren BD Phoenix, Vitek 2 ve MicroScan gibi otomatize cihazlar da kullanılmaktadır. Genellikle etkenin tanısı bu şekilde hastalık semptom ve konakçı ilişkisini baz alan minimal laboratuvar bulguları ile yapılmaktadır ancak bu uzlaşılı kimliklendirme gibi büyük bir riski de beraberinde taşımaktadır. Bu riski ortadan kaldırarak daha güvenli bir identifikasyon için başlangıçtaki fenotipik testlerin genotipi ile birlikte çalışılması gerektiği öngörülmektedir (Dziva ve ark., 2000; 2001).

2.6.2. Moleküler yöntemler

Konvansiyonel yöntemle identifikasyonda görülen sonuçların değişkenliği göz önünde bulundurularak teşhisinin moleküler yöntemlerle (PZR) desteklenmesi gerekliliği önemle vurgulanmaktadır. Tarihsel olarak suşları ayırt etmek için fenotipik yöntemler kullanılmıştır ve farklı serotiplerin farklı konakçı ve klinik semptomlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hatfaludi ve ark., 2010). Bununla birlikte, fenotipik yöntemlerin yararı, ayrımcı güç eksikliği ve popülasyon yapısını yansıtmaması nedeniyle sınırlı kalmıştır (Blackall ve ark., 1998). REA (Restriction endonuclease analysis), PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), RAPD-PZR ve ERIC-PZR gibi DNA temelli metodlar ayırım güçleri daha yüksek olması sebebiyle *P. multocida* etkenlerinin tiplendirilmesinde kullanılmıştır (Blackall ve Miflin, 2000). Enzim aktivitelerinin aminoasit sekansları ile ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla MLEE (Multi-lokus enzim elektrophoresis) metodu uygulanmıştır (Selander ve ark., 1986). Real Time-PZR da *P. multocida*'nın teşhisinde tercih edilen yöntemlerden birisidir. En az 5 log.'tan oluşan geniş dinamik bir aralıktaki nükleik asitleri ölçebilmesi, bir hedef sekansın beşten az kopyasını saptaması son derece hassas olması, küçük örnekleri analiz edebilmesi ve PZR sonrası manipülasyonlara gerek kalmadan sonuç verebilmesi gibi avantajlara sahiptir (Valasek ve Repa, 2005). MLST (Multi locus sequence typing) 1998 yılından bu yana bakteriyel izolatların tanımlanmasında kullanılan etkili ve yaygın bir yöntemdir. MLST bakterideki koruyucu gen bölgelerinin (lokuslar) nükleotid dizilerinin çeşitliliğini sekans eder. Çoğunlukla bakteriyel MLST şemalarında ortalama 400-500 baz çifti kullanılır. Her lokustaki her yeni diziye belirlendiği sıraya göre bir numara atanır (adk-1, adk-2... vb.) ve belirli bir şemayı oluşturan tüm lokusların numaraları bir allelik profil belirler (örneğin, 2-3-4-3-8-4-6) ve bir suşa karşılık gelir. Her profil veya alellerin benzersiz kombinasyonu da bir sekans tipini oluşturur (ST; örneğin, ST-11) (Jolly ve ark., 2014). MLST yöntemi DNA sekansı temelli olduğu için diğer birçok metottan daha uygulanabilir bulunmaktadır. Rutin laboratuvarlar arasındaki karşılaştırma testlerinde aktarılabilir olduğu için tercih edilmektedir (Enright ve Spratt, 1998). MLST yönteminin bakteriyel etkenlerin genotiplendirilmesinde altın standart olduğu iddia edilmektedir (Maiden ve ark., 1998). Bakteriler için çalışılan MLST metodu,

çeşitli referans genlerinin sekans analizi ile standartlaştırılmış bir sistem sağlar, suşların dünya çapında karşılaştırılmasına ve elde edilen izolatların akrabalık ilişkilerinin araştırılmasına olanak tanır (Spratt, 1999). MLST bir organizmanın global epidemiyolojisini araştırmak için kullanılabilir; özellikle de nişle ilişkili suşları (ağırlıklı olarak belirli bir konakçı veya organ sistemi ile ilişkili olan suşlar) tanımlamak için verimli bir yöntemdir (Hata ve ark., 2010; Sheppard ve ark., 2010). Bu yöntem ile elde edilen veriler, niş ilişkili suşlara yönelik hedeflenmiş hastalık kontrol önlemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaları açısından önem taşımaktadır.

2.7. *P. multocida* Enfeksiyonlarında Kontrol

Çiftlik hayvanlarının genel sağlık durumlarını stabil kılmak, *P. multocida* enfeksiyonlarını ve saçılımını önlemek için iyi hayvan yetiştiricilik uygulamaları kaçınılmazdır. Bu durumun sağlanabileceği yerlerde yüksek kalite aşılama programı yüksek seviye biyogüvenlik uygulamaları ile birlikte eşgüdümlü olarak gerçekleştirilmelidir. Birçok ölü *P. multocida* hücresi (bakterin) ve canlı attenüe aşılar hastalığa karşı çeşitli etkiler göstererek koruma sağlamaktadırlar fakat canlı attenüe aşılar çapraz koruma bağışıklığına yol açarak bakterinlere nazaran daha iyi koruma sağlamaktadırlar (Harper ve Boyce, 2017). Bu durumda yüzey antijenlerine karşı oluşan immünolojik yanıtın LPS'nin (OmpH ve PlpE) oluşturduğu yanıtın daha fazla olabileceğini düşündürmüştür. Yine son zamanlardaki aşı türünü karşılaştırmak amacıyla *E.coli* 'de yapılan bir çalışmada; konakçının bakterinin RNA'sını tanıyarak canlılığına karar vermesine göre immünolojik yanıt tercihini belirlediği gözlenmiştir (Ugolini ve ark., 2018). Sığırların *P.multocida*'yı kapsadığı solunum sistemi enfeksiyonlarında *M.haeomolytica* ve *H.somni* etkenleriyle kombine edilen bakterin aşılarının verimli ve uygulanabilir olduğu bildirilmiştir. Salgınlar esnasında hemorajik septisemiye karşı koruma otolog bakterinlerle, etken serogrup B ve E suşlarının adjuvanlı ölü hücreleri sağlanabilir fakat birçok benzer aşılar kısa dönem koruma sağlamaktadır. Hemorajik septisemi için Dagleish (2007) tarafından geliştirilen deneysel canlı attenüe aşı geliştirildiği fakat herhangi canlı bir aşının HS için rutinde ticari olarak kullanılıp kullanılamayacağı henüz netlik kazanmamıştır. Domuzların atrofik riniti için ölü toksijenik türleri içeren bakterinler, inaktif toksin

içeren toksoidler ve kombine aşıları uygulanabilir. Kanatlı kolerasında canlı aşılar ve bakterinler olmak üzere her iki grup aşının kullanıma uygun olduğu fakat verimliliğin değişken olduğu belirtilmiştir. Mukozal aşılama non-invaziv bir yöntemdir ve geleneksel sistemik aşılarla göre çeşitli avantajlara sahiptir. Enjeksiyondan ziyade ağızdan veya nazal olarak uygulanmasının daha basit olduğu düşünülmektedir. Mukozal yüzey, istilacı patojenlere karşı ana savunma mekanizmaları arasında ilk sırada yer almaktadır. Şu anda, ticari HS aşıları, canlı zayıflatılmış veya öldürülen bakterilerden oluşmaktadır (Holmgren ve Czerkinsky, 2005; Woodrow ve ark., 2012). *P.multocida*'nın yol açtığı enfeksiyonlarda tedavi; hayvanların türüne, enfekte olan hayvan sayısına ve yerleşim yoğunluğuna bağlı olmaktadır. Kanatlı kolerasında eradikasyon başarısı için popülasyon azalması ve tüm işletmenin dezenfekte edilmesi gereklidir. Sürü için antibiyotik tedavisi tercih edilecekse öncelikle etkenin antibiyotik duyarlılığı belirlenmelidir. Aksi halde tedaviyi takiben kronik enfeksiyonların ya da taşıyıcı hayvanların yaygınlaştığı görülmektedir. *P.multocida* ruminantların alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarına yol açtığında ilk klinik bulgularla birlikte hastalığın başında antibiyotik tedavisine başlanılmalıdır. Buna karşın sığırların hemorajik septisemisi hastalığının hızlı seyri nedeniyle antibiyotik tedavisiyle hayvanı korumakta geç kalınmaktadır.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Alanı ve Materyali

Bu çalışmada Marmara Bölgesindeki 11 ilçede bulunan taşra teşkilatından Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü (PVKE)'ne gelen pnömonili akciğer örnekleri çalışılmıştır. Laboratuvarında son bir yılda çalışılan numunelerin pozitif oranının %10'un altında olduğu belirlenmiş olup, Marmara bölgesindeki pastörelloz hastalığının sığır ve koyun türlerindeki tahmini prevalansı %50 alınarak %99 güven aralığında %10 hata payı ile gereken numune sayısı 166 adet olarak belirlenmiştir. Filogenetik analiz için dokudan elde edilen suşlara laboratuvarında direkt kültürden elde edilen suşlar da ilave edilerek toplam 16 adet izolata MLST analizi yapılmıştır. Araştırmanın yapılmasında, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 14.12.2018 tarih, 197 sayı ve 13/2018 karar nolu yazısı ile Etik Kurul kararına gerek olmadığı bildirilmiştir.

3.2. Referans Suşlar

Enstitü bünyesinde üretimi yapılmış, Type 1(Robert) aşısı suşu Real Time PZR ve Sekans için referans suş (pozitif kontrol) olarak kullanılmıştır.

3.3. Besiyerleri

Konvansiyonel yöntemle identifikasyon için; %5 koyun kanlı agar, MacConkey agar, Triple Sugar İron (TSI) agar ve SIM Medium agar kullanılmıştır. Suşların saklanması için %20 gliserinli BHI besiyeri içeren boncuklu tüpler kullanılmıştır. Besi yerleri Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nün Besi Yeri Üretim Ünitesinden temin edilerek çalışılmıştır.

3.4. Çözelti ve Ayıraçlar

Fizyolojik tuzlu su (FTS): 8.76 gr. NaCl, distile suyla çözdürülerek 1 litreye tamamlanmıştır (Lennette ve ark., 1985).

Kovaks ayırıcı: İzolatların ön identifikasyonu için indol reaksiyonunu belirlemek amacıyla, 75 ml amil alkol içinde 5 gr. P-dimetil amino benzaldehid çözdürülerek, üzerine 25 ml HCl (%37) ilave edilmiştir (Lennette ve ark., 1985).

Oksidaz test strips: Bakteri izolatlarında oksidaz reaksiyonunu belirlemek amacıyla Microbact™ Oxidase Strips (Liofilchem) kullanılmıştır.

Katalaz test ayırıcı: İzole edilen suşların katalaz reaksiyonunun belirlenmesinde %3'lük hidrojenperoksit (H₂O₂) kullanılmıştır.

İzolatları VITEK 2 Compact cihazında okunur kılabilmek için bakteriyel süspansiyonlar %0,45 saline solüsyonu kullanılarak hazırlanmıştır. MLST öncesi PZR ürünlerinin agaroz jeldeki kontrolü için %1,5'luk agaroz hazırlanmıştır. 50X TAE (Tris-Acetic Acid/EDTA), 0,5x olacak şekilde distile su ile sulandırılarak hem jel hazırlamada hem tank suyunda yürütme için kullanılmıştır. PZR numuneleri jele yüklenirken 6x loading dye kuyucuklara 2x olacak şekilde numune ile karıştırılarak yüklenmiştir. Bantları UV altında görmek için Etidyum bromid ve DNA merdiveni olarak Ladder 2000 bp kullanılmıştır.

3.5. DNA Ekstraksiyonu

PVKE'de üretimi olan *P. multocida* Type 1 (Robert) patojen aşı suşu poz referans suşu ve izolatların DNA ekstraksiyonu için Roche Firması'na ait High Pure PZR Template Preperation Kit kullanılmıştır. High Pure PZR Template Preperation Kiti binding buffer, proteenaz K, tissue-lysis buffer, inhibitor, removal buffer, wash buffer, elution buffer, mikrosantrifüj tüpü ve toplama tüplerini içermektedir.

3.6. Real Time PZR Analizi

Real time PZR metodunda Cy5 boyasıyla işaretli Taqman prob ve Mastermix (Roche Light Cycler 2x) kullanılmıştır (Tablo 3.1.). Floresan okuma FAM kanalında

gerçekleştirdi. Analizde Healtorce HF Save–1200 biyogüvenlik kabini ve HiMedia Insta q96 Real Time Cihazı kullanılmıştır (Tocqueville ve ark., 2017).

Tablo 3.1. Real-Time PZR ile Teşhis primer ve prob özellikleri

Primerler ve Problar	Sekans (5' → 3')	T _m (°C)	%GC	Amplifikasyon uzunluğu (bp)
PmRT-SodA-1/f	GGAAGCCTTCCAAGCAGAATTTG	68.6	47.8	146
PmRT-SodA-1/r	CCGCAATAGCTTTACCCATTACAG	66.1	45.8	--
ProbePmSodA	*Cy5a- CGGCAGCAACCCGTTTCGGTTCAG-BHQ2b	78.8	62.5	--

*Cy5: Cyanine 5, fluorescence reporter dye.

3.7. MLST Analizi

MLST ön basamağı sekans analizi için kullanılan PZR reaksiyonu için; Xpert Fast Mastermix (Grisp) ve *Pasteurella multocida*'nın korunmuş 7 gen bölgesine (house keeping) ait primerler Tablo 3.2.'deki gibi tasarlanmıştır (pub.mlst.davies).

Tablo 3.2. MLST primer özellikleri

Lokus	Sekans 5-3		bp
	Forward	Reverse	
adk	AAGGBACWCAAGCVCAAT	CACTTTTTKYGTMCCTGTC	531
aroA	TTTACCDGGYTCYAAAAG	TGCATCATCTTAAGGGTG	558
deoD	GTGCATTTGCYATGTTG	TGSYGTKGTTTGTTCGTG	576
g6pd	GATGCTGCCGATTATGG	CAAGACTTTTGCCACTTC	513
gdhA	CGCGTTAACCACATTACC	CCCTTCAGCCACTAATTG	651
mdh	TGTCCAAAAGCTTGTGTG	CCTAATTCAATATCYGCACG	552
pgi	GTGATTTCTGGTGAATGG	GGAAATACGCTGCAAAAC	609

3.8. Diğer Gereçler

- Vitek 2 Gn Id kartları
- Vitek cihazı
- Thermal Cycler(simpli amp)
- Vorteks Velp Scientifica

- Santrifüj Hettich 200R
- Hassas Terazî
- Elektroforez Tankı ve Power Supply Thermo Fisher
- Mikrodalga Fırın
- Nano Drop Test Thermo Scientific NanoDrop 2000..
- Biyogüvenlik Kabini Healtorce HF Save – 1200
- İnkübatör MMM Incucell
- Kuru Blok Isıtıcı Genius
- Kapılar elektroforez cihazı ABI 3130xl Genetik Analizör
- Otomatik pipetler (100-1000 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl),
- DNase / RNase'dan arındırılmış düz kapaklı PZR tüpleri,
- UV jel görüntüleme sistemi ,
- DNase / RNase'dan içermeyen steril filtreli pipet uçları ,

3.9. İzolasyon

Laboratuvara gelen materyallerden pnömonili akciğer dokusu numuneyi temsil edecek şekilde ve etkenin tespit edilebileceği lezyonlu bölgeler dikkate alınarak, önce organın yüzeyi Bek alevinde ısıtılmış, spatül ile dağlanmış, bu bölge steril bir bistüri ile ensize edilmiştir. Ensizyon hattından organın iç kısmına girilerek swap yardımı ile alınan örneklerin %5 koyun kanlı agar ekimleri yapılmış, aerobik koşullarda 37 °C' de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.10. İdentifikasyon

İnkübasyon sonrasında ön identifikasyonu için; %5 defibrine koyun kanı katılmış kanlı agar besiyerinde üreyen 1-2 mm çapında gri renkli düzgün, yuvarlak veya mukoid özellikte olan non-hemolitik kolonilerden (*Pasteurella spp.* şüpheli kolonilerden) hazırlanan preparatlar önce Gram boyama yöntemi ile boyanmıştır. Gram negatif ve kokobasil (oval) görünümlü, oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitif olduğu tespit edilen saf kültürlerden MacConkey agarda üremeyen, TSI agarda dipte asit (sarı renk) oluşturan ve SIM mediumda hareketsiz, indol testi pozitif ve/veya negatif olan bakteri izolatları *P. multocida* şüpheli olarak kabul

edilmiştir. Şüpheli izolatlar biyokimyasal test kitleri ve RT-PZR yöntemiyle identifiye edilene kadar %20 gliserinli BHI besiyeri içeren boncuklu bakteri saklama tüplerinde -70°C’de saklanmıştır (Önat ve ark., 2010; Quinn ve ark., 2011; Güler ve ark., 2013).

3.10.1. Mac-conkey agarda üreme

P. multocida yönünden şüpheli olarak değerlendirilen taze ve saf kültürlerden Mac Conkey agara pasaj yapılarak, 37 °C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda agarda bakteri kolonilerinin varlığı ve yokluğu incelenmiştir (Koneman ve ark., 1988).

3.10.2. Hemoliz testi

Koyun kanlı agara (defibrine %5 koyun kanı, 5 mm kalınlıkta) ekimi yapılan bakteriler, 24 – 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonrasında üreyen kolonilerin hemoliz oluşturma özellikleri incelenerek, hemoliz özelliği göstermeyen gram negatif basil ve kokobasillerin *P. multocida* yönünden identifikasyonuna gidilmiştir.

3.10.3. Gram boyama

Gram tekniğinden mikroorganizmaların klasifikasyonunda ve identifikasyonunda da yararlanılmaktadır. Gram boyama için, Kristal viyole, lugol, absolute alkol ve safranin boyaları kullanılmıştır. Bu işlem için taze kolonilerden öze ucu kadar alınarak bir damla distile suyla lam üstüne yayılmış, kurutulduktan sonra 45 derecelik açı ile 3 defa alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Daha sonra preperat üzerine kristal viyole solüsyonu konularak 1 dk bekletildikten sonra boya dökülerek hafif akan suda yıkanmıştır. Preperatın üstü lügol solüsyonuyla kaplanmış ve 1 dk bekletildikten sonra solüsyon dökülerek hafif akan suda yıkanmıştır. Absolute alkolde preperat dekolore edilmiş, sonrasında suyla yıkanmıştır. Son aşamada safranin (veya eosin,sulu fuchsin) ile 30 saniye boyanmış, suyla yıkanarak boya giderilmiştir. Mikroskopik inceleme yapmak üzere, bir damla sedir yağı preperat üzerine konularak 100’lük objektifte muayene yapılmıştır (Arda, 2015). *Pasteurella multocida* şüpheli koloniler gram negatif basiller ya da kokobasiller olarak

gözenmiştir. Daha sonra bu kolonilerden iğne uçlu öze ile Triple Sugar Iron agar besiyerine ekim yapılarak 24-48 saat inkübasyona bırakılmış, süreç sonunda laktoz, glikoz ve mannitolü katabolize edebilme kabiliyetleri, dip/yüzey kısmında sarı renk (asit), gaz ya da H₂S oluşumları değerlendirilmiştir (Koneman ve ark., 1988).

3.10.4. Oksidaz testi

Taze ve saf kültürden öze yardımıyla alınan bakteri kolonisi oksidaz diskine yayılarak sürülmüştür. 10-15 saniye içinde diskin pembe – mor bir renk alması “pozitif”, renk değişikliğinin olmaması “negatif” olarak değerlendirilmiştir.

3.10.5. Triple sugar iron (TSI) agar testi

P.multocida şüpheli olarak değerlendirilen taze ve saf kültürden iğne uçlu öze ile alınan tek bakteri kolonileri TSI agar besiyerinin dip kısmına ve aynı hat boyunca çıkarılarak besiyerinin yatık yüzeyine sürülmüş ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkubasyon sonunda besiyerinin yüzeyinde (laktoz ve sakkaroz) ve dip kısmında (glikoz) oluşan renk değişimi, gaz kabarcıkları ve siyahlaşma (H₂S) yönünden değerlendirilmiştir (Arda, 2015).

3.10.6. Üreaz testi

Kanlı agarda üreyen saf kültürden öze ile üreli buyyona ekim yapılmıştır. 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkubasyon sonunda besiyeri renginin kırmızıya dönmesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Arda, 2015).

3.10.7. İndol testi

P.multocida şüpheli bakteri kolonisinden iğne uçlu öze yardımıyla SIM mediuma ya da triptofan içeren 3.tüp üreli buyyona ekim yapılarak 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrasında sadece ekim hattında üreme hareket negatif, tüp çeperine doğru yayılarak meydana gelen üremeye hareket pozitif olarak değerlendirilmiştir. Daha sonrasında besiyerine ya da 3.tüp üreli buyyona birkaç damla kovaks ayırıcı damlatılarak üst yüzeyde pembe renkli halka oluşumu indol pozitif, renk değişiminin olmamasıysa indol negatif olarak değerlendirilmiştir (Koneman ve ark., 1988).

3.10.8. Katalaz testi

Katalaz aktivitesini belirlemek için lam üzerine bir damla %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılmıştır. Sonrasında taze ve saf bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak solüsyona aktarılmıştır. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif, gaz kabarcıklarının görülmemesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Lennette ve ark., 1985).

3.11. Vitek II Cihazı ile İdentifikasyon

Şüpheli kültürlerin kesin identifikasyonları için VITEK 2 Compact sistemine ait identifikasyon kartları (VITEK 2 GN ID) kullanılmıştır. Taze ve saf koloniler Vitek 2 Compact cihazında identifikasyonu gerçekleştirmek üzere, %0,45'lik NaCl₂ içeren 3 mL' lik tüp içerisinde süspanse edildikten sonra bakteri yoğunluğu DensiChekTM cihazında McFarland 0.5-0.63 standardına göre ayarlanarak VITEK 2 GN ID kart ile Vitek 2 Compact cihazına yerleştirilmiştir. İdentifikasyonu amaçlanan izolatın bilgileri cihazdaki VITEK 2 Software yazılım programı ile tanımlanmıştır. Vitek 2 Compact sistemi tarafından bakteriler biyokimyasal olarak *P. multocida* olarak doğrulanmıştır.

3.12. DNA İzolasyonu

Kültürde çalışılan tüm lezyonlu akciğer dokularının, makroskopik olarak dokudaki lezyonlu sağlıklı bölge arasındaki geçiş hatlarının etken tespiti açısından önemi göz önünde bulundurularak bir miktar alınmış, bistüri makas yardımı ile daha küçük parçalara ayrılmıştır. Sonrasında doku parçaları PBS (fosfat tamponlu tuz) ilave edilen seramik boncuklu tüplerde vortekslenmiştir. Hazırlanan homojenatlar ekstraksiyonu yapılmak üzere -20°C' de muhafaza edilmiştir. DNA ekstraksiyonu, Roche Firması'na ait High Pure PZR Template Preperation Kit kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda manuel olarak yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi her bir örnek için aşağıdaki miktar ve basamaklar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- 200 µL elution buffer hazırlanarak +70°C 'ye ayarlanmış kuru blok ısıtıcıya koyularak en son basamağa kadar bekletilmiştir.

- Sırayla 200 μ L homojenat, Binding Buffer, Tissue Lysise Buffer ve 40 μ L Proteinaz K 1,5 mL'lik nülease-free mikrosantrifüj tüplerine konulmuş ve vortekslenmiştir.
- 70 °C de 10 dakika kuru blok ısıtıcıda doku parçaları lize olana kadar inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonrasında 100 μ L isopropanol ilave edilerek karıştırılmıştır.
- DNA bağlama tamponu içeren tipe alınan karışım 8.000 g'de 1 dk süre ile santrifüj edilmiştir.
- Yeni tüpe aktarılan karışıma 500 μ L İnhibitor Removal Buffer eklenmiş ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 500 μ L wash buffer (yıkama solüsyonu) ilave edilerek ve 8000 g'de 1 dk süre ile santrifüj edilmiş ve toplama tüpü değiştirilerek bu basamak yinelenmiştir.
- Sıvı kısmı atıldıktan sonra bütün tüp ek olarak 10 sn'de tam hız santrifüj edilmiştir.
- DNA'yı elde etmek için, DNA bağlama kodonu 1,5 'luk mikrosantrifüj tüplerine koyulmuş, önceden +70 °C 'de ısıtılmış olan 200 μ L Elution Buffer eklenerek 8000 g'de 1 dk süre ile santrifüj edilmiştir.
- Son basamakta mikrosantrifüj tüpündeki filtreden aşağıya inerek tüpün alt kısmında toplanan sıvı, template DNA olarak kullanılmak üzere -20' de muhafaza edilmiştir.

3.13. Real Time PZR

Belirlenen toplam 166 adet pnömonili akciğer doku izolatları, rutin teşhisteki kültür çalışmaları tamamlandıktan sonra Real Time PZR çalışmaları yapılmıştır. Real Time PZR analiz koşulları için Tocqueville ve ark.'nın (2017) bildirdikleri yöntem baz alınmıştır (Tablo 3.3.). Firmanın protokolü doğrultusunda 100 mikromolarlık hazırlanan stoklardan, 20 μ L forward primer, 20 μ L reverse primer ve 20 μ L prob 80 μ L nükleaz içermeyen dH₂O ile her biri 100 μ L olan üç ayrı stok oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılmak üzere; forward primer (50 μ L), reverse primer (50 μ L), prob (15 μ L) ve nükleaz içermeyen su (85 μ L) bileşenlerinden oluşan toplamda 200 μ L'lik içeriğe sahip primer-probe miksleri halinde

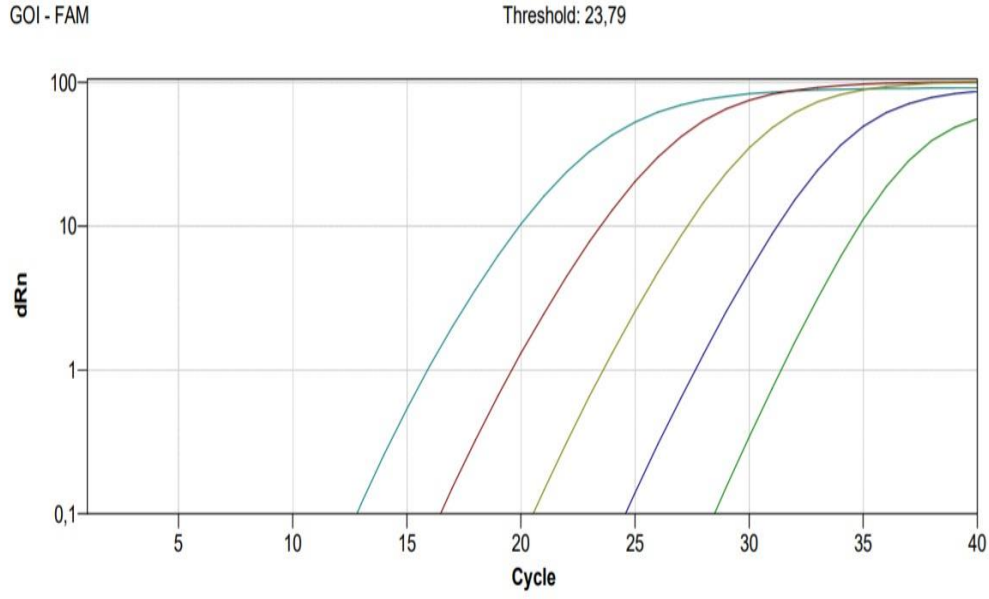
porsiyonlanmıştır. Analiz esnasında her bir numune için 2 µL primer probe miks, 10 µL hazır real time mastermix, 3 µL su ve son olarak da 5 µL template DNA koyularak toplamda her bir tüp 20 µL olarak pozitif kontrol (*Pasteurella multocida* Roberts tip 1 aşısı suşu) ve negatif kontrol (nükleaz içermeyen su) beraber çalışılmıştır. Pozitif kontrol ve Template DNA'lar kabin dışında PZR tüplerine aktarılmıştır. Üretici firma protokolü doğrultusunda bazı düzenlemeler yapılarak termal döngüde; 95 °C 'de 10 dk inkübasyon, 40 siklus olarak 95 °C 'de 10 sn annealing, 60 °C 'de 30 sn bağlanma, 72 °C de 1 sn uzama ve floresan okumanın gerçekleştiği basamaklar halinde çalışma tamamlanmıştır (Tablo 3.3.)

Tablo 3.3. Real time PZR programı

İnkübasyon	Denatürasyon	Çoğalma-40 döngü	
		Bağlanma	Floresan okuma
95°C -10 dk	95°C -10 sn	60°C-30 sn	72°C-1 sn

3.14. Minimum Tespit Limitinin Belirlenmesi

Real Time PZR analizinde kullanılan kitin duyarlılığını belirleyebilmek için minimum tespit limiti çalışılmıştır. *Pasteurella multocida* Roberts tip 1 aşısı suşu High Pure PZR Template Preparation Kit (Roche) protokolüne göre ekstrakte edilmiştir. Elde edilen DNA, 10 katlı seri sulandırılarak dilüe edilmiştir. Her bir dilusyona Real Time PZR analizi yapılmış, pozitif sonuç veren 36.51 Cycle Threshold (C_{1n}T) değeri metodun tespit limiti olarak saptanmıştır (Şekil 3.1.). Üçlü tekrar çalışmalarıyla doğrulanması yapılan eşik değeri 36.51 CT'nin altı pozitif kabul edilirken sonrasındakiler negatif kabul edilmiştir.



Şekil 3.1. Limit of Detection (LOD) görseli

3.15. MLST Analizi

3.15.1. MLST analizi öncesi DNA amplifikasyonu

Real time PZR sonucunda pozitif olduğu tespit edilen örneklerin dokudan ekstrakte edilen DNA'ları ve kültür sonunda vitek 2 cihazı ile *Pasteurella multocida* olduğu doğrulanmış izolatların kültürden ekstrakte edilen DNA'ları, *P. multocida*'nın korunmuş 7 gen bölgesine ait primer çiftleri kullanılarak amplifiye

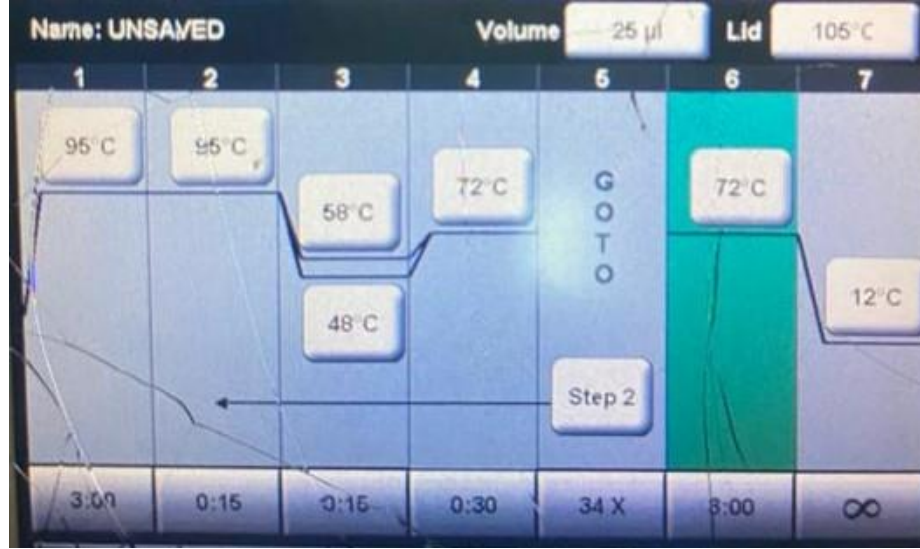
edildi. 100 mikromolar Primerler 1/9 oranında nükleaz free çözeltisiyle sulandırılarak kullanıldı. Reaksiyon karışımı, ısıya dayanıklı 200 µl'lik nükleazdan arındırılmış PZR tüpleri içerisinde, en son her bir tüpte toplamda 20 µl olacak şekilde; 12,5 µl master mix, 1 µl Forward Primeri, 1 µl Reverse Primeri), 5,5 µl nükleazdan arındırılmış ultrasaf su ve 5 µl DNA örneği eklenerek karışım vorteks ve spin edildi. DNA'ların amplifikasyonu Letgen firmasının yaptığı düzenlemelerle birlikte Tablo 3.4.' te belirtilen program koşullarında ThermalCycler cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. MLST ön basamağı amplifikasyon programı (*P.multocida* Pubmlst veritabanı)

1 döngü		35 döngü		1 döngü	
Başlangıç denatürasyon	Denatürasyon	İlk bağlanma	Uzama	Son uzama	Depolama
95 -3dk	95°C-15sn	48°C-15sn	72°C-30sn	72°C-3dk	4°C-4dk

3.15.2. Gradiyent PZR

Gradiyent PZR'la primerler ve DNA zincirinin en uygun bağlanacağı sıcaklık aralığının tespit edilmesi amaçlandı. *P. multocida* MLST yöntemiyle bakteriye ait 7 housekeeping (korunmuş) gen bölgesini incelemek için primer çiftlerinin belirtilen ortalama bağlanma sıcaklıkları (Tm°C) baz alınarak 10 °C değişken aralıkta çalışıldı. Bu metotta pozitif kontrolle çalışılan primerler öncesinde MLST için amplifiye edilen PZR ürünleriyle aynı içerik ve miktarda Şekil 3.2.'de gösterilen program koşulları doğrultusunda ThermalCycler (Simpli Amp) cihazında yürütüldü.



Şekil 3.2. Gradyent PZR programı

Hazırlanan PZR ürünlerinin elektroforezle UV jel görüntüsünde her bir gen için yakalanan en parlak ve spesifik bantların karşılık geldiği sıcaklık değeri en iyi bağlanma sıcaklığı olarak tespit edildi. Sonrasında MLST için sekans basamağına geçildi.

3.15.3. MLST analizinde kullanılacak PZR ürününün görüntülenmesi

Amplifiye edilen DNA'ları görüntüleyebilmek ve doğrulamak için jel elektroforezi kullanıldı. Bu basamakta 1,5 gr %1,5 oranında agaroz jel, 50 XTAE (Tris Asetat EDTA) solüsyonu ile 100 ml'ye tamamlandı. Sonrasında mikrodalga fırında şeffaf bir renk alarak homojenize olana dek ısıtıldı. Eriyen agaroz solüsyonuna buhar çıkışı bittikten sonra 5µl ethidium bromide ilave edildi ve dikkatle karıştırıldı. Düz bir zeminde kalıp tepsinin üzerine 20 dişli taraklar sabit kalacak şekilde yerleştirildikten sonra kabarcık çıkarmamaya özen göstererek henüz solüsyon halindeki jel yavaşça döküldü. Agaroz jelin katı halini alabilmesi için solüsyon oda sıcaklığında ortalama bir saat kadar beklemeye bırakıldı. Jel katılaşınca elektroforez tankına sabit bir biçimde yerleştirildi. Taraklar yavaşça tepside çıkarıldı ve böylece DNA'ların yükleneceği kuyucuklar elde edildi. DNA'ları kuyucuklara yüklemek amacıyla 1 µl 6X DNA Loading dye ve baz aralığını tespit edebilmek için 5 µl 2000 bp'lik ladder kullanıldı. Yükleme tamamlandıktan sonra DNA'lar 100 V, 400 A 'de ortalama yaklaşık 40 dk

yürütüldü. Son aşamada karanlık odada U.V. ışığında jeldeki bant görüntüleri değerlendirildi. Jelde temiz ve net bantlar veren PZR ürünlerinin varlıkları tespit edildi. Böylece doğrulanan tüm örnekler sekansları için Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Genetik Laboratuvarı'na gönderilerek analizleri gerçekleştirildi.

3.15.4. MLST analizi için hazırlanan PZR ürünün sekans verilerinin okunması, değerlendirilmesi ve allel numaralarının belirlenmesi

16 adet izolatın PZR amplifikasyonu, 7 korunmuş gen bölgesi (adk, aroA, deoD, gdhA, g6pd, mdh ve pgi) için MLST analizine uygun olacak şekilde pubMLST multihost (http://pubmlst.org/pmultocida_multihost/) veritabanındaki primerler ve protokoller kullanılarak gerçekleştirildi. ABI PRISM gene analyser ve GeneMapper Software 6 programları ile elde edilen iki yönlü ham sekans verilerinin kontrolü, hizalanması ve trimlenmesi, Chromas Version 2.6.6 ve Mega 11 programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Trimlenmiş sekans verileri ayrıca NCBI veritabanı kullanarak da kontrol edilmiştir. İzolatların allel numaraları ve sekans tiplerini belirlemek için MLST analizi pubMLST veritabanı (http://pubmlst.org/pmultocida_rirdc/) kullanılmıştır (Subaaharan ve ark., 2010).

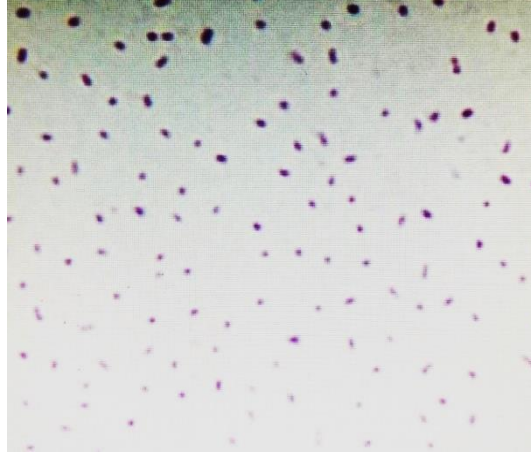
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

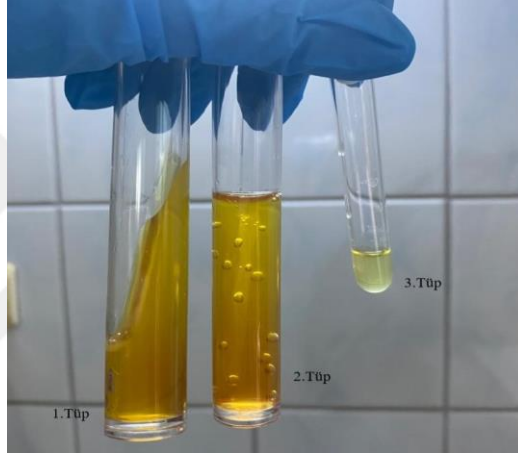
Bu çalışmada sığır ve koyunların lezyonlu akciğer dokularında *P.multocida*'nın varlığı konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırıldı. Yapılan analizlerde bakteri varlığının tespitinde önemli farklılıklar belirlendi. Bakteri varlığının tespit edildiği izolatlardan 15 tanesi seçilerek pozitif kontrol aşısı suşu ile birlikte filogenetik analizleri için sekans edildi. RT-PZR yöntemi ile pozitif olduğu tespit edilen ya da edilemeyen izolatlar bakterinin teşhisi yönünden incelendi ve elde edilen bulgular değerlendirildi. Laboratuvara gelen pnömonili akciğer numunelerinin kültür çalışmaları yapılarak kanlı agarda görülen şüpheli koloniler pasajlandı ve saf koloniler elde edildi. Daha sonra mikroskopisi gram negatif, kokobasil, McConkey agarda üremeyen, kanlı agarda hemoliz oluşturmayan, oksidaz ve katalaz pozitif izolatların identifikasyonu Vitek 2 Compact sistemi GN ID kartı ile gerçekleştirildi (Şekil 4.1.- Şekil 4.5.). Toplam 166 örnekten 5 tanesinde *Pasteurella multocida* kültür yöntemi ile izole ve identifiye edildi.



Şekil 4.1. Kanlı agarda *P.multocida* mukoid karakterde koloni morfolojisi



Şekil 4.2. *P. multocida* gram boyama sonrası Gram negatif kokobasillerin mikroskop görüntüsü



Şekil 4.3. Triple sugar iron (TSI) biyokimyasal test sonuçları. 1.tüp: Yatık agardaki glikoz ve/veya sükroz kullanarak kırmızı rengi sarıya döndürme (+), 2.tüp: Besiyerindeki mannitolu kullanarak kırmızı rengi sarıya döndürme (+), 3.tüp: Ürede renk değişikliği gözlenmedi(-)



Şekil 4.4. İndol negatif test sonucu

Biyonumara: 0001410540040001
Organizma Miktarı:

Seçilen Organizma: *Pasteurella multocida*

Yorumlar:	

McFarland:

İdentifikasyon Bilgileri	Kart: GN	Parti Numarası: 2411117403	Son Kullanım Tarihi: 17.Ara.2020 12:00 GMT +02:00
	Durum: Son	Analiz Zamanı: 7,77 saat	Tamamlandı: 29.Ağu.2019 20:09 GMT +02:00
Organizma Kaynağı	VITEK 2		
Seçilen Organizma	94% Olasılık Pasteurella multocida Biyonumara: 0001410540040001 Uyum: Çok iyi identifikasyon		
Ayrılacak Analiz Organizmaları ve Testler:			
Analiz Mesajları:			
Uyumsuz Olan Tipik Biopattern(ler) Pasteurella multocida dSOR(6),dTRE(11),			

Biyokimyasal Detaylar																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHI5a	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

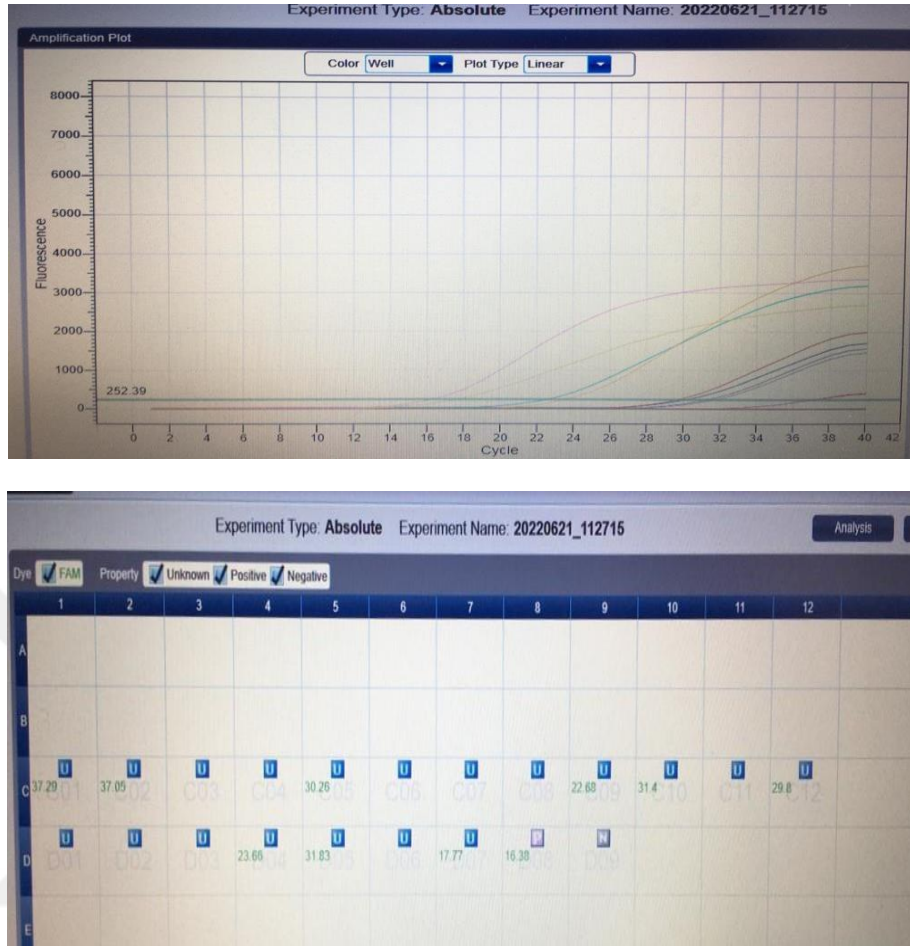
Şekil 4.5. *P. multocida* örneğine ait VITEK 2 Compact biyokimyasal test rapor örneği

4.2. Real Time PZR Bulguları

Toplanan 166 adet pnömonili sığır ve koyun akciğerleri RT-PZR ile çalışıldı ve 42 örnek *Pasteurella multocida* pozitif olarak tespit edildi. Minimum tespit limiti çalışması yöntem bölümünde belirtildiği üzere; Cycle time (Ct) değeri 36.51 ct' ye kadar olanlar pozitif kabul edildi ve cut-off değeri olarak saptandı. Tespit edilen 42 (sığır:12; koyun :30) adet pozitif örneğin 5 (sığır:3; koyun :2) adeti kültür ile izole edildi (Tablo 4.1., Şekil 4.6.). İzolasyon pozitif 5 adet örneğin tümü RT-PZR ile de pozitif olarak tespit edildi.

Tablo 4.1. Pozitif tespit edilen örneklerin bilgileri

Pozitif Numune	Hayvanın nevi	Kültür Pozitif	RT Pozitif	Ct Değerleri
1	Koyun	-	+	35,5
2	Koyun	+	+	24,4
3	Koyun	-	+	35,95
4	Koyun	-	+	23,32
5	Koyun	-	+	24,51
6	Koyun	-	+	19,11
7	Sığır	-	+	32
8	Sığır	-	+	30
9	Sığır	-	+	31,48
10	Sığır	-	+	34
11	Sığır	-	+	31
12	Kuzu	+	+	26
13	Sığır	-	+	36
14	Buzağı	+	+	31,85
15	Koyun	-	+	34,47
16	Koyun	-	+	21,79
17	Kuzu	-	+	20,47
18	Koyun	+	+	31,18
19	Koyun	-	+	20,28
20	Koyun	-	+	32,52
21	Koyun	-	+	31,76
22	Koyun	-	+	34,21
23	Koyun	-	+	26,55
24	Koyun	-	+	25,09
25	Koyun	-	+	30,78
26	Koyun	-	+	26,45
27	Kuzu	-	+	34,33
28	Sığır	-	+	18,3
29	Koyun	-	+	29
30	Koyun	-	+	34,8
31	Koyun	-	+	31,46
32	Koyun	-	+	24,95
33	Koyun	-	+	32,74
34	Sığır	-	+	32,6
35	Koyun	-	+	30,26
36	Sığır	+	+	22,26
37	Koyun	-	+	31,4
38	Sığır	-	+	29,8
39	Kuzu	-	+	24,23
40	Koyun	-	+	31
41	Koyun	-	+	17
42	Buzağı-	-	+	36,48



Şekil 4.6. Real-Time PZR analiz sonucu amplifikasyon eğrileri ve Ct değerleri. U :Örnek, P: Pozitif kontrol, N:Negatif Kontrol Lod değeri 36.51 olduğundan üzeri negatif değer olarak kabul edildi, 7 örnek pozitif tespit edildi

4.3. Multiloqus Sequence Typing Bulguları

RT-PZR ile pozitif olduğu tespit edilen 42 doku izolatının arasından Cycle time (Ct) değerleri göz önünde bulundurularak bütçe doğrultusunda 20 adet doku izolatının sekans için primer optimizasyon çalışmaları yapıldı fakat non spesifik bağlanmalar giderilemedi. MLST yöntemi için primer değişikliğine gidilerek bakterinin çoklu konakçıda bulunmasına özgü daha güncel olan primerler temin edilerek yeniden optimizasyon çalışmaları yapıldı ve 10 adet doku izolatında istenilen aralıktaki bantlar elde edildi. Bütçe ve zaman kısıtlılığı değerlendirilerek filogenetik çalışmanın amacına uygunsuzluk taşımayan non spesifik bağlanmaların görülmediği 5 adet *P. multocida* saf kültür izolatı sekans için seçilen örneklere dahil edildi. MLST için

Çalışılan 15 izolat, 7 adet primerin her biri için optimize edildi. Daha sonra konvansiyonel PZR ile PZR rnleri elde edilen örneklerin sekansları gerçekleştirildi (Tablo 4.2, şekil 4.7, şekil 4.8.).

Tablo 4.2. Sekans edilen örneklerin bilgileri

rnek sırası	örnek ismi	Hayvan nevi	Ct değeri
1	Doku ekstraksiyon 1	Koyun	24,4
2	Doku ekstraksiyon 2	Koyun	23,32
3	Doku ekstraksiyon 3	Koyun	24,51
4	Doku ekstraksiyon 4	Koyun	19,11
5	Doku ekstraksiyon 13	Koyun	20,28
6	Doku ekstraksiyon 24	Koyun	30,26
7	Doku ekstraksiyon 25	Sığır	22,68
8	Doku ekstraksiyon 26	Koyun	31,4
9	Doku ekstraksiyon 28	Kuzu	24,95
10	Doku ekstraksiyon 30	Koyun	17
11	Kültür ekstraksiyon 3	Koyun	24,4
12	Kültür ekstraksiyon 5	Sığır	26
13	Kültür ekstraksiyon 7	Koyun	-
14	Kültür ekstraksiyon 9	Sığır	-
15	Kültür ekstraksiyon 11	Koyun	-
16	Aşı suşu PK	-	16

korunmuş gen bölgelerine karşılık gelen allelik profillerin yeterli niteliğe sahip olmaması sebebiyle sekans tipleri tanımlanamadı.

Tablo 4.3. Sekans tipi belirlenemeyen örneklerin tablosu

İzolat	adk	aroA	deoD	gdhA	g6pd	mdh	pgi	ST
1		100	2	40		4	42	nd
2	27	82	2	25		4	27	nd
3	16	22		25		9	42	nd
4	27	47	4	33	7	57	41	nd
5	3	8	23	9		4	27	nd
6	27			25		32	42	nd
7	26		2	1		72	1	nd
8	20	65	1	25		32	41	nd
9	9	65	23	9		32	2	nd
10	27	30	2	25	2	60	27	nd
11	11	68	2	48	49	22		nd
12	16	32	47	1	1	8		nd
13	9	34	40	40	30	62	34	nd
14	1	98	19	16	36	31	94	nd
15	9	32	1	16	1	72	1	nd
16	26	20	24	22	56	9	25	nd

ND:Belirlenemedi

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sığır yetiştiricileri ve hayvan sağlığı alanı uzmanları solunum yolu hastalıklarının etkilerini azaltma konusunda ciddi güçlükler yaşamaktadırlar çünkü hastalık oldukça kompleks bir yapıya sahiptir. Kuzu pnömonileri de benzer bir etiyolojiye sahip olduğu gibi her iki tür için de tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi ekonomik kayıplar söz konusudur (Horwood ve Mahony, 2011). Sığır ve koyunların solunum yolu florasında bulunan fırsatçı patojen olduğu bilinen *P. Multocida*, yer aldığı olgularda primer veya sekonder patojen olarak rol oynamaktadır (Harper ve ark., 2006; Quinn ve ark., 2011). İdentifikasyon sürecinin önemli bir bölümü izolatin alındığı hayvan ile ilgili bilgilerin yer aldığı aşamadır. Çünkü birçok türün kendine özgü konak tercihi vardır. Pastörellozun kesin tanısı infekte dokulardan etkenin izolasyonuna dayanmaktadır. *P. multocida*'nın identifikasyonu için kullanılan kültür yöntemi WOAİ tarafından altın standart olarak bildirmiştir (Glennsonger ve Post, 2010; Dziva ve ark., 2000; 2001).

Ülkemizde ve Dünya'da sığır ve koyunlarda solunum sistemi enfeksiyonlarına sebep olan *P. multocida*'nın konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle identifikasyonuna yönelik çok sayıda araştırmalar mevcuttur. Ülkemizde de ağırlıklı olarak sığır solunum yolu hastalıklarına yönelik *P.multocida*'yı da içeren epeyce çalışmaların olduğunu söyleyebiliriz. Hazıroğlu ve ark. (1997) tarafından yapılan bir araştırmada pnömoni tablosu gözlenilen 100 adet buzağı akciğerlerinden %8 oranında *P.multocida* izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Erzurum yöresini kapsayan başka bir çalışmada pnömonili sığır akciğer örneklerinden kültürel yöntemlerle %4,5 oranında *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (Dinler, 1998). Elazığ'da yapılan 500'ünde pnömoni tablosunun tespit edildiği akciğer örneklerinden yapılan bir çalışmada; bakteriyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle 30 (%6) örnekte *P. multocida* identifiye

edilmiştir (Kılıç ve Muz, 2004). Ege bölgesinde yapılan bir diğer çalışmada Aydın ve İzmir'deki mezbahalardan alınan 570 sığır intratrakeal svabın 28 (%4,9)'inden *P. multocida* izole ve identifiye edilmiştir (Erbaş, 2007). Hatay bölgesindeki pnömonili 122 sığır akciğer örneğinden 3'ünden bakteriyolojik ve PM-PZR yöntemleri ile *P. multocida* identifiye edildiği bildirilmiştir (Ülker ve ark., 2012). Eser ve ark. (2020) tarafından yapılan in vitro kültürü gerçekleştirilen 200 adet pnömonili koyun ve sığır akciğer örneklerinde *P. multocida* izolatlarının %4'ünün sığır ve %3'ünün koyun akciğerine ait olduğunu belirtmişlerdir. Adana'da yapılan bir çalışmada 2017-2018 yılları arasında pnömoni semptomları gösteren 100 adet sığırdan toplanan akciğer örneklerinden konvansiyonel yöntemlerle 58 örneğin identifikasyonunun sağlandığını ve %13'ünde *P. multocida* identifiye edildiği rapor edilmiştir (Karahan ve ark., 2020). 2016-2019 yılları arasında Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu, Karadeniz ve Akdeniz bölgelerini kapsayan 850 sığır, 300 koyun ve 100 adet keçi akciğeri olmak üzere toplamda 1250 adet örnek ile yapılan bir çalışmada 66 (%71.73) sığır, 19 (%20.65) koyun, 7 (%7.6) keçi örneğini kapsayan toplamda 92 adet *P. multocida* identifiye edildiği bildirilirken en yüksek izolasyon oranına İç Anadolu Bölgesi'nden toplanan 2016 yılına ait izolatlarda rastlanıldığı bildirilmiştir (Sakmanoğlu ve ark., 2021). Marmara Bölgesi'nde pnömonili sığır, koyun ve keçi akciğerlerini içeren 152 adet örneğin çalışıldığı ve 2018- 2021 yılları boyunca izole edilen *P. multocida* oranının %11,8 (n=18) olduğu bildirilmiştir (Baykan ve ark., 2023). Kütahya ilinde bir mezbahadan sağlıklı görünen sığırlardan toplanan 210 adet akciğer örneğinin iki tanesinde (%0,95) *P. multocida* identifiye edilen çalışmada 50 adet oldukça düşük olan izolasyon oranına sağlıklı hayvan materyali kullanımının yol açtığı düşünülmüştür (Arslan ve Kenar, 2023).

Bölgelerindeki pnömonilerin kuzu hastalıklarında ve ölümlerinde en önemli sorun olma özelliğini taşımaya devam ettiğini bildiren başka bir çalışmada *P. multocida* pozitifliği % 10.52 olarak belirtilmiştir (Oruç, 2006). Şanlıurfa ilinde çalışılan 240 adet pnömonik koyun akciğer örneklerinden standart metotlarla 76 (%31,6)'sında *P. multocida* pozitiflik elde edilmiştir (Tel ve Keskin, 2010). Kars'ta gerçekleşen bir çalışmada 100 adet pnömonili koyun akciğerinden 3 tanesinde %3 oranında *P. multocida* pozitif bildirilmiştir (Dağ ve ark., 2018). Erzurum yöresinde koyun pnömonilerine dair en güncel verilere sahip olan bir çalışmada *P. multocida* pozitifliği koyunlarda %3 olarak belirlenirken sığırlarda % 5 olarak bildirilmiştir (Eser ve ark., 2020). Ege Bölgesi'nde toplanan 200 adet pnömonik kuzu ve koyun akciğer örneğinin izolasyon ve identifikasyon çalışmaları neticesinde 22/200 (%11) oranında *P. multocida* identifiye ettiklerini bildirmişlerdir (Özavcı ve ark., 2022). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da kuzu ve koyunlarda fibrinonekrotik pnömoni vakalarından en fazla *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın izole edildiği bildirilmiştir (Özyıldız ve ark., 2013; Dağ ve ark., 2018; Singh ve ark., 2018a.)

Dünya genelinde yapılan izolasyon çalışmalarına baktığımızda; toplanan 61 adet pnömonili buzağı akciğerlerinden 18'inde (%29,5) *P. multocida* tespit edildiği bildirilmiştir (Madsen ve ark., 1985). Danimarka'da yapılan bir başka araştırmada pnömonili 72 buzağı akciğer örneğinin 10'unda (%13,8) *P. multocida* izolasyonunun gerçekleştiği belirtilmiştir (Tegtmeier ve ark., 1999). Oklahoma'da 1994-2002 yıllarını kapsayan çalışmada pnömonili buzağıkların akciğerlerinden *P. multocida* izolasyonunun %34,7 olduğu ve bu izolasyon oranının yıllar bazında değişiminin %20 ile %47,4 oranında olduğu bildirilmiştir (Welsh ve ark., 2004).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada 200 adet pnömonik koyun ve kuzu akciğerinin 22 (%11)'sinden *P. multocida* izole edilmiştir (Singh ve ark., 2018). Etiyopya'daki başka bir çalışmada, 176 koyun ve sığır pnömonik akciğer örneğinin %6,83'ünde *P. multocida* pozitifliği elde edilirken dağılımları koyunlarda %8,43, sığırlarda %5,38 olarak belirtilmiştir (Tolera ve ark., 2019). Finlandiya'da yapılan bir araştırmada 84 buzağıdan toplanan trakeal lavaj örneğinin 17 (%14,3)'sinde *P. multocida* pozitiflik elde edilmiştir (Nikunen ve ark., 2007). Kanada'da SSH semptomları gösteren 99

buzağıda yapılan başka bir çalışmada da *P. multocida* pozitiflik oranı %19,1 olarak rapor edilmiştir (Gagea ve ark., 2006). İran'daki bir çalışmada enfekte ve sağlıklı görünümlü 120 adet sığır akciğer dokusundan 14 (%11,6)'ünde *P. multocida* pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Ashrafi ve ark., 2022).

Sunulan çalışmada 118 adet koyun, 48 adet sığır pnömonili akciğer dokularının standart kültürel yöntemle izolasyon çalışmaları neticesinde 2 tanesi sığır 3 tanesi koyun izolatu olmak üzere toplamda 5 adet (%3,01) örnekten *P. multocida* izole ve identifiye edildi. Pozitiflik oranlarına göre *P. multocida*'nın identifikasyon dağılım oranı sığırdaki %4,16 iken koyunda %2,54 olarak hesaplanmıştır. Bakteriyel izolasyon sonuçları diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında uyumluluk ya da farklılıkların olduğu gözlenmektedir. *P. multocida* enfeksiyonlarının yayılışı genel olarak bölgeler ve ülkeler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıklara yol açan etkenleri materyal bazında değerlendirdiğimizde; materyalin miktarı, makroskopik bulguları, orjinleri ve türü, elde edildiği konağın türü, temin edilme şekli ve zaman dilimi, konağın yaşı, bakım ve beslenme koşulları olarak yorumlanabilir. Bunların yanında çalışmaların kapsamındaki coğrafi bölge, iklim yapısı ve çalışmalarda yapılan uygulama farklılıkları gibi daha birçok değişkenin bu faktörler arasında yer alabileceğini düşündürmektedir. İzolasyonu etkileyen birçok değişken faktörün mevcudiyeti ve izolatların biyokimyasal özelliklerindeki değişkenlikler nedeniyle de konvansiyonel ve bakteriyolojik yöntemlerle yapılan teşhislerin moleküler yöntemlerle de desteklenmesi önemle vurgulanmaktadır (Dziva ve ark., 2000; 2001). Solunum sistemi enfeksiyonlarının görüldüğü vakalarda PZR tabanlı analizlerin geleneksel kültürel yöntemlere kıyasla daha fazla hassasiyet gösterdiği belirtilmektedir (Bell ve ark., 2014).

Ülkemizde *P. multocida* için yapılan moleküler çalışmalara bakıldığında, çalışılan PZR yöntemleri arasında RT-PZR'a rastlanmamıştır dolayısıyla sunulan çalışma bu yönüyle ülkesel çapta ilk olma niteliğine sahiptir. Karahan ve ark. (2020) tarafından *Mycoplasma bovis* için aynı örneklerle eş zamanlı olarak kültür ve RT-PZR yönteminin birlikte çalışıldığı bir araştırmada RT-PZR pozitifliği kültüre oranla, sunulan çalışmadakine benzer şekilde yüksek bulunmuştur. Dünya'da bakteriyel

teşhis amacıyla uygulanan RT-PZR çalışmalarına bakıldığında, Z r h  niversitesi'nde domuzlarda progresif atrofik rinite (PAR) yol açan tox-A genin varlığını araştırmak için nasal svaplarda kültür bazlı konvansiyonel PZR ve RT-PZR ile tox-A genini incelemişlerdir. Tox-A pozitifliği RT-PZR ile %49,8 olarak tespit edilirken konvansiyonel PZR ile bu oranın %44,3 olduğu belirlenmiş. Buna bağlı olarak domuzlarda PAR'ın geniş çaplı izleminde RT-PZR'ın daha hassas, verimli ve pratik bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Scherrer ve ark., 2016). Tocquevilleve ark. (2017) tarafından domuzlarda deneysel olarak yapılan bir araştırmadaysa kültür ve RT-PZR sonuçlarında istatistiksel anlamda farklılık gözlenmediği bildirilmiştir fakat yüksek sensitiviteye sahip olması, canlı domuzlardaki *P. multocida* miktarını belirleyerek domuzlarda ve insanlarda bakterinin yol açtığı enfeksiyonların kontrolüne yardımcı olması amacıyla RT-PZR metodunun rutin olarak kullanımı önerilmiştir. Yine aynı araştırma neticesinde *P. multocida*'nın domuzlarda hızlı yayılım gösterdiğine dikkat çekilmiş, insanlarda menenjitte yol açtığına değinilerek zoonoz bir bakteri olduğu vurgulanmıştır (Mutters ve ark., 1985; Register ve ark., 2012; Bardou ve ark., 2015; Pond ve ark., 2015; Boyanton ve ark., 2016). Hollanda'da gerçekleşen bir başka çalışmada sığır solunum yolu hastalıklarına ilişkin (SSH) *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* ve *Trueperella pyogenes* olmak üzere dört bakteriyel etken bronkoalveoler lavaj (BAL) izolatlarından multiplex real-time PZR (theRespoCheck PZR) ile *P. multocida* için cut-off değeri doğrultusunda 40 ct altı pozitif kabul edilerek incelenmiştir. RespoCheckPZR'ın eş zamanlı olarak bu dört bakteriyel etkeni tespit edebilmek için güvenilir ve hassas bir yöntem olduğu gösterilmiş olup standart bakteriyolojik metotlara göre daha kapsamlı ve hızlı sonuç verdiği belirtilerek bilhassa geniş ölçekli çalışmalar için tercih edilmesi önerilmiştir (Wisselink ve ark., 2017). Loy ve ark. (2018) tarafından yapılan bir araştırmada, Nebraska Üniversitesi-Lincoln Veteriner Teşhis Merkezi'ne sığır solunum yolu hastalıkları kompleksi (SSHK) şüphesi ile gönderilen 185 izolatta (nazal svap=43, akciğer dokusu =47 ve derin nazofarengeal svap=95) *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni*, *M. bovis* etkenlerini Real-Time PZR ve izolasyon yöntemleriyle incelemişlerdir. Etkenlerin RT-PZR tespit oranları sırasıyla % 64, % 73, % 26 ve %29 iken izolasyon oranları % 47, % 34, %7,5 ve % 12,4 olarak belirlenmiştir. En sık görülen etken birlikteliğinin, *M. haemolytica* ve *P.*

multocida olduğu bildirilmiştir. Teşhis amacıyla gönderilen örneklerin çoğunlukla antimikrobiyallerle tedavi edilmiş olması ya da laboratuvara ulaşana kadar aşırı bakteriyel çoğalmanın sadece kültür ile çalışılan numunelerde yanlış negatifliğe yol açtığı belirtilmiştir. Bu literatür çalışması ile elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermekte olup, birbirlerini yüksek oranda destekler niteliktedir. Bu doğrultuda *P. multocida*'nın RT-PZR ile tespitinin izolasyona kıyasla verimliliği konusunda kanaat birliği oluşmuştur. Suudi Arabistan'da pnömonili ya da solunum sistemi hastalıkları şüphesi taşıyan koyunlarda gerçekleştirilen bir araştırmadaysa postmortem olarak 57 nazal swap ve 43 akciğer dokusu toplayarak örneklerin kültürle izolasyonları, VİTEK 2 sistemi ile biyokimyasal identifikasyonları, antibiyotik duyarlılık testleri ve direkt moleküler identifikasyonu RT-PZR ile çalışılmıştır. *P. multocida* etkeni kültürel yöntemle hiç izole edilemezken RT-PZR ile pozitiflik 6 adet (%6) akciğer dokusunda tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar sunulan çalışmanın sonuçlarıyla büyük ölçüde örtüşmektedir (Alarawi ve ark., 2020). Kumar ve ark. (2020) tarafından yapılan bir başka araştırmada *P. multocida*'nın büyük geniş ölçekli epidemiyolojik çalışmaları ve patogenezinin aydınlatılması kapsamında, RT-PZR yönteminin yüksek verimliliğe sahip olması, bakteriyel DNA'yı doğru tespit etmesi ve miktarını belirlemedeki verimliliği sebebiyle yararlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir. *P. multocida*'nın hızlı ve spesifik tespiti için bu yöntemin değerli bir tanı aracı olduğu sonucuna varılmıştır. Sığır pastörellozuna ve hemorajik septisemiye yol açan *P. multocida* serogruplarının (A, B, E) belirlenmesini hedefleyen bir çalışmada multipleks RT-PZR'ın yüksek özgüllük ve duyarlılıkta bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte erken ve hızlı tanı için RT-PZR metodunun tercih edilmesi önerilerek aşı geliştirme çalışmalarına sunacağı katkı vurgulanmıştır (Wang ve ark., 2023).

Bu çalışmada 118 adet koyun, 48 adet sığır pnömonili akciğer doku izolatları RT-PZR yöntemi ile çalışılarak 30 (%25,4) koyun, 12 (%25) sığır olmak üzere toplam 166 numunedan 42'si (%25,3) *P. multocida* pozitif tespit edildi. Standart kültür yönteminde *P. multocida* pozitif identifikasyon sayılarının 3 (%2,54) koyun, 2(%4,16) sığır olmak üzere toplam 5 (%3,01) adet olduğu göz önünde bulundurulduğunda pozitiflik oranlarının yüksek farklılığa sahip olması dikkat

çekici bulunmuştur. Bu farklılıklara yol açan en önemli faktörlerin sahadan laboratuvara gelene kadar geçen zaman diliminde örneklerde meydana gelen aşırı bakteriyel üremenin ve öncesinde hayvanlara uygulanan antibiyotik tedavilerinin olabileceği düşünüldü. Etkenin teşhisini etkileyen bu faktörlerin araştırılması konusundaki çalışmalara duyulan ihtiyacın solunum yolu hastalıklarıyla ve *P. multocida* enfeksiyonlarıyla mücadelede kontrol bakımından büyük önem arz ettiği kanaatine varıldı. RT-PZR yönteminin klasik kültürel yöntemle kıyasla; *P. multocida* enfeksiyonlarında etkenin hızlı teşhisine dolayısıyla erken tanıya gidebilmenin hastalıkla mücadelede yüksek verimlilik sağlayacağı gözlemlendi. Gerekli validasyon çalışmaları sağlandıktan sonra *P. multocida*'nın teşhisi için RT-PZR'ın rutin laboratuvar uygulamalarında direk teşhis veya kültürel yöntemi destekleyici bir yöntem olarak kullanılmasının faydalı olacağı düşünüldü.

MLST tiplendirme metodu bakteriyel hastalıklar kapsamında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel evrimin anlaşılmasını ileri düzeye taşımış ve bakteriyel hastalıkların epidemiyolojisine ilişkin içgörüler sağlamıştır. Hastalık salgınlarının sürveyansı ve kontrolü bağlamında, bulaşıcı hastalıkları hızlı bir şekilde tiplendirebilmek ve takip edebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Birçok çalışma MLST'nin zoonoz hastalıkların ortaya çıkışı, salgın hastalıkların tespiti, prevalans oranlarının tahmini ve virülans faktörlerinin kökenlerinin (vertikal veya horizontal taşınan) belirlenmesi gibi durumlarda kullanımını örneklemiştir. MLST verileri ayrıca popülasyonun yapısını anlamak, antibiyotik direncinin ortaya çıkışını ve yayılımını incelemek için de kullanılmıştır (Ibarz-Pavon ve ark., 2011; Palazzo ve ark., 2011; Vanderkooi ve ark., 2011; Egger ve ark., 2012). Hâlihazırda kullanılan şemalar her geçen gün artarken, MLST en yaygın kullanıma sahip patojen tiplendirme yöntemi haline gelmiştir. Eski yöntemlere (serotipleme; MLEE) kıyasla baktığımızda, genetik çeşitliliğin kullanıma dahil edilmiş olması MLST'ye evrensel olarak karşılaştırılabilen (şemalar kapsamında), kolayca doğrulanabilen ve laboratuvarlar arasında kolayca paylaşılabilen değişken veriler üretme avantajı sağlar. Genel dizileme teknolojisinin kullanılması, MLST'yi tamamen otomatikleştirilebilen ve tek izolattan binlerce örneğe kadar ölçeklendirilebilen geniş çapta uygulanabilir bir metodoloji haline getirmektedir. Dizileme teknolojisi

ilerledikçe, patojen popülasyon dinamiklerini anlamamızı ve verilerin yorumlanmasını kısıtlayan otomasyon maliyetlerinin yüksek olması gibi ticari sorunların giderilmesi ümit edilmektedir. Ayrıca, housekeeping genlere odaklanması, hem yerel hem de küresel ölçeklerde patojen popülasyon genetik parametrelerini hesaplamak için kullanılabilecek önemli miktarda genetik veri sağlamaktadır. Bu parametreler komplike patojen evrim modelleri ve epidemiyoloji modelleri oluşturmak için kullanılarak hastalığın yayılımının nasıl kontrol edileceğine dair anlayışımızı da geliştirecektir. Mevcut mikrobiyal genomların hızla artması, housekeeping genler için veri madenciliğini daha uygulanabilir hale getirecek ve yeni MLST şemaları oluşturmak için gereken zaman ve maliyeti azaltacaktır. Halen MLST metodunun temel dezavantajı housekeeping gen bölgelerinin seçiminin referans genomlar gerektiriyor olmasıdır (Parkhill ve ark., 2003). Ayrıca, tüm patojenler MLST metodu için uygun değildir. Bazı patojenler (örneğin, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Yersinia pestis*) tüm genomları boyunca çok az varyasyon gösterirler ve yüksek ihtimalle suşlarının ayırt edilebilmesi için henüz yeterli genetik varyasyona sahip olmayan "evrimsel olarak genç" patojenleri temsil ederler. Diğer yandan bakteri genomlarının çok fazla varyasyon birikimine sahip olduğu durumda housekeeping genler tipleme için yeterli bilgiyi sağlayamamaktadır. Post genomik döneme baktığımızda tüm genom verileri ulaşılabilir hale gelse de MLST hala önemini korumaktadır. Organizmanın genel klonal çerçevesini oluşturarak genomik verilerin son 15 yılda toplanan eski veri setleriyle ilişkilendirilmesine olanak tanımaktadır (Jolley ve Maiden, 2014) MLST şemalarını geliştirirken bilgi açısından zengin ve yaygın olarak benimsenmiş şemaları, uygun maliyetli tüm genom dizileme ile birleştirebilmeliyiz (Perez-Losada ve ark., 2017).

P. multocida için Dünya’da MLST yöntemi ile yapılan çalışmalara baktığımızda; İngiltere ve Galler’de yapılan bir çalışmada; suşların birden fazla türde enfeksiyona neden olup olmadığını veya izolatların esas olarak tek bir türle ilişkili olup olmadığını belirlemek amacıyla *P. multocida*’ya ait sığır izolatlarındaki OMP profilleri kanatlı, koyun ve domuz izolatlarıyla karşılaştırılmış, aynı veya benzer suşların farklı konakçı türlerde hastalığa yol açtığı iki örnek tespit edilmiştir. Ayrıca

OmpA ve OmpH proteinlerine sahip bu OMP tiplerinin suşlarının, kapsüler tip A'ya sahip oldukları da bildirilmiştir. Sığır hastalıkları arasındaki *P. multocida* izolatlarının sınırlı derecede suş çeşitliliğine sahip olduğunu ortaya koydukları çalışmadaki türlerin her birinde solunum yolu enfeksiyonlarının çoğuna *P. multocida*'nın farklı suşlarının neden olduğu gösterilmiştir. Birden fazla konakçı türünde bakterinin az sayıda suşunun bulunması ve farklı konakçı türleri arasında bulaşması nedeniyle *P. multocida*'nın popülasyon biyolojisinde önemli bir faktör olduğunu düşünmüşlerdir (Davies ve ark., 2004). Avusturalya'da kanatlı türü için ilk kez MLST şeması oluşturulmasını temsil eden bir çalışmada toplam 66 adet *P. multocida* kültür suşu için MLST metoduyla toplam 29 ST (sequence type) tespit edildiği bildirilmiştir. Altı gen bölgesi için (est, mdh, pgi, pmi, adk ve gdh) beklenen boyutta PZR ürünleri elde edilirken, 'zwf-f1 ve zwf-r1' gen bölgesi için 10 adet suşta PZR ürünü elde edemediklerini, aynı gen bölgesi için yeniden primer 'zwf-f2 ve zwf-r2' tasarlayarak sonuç alabildiklerini belirtmişlerdir. Yedi gen bölgesinin içerdiği allel miktarlarının büyük oranda farklılıklara sahip oldukları gözlenmiştir. Birbirleriyle ilişkili ST'lerin oluşturduğu 4 adet CC (klonal kompleks) tanımlanmıştır. MLST ile tiplendirmenin yüksek spesifite, sensivite ve stabiliteye (epidemiyolojik anlamda) sahip olduğunu, kullanılan diğer tiplendirme yöntemleri kadar iyi performans gösterdiğini doğruladıklarını belirterek aynı zamanda taşınabilir ve laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilirliği kolay olduğundan MLST'nin *P. multocida* için 'altın standart' tiplendirme yöntemi olarak kabulünü önermişlerdir (Subaaharan ve ark., 2010). Sığır solunum yolu hastalıkları salgını sonucu İskoçya ve Fransa'daki iki sığır çiftliğinde *P. multocida*'nın tek ya da çoklu tiplerinin ilgili çiftliklerde bulunma eğiliminin araştırılmasını amaçlayan bir çalışmada kültür izolatları rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) tiplendirmesi ve restriksiyon enzimi kullanılarak darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) ile karakterize edilip buna ek olarak her bir çiftlik/RAPD profili kombinasyonunu temsil eden izolatlar MLST ile tiplendirilmiştir. Yapılan MLST analizinde tekrarlanan denemelere rağmen 1/7 lokusta ampikon oluşturulamayan örneklerle ilgili olarak tanımlanamayan tiplendirmelerin mevcut oldukları bildirilmiştir. MLST suşları arasındaki ilişkileri anlamak için uygulanabilirken housekeeping genlerin kullanımının özellikle de sığırlardaki *P. multocida* gibi klonal organizmalarda ayrımcı gücü

sınırlandırdığından, çiftlik düzeyinde epidemiyoloji veya salgınların araştırılmasında yöntem yararının azalabileceği çıkarımında bulunulmuştur (Hotchkiss ve ark., 2011a, 2011b). Sığır solunum izolatlarındaki *P. multocida* suşlarının sınırlı çeşitliliği, bölgesel olması ya da yöntem ayırım gücünün etkisi gibi nedenlerden ziyade niş ilişkisinin göstergesi olup olmadığını belirlemeyi amaçlayan, MLST şemasının kullanıldığı bir araştırmada yedi bölgeden biri olan zwf-f1/zwf-r1 primeriyle amplikon oluşturulamazken zwf-f2 ve zwf-r2 primeriyle başarıyla çoğaltılarak sekans edilmiştir. 1984-2008 yıllarında Birleşik Krallık, ABD ve Fransa'da çok sayıda konakçı ve hastalık sendromundan elde edilen küresel izolat koleksiyonuyla yapılan MLST analizinde sığır solunum yolu izolatlarının baskın olarak CC13 klonal kompleksinde yer aldıkları ve niş ile ilişkili suşlar oldukları bildirilmiştir. *P. multocida*'ya karşı etkili aşı geliştirme çalışmaları için CC13'te bulunan ve niş ilişkili suşların hedef alınması vurgulanmıştır (Hotchkiss ve ark., 2011a). *P. multocida* türlerinin evrimsel sürecinin daha önce bildirilen A (*P. multocida* subsp. *multocida* ve *P. multocida* subsp. *gallicida*) ve B (*P. multocida* subsp. *septica*) kökenlerine odaklanarak MLST analiziyle daha fazla araştırılmasını hedefleyen Danimarka'daki bir çalışmada, 116 örneğin serovarları hayvan kaynağı, toplama yeri ve tarihi açısından oldukça çeşitlilik içeren bir koleksiyon elde edilmiş olup toplamda 67 ST (sekans tipi) tespit edilmiştir. MLST için kullanılan DNA dizilerinin birleştirilmiş filogenetik analizi ile A (40 ST, 71 izolat) ve B (23 ST, 38 izolat) olmak üzere iki ana grubun varlığının doğrulandığı belirtilmiştir. A grubu içinde tümünü ruminant solunum yolu lezyonlarından izole ederek buldukları bir alt grup (altı ST içeren) tespit edilmiş ve bu grubun popülasyona spesifik PZR testi ve ortak virülens karakterlerinin belirlenmesi için başlangıç noktası olabileceği bildirilmiştir. B grubundaki genlere ilişkin sapmaların A'ya oranla fazla olduğu *P. multocida* subsp. *multocida*'nın *P. multocida* subsp. *septica*'dan geliştiği ve önemli değişikliklerin halen devam ettiği bildirilmiştir (Bisgaard ve ark., 2013). Kazakistan'da Sayga antiloplarında yapılan bir araştırmada, *P. multocida* nükleotid dizilerinin karşılaştırmalı analizi neticesinde tüm Kazakistan suşlarının incelenen tüm genlerde aynı olduğunu yani %100 homoloji göstermiş ve bu suşların kapsüler tip B'ye ait tek bir gruba karşılık geldiği bildirilmiştir. Kazakistan *P. multocida* suşlarının Macaristan, Burma, Sri Lanka, Pakistan ve İspanya'da hemorajik septisemili (HS)

hayvanlardan elde edilen suşlarla tek bir klonal grup oluşturdıkları görülmüş ve en yakın sekans tipinin Macaristan'a ait olduğu bildirilmiştir. Hayvanlarda popülasyon düzeyinde bakterinin varlığı tespit edilmiş olup, yer ve zaman içinde filogenetik olarak çok az çeşitlilik gözlemlendiği belirtilmiştir (Orynbayev ve ark., 2019). Genel olarak, koyun ve domuz izolatları arasındaki *P.multocida*'ya ait genotip ve virülans ile ilişkili gen (VAG) profillerindeki farklılıklara dikkat çeken, İspanya'da yapılan bir çalışmada koyun pnömonilerinden elde edilen izolatlar MLST ile karakterize edilmiş ve VAG ile tiplendirilerek domuz izolatlarıyla karşılaştırılmıştır. Koyun ve domuz izolatlarının ortak bir dizilim tipine sahip olmadıkları görülmüş ve farklı VAG profili sergilemişlerdir. Koyun izolatları çoğunlukla *tbpA*+/*toxA*+ VAG profili göstermiş ve özellikle küçük ruminantlarda tespit edilen ST'lere ait olup bu konakçılara adapte olmuş genotiplerin varlığına işaret etmiştir. Domuz izolatları arasında tespit edilen genotiplerin birden fazla konakçıda mevcut olup domuzlarla sınırlı olmadığı görülmüştür (García-Alvarez ve ark., 2017). Domuz izolatlarının genotiplerinin kanatlı izolatlarıyla benzerliklerini araştırmayı hedefleyen *P.multocida* suşlarının MLST ile tiplendirmelerinin yapıldığı Avusturalya'daki çalışmada domuzun kanatlılar için rezervuar olduğu, tersinin de geçerli olduğu bildirilmiştir. Bu durum domuz ve kanatlı çiftlikleri açısından dikkate alınması gereken önemli biyogüvenlik sonuçları doğurmuştur (Turni ve ark., 2018). Brezilya'da yapılan bir çalışmada farklı konakçılardan elde edilen *P.multocida* suşlarının genetik karakterleri incelemiş olup domuz izolatlarından elde edilen *P.multocida*'nın genomik DNA sekanslarının kanatlı, sığır, domuz ve tavşan türlerine ait suşlarının tüm genom dizisi verileri kullanılarak (WGS) analiz edilmiştir. WGS sonucu elde edilen veriler doğrultusunda *P. multocida* enfeksiyonlarında bakterinin konakçı tercihi geniş çapta belgelenmiş olsa da herhangi bir konakçıya özgü taşınan bir gen bulunmadığı bildirilmiştir (Peng ve ark., 2018). Sığırlarda hemorajik septisemiye yol açan *P. multocida* serogrup B:2 suşlarının karşılaştırmalı genom analizlerinin yapıldığı Hindistan'da gerçekleştirilen bir çalışmada, hareket özelliğine sahip çeşitli genetik elementlerin, antimikrobiyal direnç geninin ve biyofilm ile ilgili genlerin tespit edilmesi, bakterinin konakçının ekstrem koşullarına adaptasyonu ve immun sisteme karşı içerdiği tehlike potansiyeli konusunda ciddi katkı sağladığı belirtilmiştir. Bu doğrultuda mevcut HS aşısı suşu ile virülans suşları arasındaki yüksek single nükleotid polimorfizmi (SNP) farklılıkları

dikkate alınarak Hindistan'daki aşılama stratejilerinin yeniden gözden geçirilmesi önerilmiştir (Prajapati ve ark., 2022). İsveç'te temel amacı buzağılardan alınan derin nazal svapların (DNS) alt solunum yolu bakteri florasını temsil edip etmediğini araştırmak olan bir çalışmada buzağuların %75'inden elde edilen derin nazal svap ve trakeobronşiyal lavaj izolatlarının farklı olmadığı, MLST analizi sonucunda 28 izolattan 24 tanesinin aynı ST tipine sahip oldukları görülmüştür. SSH salgınları esnasında solunum sistemi bakteriyel patojenleri ve antibiyotik duyarlılıkları hakkında fikir edinebilmek için 4-6 buzağının üst solunum yollarından örnek almanın pratik ve verimli bir yöntem olabileceği önerisinde bulunulmuştur (Myrenås ve ark., 2024).

P. multocida'nın Marmara Bölgesi'ndeki sığır ve koyunlara ait saha suşları ve Robert tip 1 aşı suşunun nükleotid benzerlikleri ya da farklılıklarını değerlendirerek MLST yöntemiyle sekans tiplerini tespit etmek ve bu doğrultuda filogenetik bir analiz gerçekleştirmek bu çalışmanın hedefleri arasında yer almaktaydı. Fakat sekans analizleri sonucunda elde edilen okuma verilerinin tiplendirmek için yeterli niteliğe sahip olmaması nedeniyle allelik profil belirlenememiş ve sekans tipi tanımlanamamıştır.

KAYNAKLAR

- Adegboye, D. S., Halbur, P. G., Cavanaugh, D. L., Werdin, R. E., Chase, C. C., Miskimins, D. W., & Rosenbusch, R. F. (1995). Immunohistochemical and pathological study of Mycoplasma bovis-associated lung abscesses in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(3), 333-337.
- Alarawi, F. A., & Saeed, E. M. (2021). Isolation, antibiogram and molecular detection of Mannheimia and Pasteurella associated with pneumonia in sheep in Al-Madinah Region, Saudi Arabia. *International Journal of Veterinary Science*, 10, 6.
- Alexander, T. W., Timsit, E., & Amat, S. (2020). The role of the bovine respiratory bacterial microbiota in health and disease. *Animal Health Research Reviews*, 21(2), 168-171.
- Arda, M. (2015). Bölüm 32, 5. Baskı Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi:82, Ankara, 221-241
- Arslan, S. M., & Kenar, B. (2023). Isolation, identification and antibiotic sensitivity of Pasteurella species in cattle slaughtered in slaughterhouses in Kütahya province. *Kocatepe Veterinary Journal*, 16(2), 127-130.
- Ashrafi, F., Azari, A. A., & Fozouni, L. (2022). Prevalence and antibiotic resistance pattern of mannheimia haemolytica and pasteurella multocida isolated from cattle lung samples from an industrial abattoir: a study from Northeastern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 16(4).
- Avril, J. L., Donnio, P. Y., & Pouedras, P. A. S. C. A. L. (1990). Selective medium for Pasteurella multocida and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6), 1438-1440.
- Aydın, N., İzgür, M., Diker, K. S., Yardımcı, H., Esenal, Ö., Paracıkoğlu, J., & Akan, M. (2006). Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). *Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık*, 145-163.
- Baldrias, L., Frost, A. J., & O'boyle, D. E. N. I. S. E. (1988). The isolation of Pasteurella-like organisms from the tonsillar region of dogs and cats. *Journal of small animal practice*, 29(1), 63-68.
- Bardou, M., Honnorat, E., Dubourg, G., Couderc, C., Fournier, P. E., Seng, P., & Stein, A. (2015). Meningitis caused by Pasteurella multocida in a dog owner without a dog bite: clonal lineage identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC research notes*, 8, 1-5.
- Batmaz, H. (2006). Pasteurella pneumonileri ve ekonomik önemi. In. Sığırların Solunum Sistemi Hastalıkları Sempozyumu, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 58-64.
- Baykan, Z. K., Tabak, M. H., Kılıç, A., Gün, H., & Mete, A. Marmara Bölgesi'nde pnömoni görülen sığır, koyun ve keçilerin akciğerlerinden izole edilen

- etkenlerin bakteriyolojik yöntemlerle araştırılması ve epidemiyolojisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 16(2), 209-218.
- Bell, C. J., Blackburn, P., Elliott, M., Patterson, T. I., Ellison, S., Lahuerta-Marin, A., & Ball, H. J. (2014). Investigation of polymerase chain reaction assays to improve detection of bacterial involvement in bovine respiratory disease. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 26(5), 631-634.
- Bisgaard, M., Houghton, S. B., Mutters, R., & Stenzel, A. (1991). Reclassification of German, British and Dutch isolates of so-called *Pasteurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. *Veterinary Microbiology*, 26(1-2), 115-124.
- Bisgaard, M., Petersen, A., & Christensen, H. (2013). Multilocus sequence analysis of *Pasteurella multocida* demonstrates a type species under development. *Microbiology*, 159, 580-590.
- Blackall, J. K. Miflin, P. J., & Miflin, J. K. (2000). Identification and typing of *Pasteurella multocida*: A review. *Avian Pathology*, 29(4), 271-287.
- Blackall, P. J., Fegan, N., Chew, G. T., & Hampson, D. J. (1998). Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. *Microbiology*, 144(2), 279-289.
- Booker, C. W., Guichon, P. T., Jim, G. K., Schunicht, O. C., Harland, R. J., & Morley, P. S. (1999). Seroepidemiology of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 40(1), 40.
- Boyanton Jr, B. L., Freij, B. J., Robinson-Dunn, B., Makin, J., Runge, J. K., & Luna, R. A. (2016). Neonatal *Pasteurella multocida* subsp. septica meningitis traced to household cats: molecular linkage analysis using repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 230-232.
- Boyce, J. D., & Adler, B. (2000). The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B: 2). *Infection and immunity*, 68(6), 3463-3468.
- Boyce, J. D., Cullen, P. A., Nguyen, V., Wilkie, I., & Adler, B. (2006). Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the in vivo environment of the natural host. *Proteomics*, 6(3), 870-880.
- Boyce, J. D., Seemann, T., Adler, B., & Harper, M. (2012). Pathogenomics of *Pasteurella multocida*. *Molecular Biology, Toxins and Infection*, 23-38.
- Boyce, J. D., Wilkie, I., Harper, M., Paustian, M. L., Kapur, V., & Adler, B. (2002). Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. *Infection and immunity*, 70(12), 6871-6879.
- Boyce, J. D., Wilkie, I., Harper, M., Paustian, M. L., Kapur, V., & Adler, B. (2004). Genomic-scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within liver tissue of chickens with fowl cholera. *Microbes and infection*, 6(3), 290-298.
- Carter GR and de Alwis MCL (1989). Hemorrhagic septicemia. In: Adlam C and Rutter JM (eds) *Pasteurella and Pasteurellosis*. London: Academic Press, pp. 132-160.
- Carter, G. R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *American Journal of Veterinary Research*, 6(60), 481-4.

- Chevalier, G., Duclohier, H., Thomas, D., Shechter, E., & Wroblewski, H. (1993). Purification and characterization of protein H, the major porin of *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology*, 175(1), 266-276.
- Christensen, H., Bisgaard, M., Angen, Ø., Frederiksen, W., & Olsen, J. E. (2005). Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *Journal of clinical microbiology*, 43(1), 259-270.
- Chung, J. Y., Wilkie, I., Boyce, J. D., Townsend, K. M., Frost, A. J., Ghoddusi, M., & Adler, B. (2001). Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infection and immunity*, 69(4), 2487-2492.
- Collins, M. T., Weaver, N., & Ellis, R. P. (1981). Identification of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* by API 20E, Minitex, and Oxi/Ferm systems. *Journal of clinical microbiology*, 13(3), 433-437.
- Confer, A. W. (2009). Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Animal Health Research Reviews*, 10(2), 145-148.
- Crosby, W., & Woolums, R.A. (2022). Pasteurellaceae. in: *Veterinary Microbiology*, Fourth Edition. Edited by Scott McVey, Melissa Kennedy, M.M. Chengappa, and Rebecca Wilkes. Published by John Wiley & Sons, Inc, 108.
- Dabo, S. M., Confer, A. W., & Hartson, S. D. (2005). Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Veterinary microbiology*, 110(3-4), 265-275.
- Dabo, S. M., Confer, A. W., & Murphy, G. L. (1997). Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Veterinary Microbiology*, 54(2), 167-183.
- Dabo, S. M., Confer, A. W., & Quijano-Blas, R. A. (2003). Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A: 3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial pathogenesis*, 35(4), 147-157.
- Dabo, S. M., Confer, A., Montelongo, M., York, P., & Wyckoff III, J. H. (2008). Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. *Vaccine*, 26(34), 4345-4351.
- Dagleish, M. P., Hodgson, J. C., Ataei, S., Finucane, A., Finlayson, J., Sales, J., ... & Coote, J. G. (2007). Safety and protective efficacy of intramuscular vaccination with a live *aroA* derivative of *Pasteurella multocida* B: 2 against experimental hemorrhagic septicemia in calves. *Infection and immunity*, 75(12), 5837-5844.
- Dag, S., Gurbuz, A., Ozen, H., Buyuk, F., Celebi, O., Karaman, M., ... & Karakurt, E. (2018). Immunohistochemical and molecular detection of *Mannheimia* spp. and *pasteurella* spp. in sheep with pneumonia in Kars province-Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 24(2).
- Davies, R. L., MacCorquodale, R., & Reilly, S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Veterinary microbiology*, 99(2), 145-158.
- Davies, R. L., MacCorquodale, R., & Caffrey, B. (2003). Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. *Veterinary microbiology*, 91(2-3), 169-182.

- De Alwis, M. C. L. (1992). Haemorrhagic septicaemia—a general review. *British Veterinary Journal*, 148(2), 99-112.
- De Jong, M. F. (1999). Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. *Diseases of swine*, 9, 577-602.
- DeLong, D., & Manning, P. J. (1994). Bacterial diseases. In *The biology of the laboratory rabbit* (pp. 129-170). Academic Press.
- Dinler U. Pnömonili sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu ve identifikasyonu. Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1998
- Dodd, D. A., Worth, R. G., Rosen, M. K., Grinstein, S., van Oers, N. S., & Hansen, E. J. (2014). The *Haemophilus ducreyi* LspA1 protein inhibits phagocytosis by using a new mechanism involving activation of C-terminal Src kinase. *MBio*, 5(3), 10-1128.
- Dowling, A., Hodgson, J. C., Dagleish, M. P., Eckersall, P. D., & Sales, J. (2004). Pathophysiological and immune cell responses in calves prior to and following lung challenge with formalin-killed *Pasteurella multocida* biotype A: 3 and protection studies involving subsequent homologous live challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100(3-4), 197-207.
- Du, C. H., Huang, Y., Jiang, J. F., Gao, Z. H., Jia, N., Yang, S., ... & Cao, W. C. (2020). A large-scale fatal outbreak of *Pasteurella multocida* among wild rodents in southwestern China. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 2(2), 91-98.
- Dziva, F., Christensen, H., Olsen, J. E., & Mohan, K. (2001). Random amplification of polymorphic DNA and phenotypic typing of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 82(4), 361-372.
- Dziva, F., Mohan, K., & Pawandiwa, A. (2000). Capsular serogroups of *Pasteurella multocida* isolated from animals in Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 67(4), 225-228.
- Egger, R., Korczak, B. M., Niederer, L., Overesch, G., & Kuhnert, P. (2012). Genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter coli* in fattening pigs. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 272-278.
- Enright, M. C., & Spratt, B. G. (1998). A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 144(11), 3049-3060.
- Erbaş, G. (2007). Aydın ve İzmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Doktora tezi. Adnan Menderes Üniversitesi.
- Eser, G., Yildirim, S., Sağlam, Y., Çelebi, D., & Yılmaz, A. (2020). Koyun pnömonilerinde Mannheimia (*Pasteurella*) haemolytica izolasyonu ve patolojik incelemeler. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15(2), 122-129.
- Ewers, C., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Kießling, S., Filter, M., & Wieler, L. H. (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary microbiology*, 114(3-4), 304-317.
- Fajfar-Whetstone, C. J., Coleman, L., Biggs, D. R., & Fox, B. C. (1995). *Pasteurella multocida* septicemia and subsequent *Pasteurella dagmatis* septicemia in a diabetic patient. *Journal of clinical microbiology*, 33(1), 202-204.
- Frank, G. (1989). Pasteurellosis of cattle. *Pasteurella and pasteurellosis*, 197-222.

- Frank, G. H. (1986). The role of *Pasteurella haemolytica* in the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Medicine*, 22-31.
- Fuller, T. E., Kennedy, M. J., & Lowery, D. E. (2000). Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microbial pathogenesis*, 29(1), 25-38.
- Gagea, M. I., Bateman, K. G., Van Dreumel, T., McEwen, B. J., Carman, S., Archambault, M., ... & Caswell, J. L. (2006). Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(1), 18-28.
- Galdiero, M., Folgore, A., Nuzzo, I., & Galdiero, E. (2000). Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells in vitro by protein H and LPS of *Pasteurella multocida*. *Immunobiology*, 202(3), 226-238.
- García-Alvarez, A., Vela, A. I., San Martín, E., Chaves, F., Fernández-Garayzábal, J. F., Lucas, D., & Cid, D. (2017). Characterization of *Pasteurella multocida* associated with ovine pneumonia using multi-locus sequence typing (MLST) and virulence-associated gene profile analysis and comparison with porcine isolates. *Veterinary microbiology*, 204, 180-187.
- Garrido, M. E., Bosch, M., Bigas, A., Badiola, I., Barbé, J., & Llagostera, M. (2008). Heterologous protective immunization elicited in mice by *Pasteurella multocida* fur ompH. *International Microbiology*, 11(1), 17.
- Garrity, G. (2007). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria (Vol. 2)*. Springer Science & Business Media.
- Glennsonger J.ve W. Post. Mannheimia ve Pasteurella Cinsleri. Veteriner Hekim Mikrobiyolojisi. Ed: Özdem A. Ve Yakut Ö. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti. İstanbul. 181-190, 2012
- Güler, L., Gündüz, K., & SarışahİN, A. S. (2013). Capsular typing and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from different hosts. *Kafkas University Veterinary Faculty Journal*, 19 (5), 843-849.
- Gündüz, K., & Erganiş, O. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinden izole edilen *Pasteurella haemolytica* suslarının biyotiplendirilmesi ve serotiplendirilmesi. *Veterinarium*, 9, 11-19
- Haritani, M., Nakazawq, M., Hashimoto, K., & Narita, M. (1990). Immunoperoxidase evaluation of the relationship between necrotic lesions and causative bacteria in lungs. *American Journal of Veterinary Research*, 51(12).
- Haritani, M., Narita, M., Murata, H., Hashimoto, K., & Takizawa, T. (1989). Immunoperoxidase evaluation of pneumonic lesions induced by *Pasteurella multocida* in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 50(12), 2162-2167.
- Harper, M., & Boyce, J. D. (2017). The myriad properties of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide. *Toxins*, 9(8), 254.
- Harper, M., Boyce, J. D., & Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS microbiology letters*, 265(1), 1-10.
- Harper, M., Boyce, J. D., Cox, A. D., St. Michael, F., Wilkie, I. W., Blackall, P. J., & Adler, B. (2007a). *Pasteurella multocida* expresses two lipopolysaccharide glycoforms simultaneously, but only a single form is required for virulence: identification of two acceptor-specific heptosyl I transferases. *Infection and immunity*, 75(8), 3885-3893.

- Harper, M., Boyce, J. D., Wilkie, I. W., & Adler, B. (2003). Signature-tagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chickens. *Infection and immunity*, 71(9), 5440-5446.
- Harper, M., Cox, A. D., St. Michael, F., Wilkie, I. W., Boyce, J. D., & Adler, B. (2004). A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. *Infection and immunity*, 72(6), 3436-3443.
- Harper, M., Cox, A., St. Michael, F., Parnas, H., Wilkie, I., Blackall, P. J., ... & Boyce, J. D. (2007b). Decoration of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide with phosphocholine is important for virulence. *Journal of bacteriology*, 189(20), 7384-7391.
- Hata, E., Katsuda, K. E. N., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K., & Eguchi, M. (2010). Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *Journal of clinical microbiology*, 48(6), 2130-2139.
- Hatfaludi, T., Al-Hasani, K., Boyce, J. D., & Adler, B. (2010). Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary microbiology*, 144(1-2), 1-17.
- Hazirolu, R., Erdeger, J., Gulbahar, M. Y., & Kul, O. (1997). Association of *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* with pneumonia in calves. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 104(4), 150-153.
- He, F., Yin, Z., Wu, C., Xia, Y., Wu, M., Li, P., ... & Peng, Y. (2019). L-serine lowers the inflammatory responses during *Pasteurella multocida* infection. *Infection and Immunity*, 87(12), 10-1128.
- Heddleston, K. L., & Rebers, P. A. (1975). Properties of free endotoxin from *Pasteurella multocida*. *American Journal of Veterinary Research*, 36(4), 573-574.
- Heddleston, K. L., Gallagher, J. E., & Rebers, P. A. (1972). Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian diseases*, 925-936.
- Hodgson, P. D., Aich, P., Manuja, A., Hokamp, K., Roche, F. M., Brinkman, F. S. L., ... & Griebel, P. J. (2005). Effect of stress on viral-bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. *Comparative and functional genomics*, 6(4), 244-250.
- Holmgren, J., & Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, 11, 45-53.
- Horadagoda, N. U., Hodgson, J. C., Moon, G. M., Wijewardana, T. G., & Eckersall, P. D. (2001). Role of endotoxin in the pathogenesis of haemorrhagic septicaemia in the buffalo. *Microbial pathogenesis*, 30(3), 171-178.
- Horwood, P. F., & Mahony, T. J. (2011). Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex. *Journal of virological methods*, 171(2), 360-363.
- Hotchkiss, E. J., Hodgson, J. C., Lainson, F. A., & Zadoks, R. N. (2011a). Multilocus sequence typing of a global collection of *Pasteurella multocida* isolates from cattle and other host species demonstrates niche association. *BMC microbiology*, 11, 1-8.

- Hotchkiss, E. J., Hodgson, J. C., Schmitt-Van De Leemput, E., Dagleish, M. P., & Zadoks, R. N. (2011b). Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in dairy and beef calves. *Veterinary microbiology*, 151(3-4), 329-335.
- Hunt Gerardo, S., Citron, D. M., Claros, M. C., Fernandez, H. T., & Goldstein, E. J. (2001). *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and α -glucosidase activity. *Journal of clinical microbiology*, 39(7), 2558-2564.
- Ibarz-Pavón, A. B., Morais, L., Sigaúque, B., Mandomando, I., Bassat, Q., Nhacolo, A., ... & Roca, A. (2011). Epidemiology, molecular characterization and antibiotic resistance of *Neisseria meningitidis* from patients ≤ 15 years in Manhica, rural Mozambique. *PLoS One*, 6(6), e19717
- Jamaludin, R., Blackall, P. J., Hansen, M. F., Humphrey, S., & Styles, M. (2005). Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from pigs at slaughter in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 53(3), 203-207.
- Janzen, E. D. (1997). The role of *Haemophilus somnus* in bovine respiratory disease (BRD). *The Bovine Practitioner*, 39-45.
- Jolley, K. A., & Maiden, M. C. (2014). Using MLST to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future microbiology*, 9(5), 623-630.
- Karahan, Ş., & Ekin, İ. H. (2020). Pnömonili Sığır Akciğer Örneklerinde *Mycoplasma bovis*' in Real Time PCR ile Araştırılması. XIV. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*(ss. 148-149). Konya, Türkiye.
- Kılıç, A., & Muz, A. (2004). Pnömonili sığır akciğerlerinden bakteri izolasyonları ve izole *pasteurella*'ların polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(1), 217-223.
- Kock, R. A., Orynbayev, M., Robinson, S., Zuther, S., Singh, N. J., Beauvais, W., ... & Milner-Gulland, E. J. (2018). Saigas on the brink: Multidisciplinary analysis of the factors influencing mass mortality events. *Science advances*, 4(1), 2314.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC (1988). *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology*. Third Edition, Lippincott Comp., Philadelphia, USA.
- Krause, T. H., Bertschinger, H. U., Corboz, L., & Mutters, R. (1987). V-factor dependent strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 266(1-2), 255-260.
- Kumar, J., Sonawane, G. G., Singh, F., Pandian, S. J., & Kumar, R. (2020). Evaluation of a SYBR Green Real-Time PCR Assay for Specific Detection of *Pasteurella multocida* in Culture and Tissue Samples from Sheep. *Indian Journal of Animal Research*, 8, 1006-1011.
- Lariviere, S., Leblanc, L., Mittal, K. R., & Martineau, G. P. (1993). Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. *Journal of clinical microbiology*, 31(2), 364-367.
- Lennette, E. H., Ballows, A., & Hausler WJ Jr, S. H. (1985). *Manual of clinical microbiology* American society for microbiology Washington DC.
- Lopez A (2007). Respiratory system. In: McGarvin MD and Zachary JF (eds) *Pathological Basis of Veterinary Disease*, St. Louis, MO: Mosby Elsevier, pp. 522-523

- Loy, J. D., Leger, L., Workman, A. M., Clawson, M. L., Bulut, E., & Wang, B. (2018). Development of a multiplex real-time PCR assay using two thermocycling platforms for detection of major bacterial pathogens associated with bovine respiratory disease complex from clinical samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 30(6), 837-847.
- Lugtenberg, B., Van Boxtel, R., & De Jong, M. (1984). Atrophic rhinitis in swine: correlation of *Pasteurella multocida* pathogenicity with membrane protein and lipopolysaccharide patterns. *Infection and Immunity*, 46(1), 48-54.
- Luo, Y., Glisson, J. R., Jackwood, M. W., Hancock, R. E., Bains, M., Cheng, I., & Wang, C. (1997). Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* X-73. *Journal of Bacteriology*, 179(24), 7856-7864.
- Madsen, E. B., Bisgaard, M., Mutters, R., & Pedersen, K. B. (1985). Characterization of *Pasteurella* species isolated from lungs of calves with pneumonia. *Canadian journal of comparative medicine*, 49(1), 63.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., ... & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3140-3145.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Culliname, A., & Maguire, D. (2013). *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Bibersteinia* and *Avibacterium* species. *Clinical Veterinary Microbiology*, 2, 307-316.
- Martin, S. W., Bateman, K. G., Shewen, P. E., Rosendal, S., & Bohac, J. E. (1989). The frequency, distribution and effects of antibodies, to seven putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53(3), 355.
- McDanel, T. G., Kuehn, L. A., & Keele, J. W. (2018). Evaluating the microbiome of two sampling locations in the nasal cavity of cattle with bovine respiratory disease complex (BRDC). *Journal of animal science*, 96(4), 1281-1287.
- Melvin, J. A., Scheller, E. V., Noël, C. R., & Cotter, P. A. (2015). New insight into filamentous hemagglutinin secretion reveals a role for full-length FhaB in *Bordetella* virulence. *MBio*, 6(4), 10-1128.
- Michael, G. B., Kadlec, K., Sweeney, M. T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., ... & Schwarz, S. (2012a). ICE Pmu1, an integrative conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: structure and transfer. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(1), 91-100.
- Michael, G. B., Kadlec, K., Sweeney, M. T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., ... & Schwarz, S. (2012b). ICE Pmu1, an integrative conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: analysis of the regions that comprise 12 antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(1), 84-90.
- Muhairwa, A. P., Christensen, J. P., & Bisgaard, M. (2000). Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. *Avian pathology*, 29(2), 133-142.
- Muhairwa, A. P., Christensen, J. P., & Bisgaard, M. (2001). Relationships among *Pasteurellaceae* isolated from free ranging chickens and their animal contacts

- as determined by quantitative phenotyping, ribotyping and REA-typing. *Veterinary microbiology*, 78(2), 119-137.
- Muhairwa, A. P., Christensen, J. P., & Bisgaard, M. (2002). Serum resistance of *Pasteurella multocida* in avian and porcine sera, and comparative virulence investigations of selected serum-sensitive and resistant strains in chickens. *Avian Pathology*, 31(2), 183-191.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W., & Mannheim, W. (1985). Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(3), 309-322.
- Mutters, R., Piechulla, K., & Mannheim, W. (1984). Phenotypic differentiation of *Pasteurella* sensu stricto and the *Actinobacillus* group. *European Journal of Clinical Microbiology*, 3, 225-229.
- Myrenås, M., Pringle, M., Harbom, B., & Bengtsson, B. (2024). *Pasteurella multocida* from deep nasal swabs and tracheobronchial lavage in calves. Research square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4162560/v1>
- Nazierbieke, W., Yan, F., He, C., Zhang, L., & Borathybay, E. (2008). Expression and purification of an adhesive protein of rabbit *Pasteurella multocida* C51-3 and detection of its antigenicity. *Sheng wu Gong Cheng xue bao= Chinese Journal of Biotechnology*, 24(8), 1446-1453.
- Nikunen, S., Härtel, H., Orro, T., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivelä, S. L., ... & Soveri, T. (2007). Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 30(3), 143-151.
- O'Connor, A., Martin, S. W., Nagy, E., Menzies, P., & Harland, R. (2001). The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to bovine coronavirus and bovine viral diarrhea virus in 3 Ontario feedlots. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 65(3), 137.
- Oruc, E. (2006). The pathologic and bacteriologic comparison of pneumonia in lambs. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30(6), 593-599.
- Orynbayev, M., Sultankulova, K., Sansyrbay, A., Rystayeva, R., Shorayeva, K., Namet, A., ... & Kock, R. (2019). Biological characterization of *Pasteurella multocida* present in the Saiga population. *BMC microbiology*, 19, 1-10.
- Önat, K., Kahya, S., & Carli, K. T. (2010). Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 34(1), 91-94.
- Özavcı, V., Nuhay, Ç., & Özden, M. (2022). Ege bölgesinde koyun ve kuzu pnömonisi olgularında *Pasteurella Multocida* ve *Mannheimia Haemolytica* izolasyonu ve antibiyotik dirençlerinin tespiti. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 33(2), 59-63.
- Özyıldız, Z., Tel, O. Y., Yılmaz, R., Özsoy, Ş. Y., & Keskin, O. (2013). Pathological and microbiological investigations of pneumonic pasteurellosis in sheep. Pathological and microbiological investigations of pneumonic pasteurellosis in sheep. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 103-108.

- Palazzo, I. C. V., Pitondo-Silva, A., Levy, C. E., & da Costa Darini, A. L. (2011). Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. *Journal of Hospital Infection*, 79(1), 70-74.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., ... & Maskell, D. J. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature genetics*, 35(1), 32-40.
- Peng, Z., Liang, W., Wang, F., Xu, Z., Xie, Z., Lian, Z., ... & Wu, B. (2018). Genetic and phylogenetic characteristics of *Pasteurella multocida* isolates from different host species. *Frontiers in microbiology*, 9, 358851.
- Pérez-Losada, M., Porter, M. L., Viscidi, R. P., & Crandall, K. A. (2011). Multilocus sequence typing of pathogens. In *Genetics and Evolution of Infectious Disease* (pp. 503-521). Elsevier.
- Petruzzi, B., Dickerman, A., Lahmers, K., Scarratt, W. K., & Inzana, T. J. (2020). Polymicrobial biofilm interaction between *Histophilus somni* and *Pasteurella multocida*. *Frontiers in microbiology*, 11, 1561.
- Pond, E. D., El-Bailey, S., & Webster, D. (2015). An unusual case of meningitis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 26(3), e62-e64.
- Prajapati, A., Yogisharadhya, R., Mohanty, N. N., Mendem, S. K., Nizamuddin, A., Chanda, M. M., & Shivachandra, S. B. (2022). Comparative genome analysis of *Pasteurella multocida* serogroup B: 2 strains causing haemorrhagic septicaemia (HS) in bovines. *Gene*, 826, 146452.
- Puchalski, A., Dec, M., Wernicki, A., Urban-Chmiel, R., & Gieral, A. (2010). Characterization of outer membrane proteins participating in iron transport in *Pasteurella multocida* serotype A3. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(1), 121.
- Pullinger, G. D., Bevir, T., & Lax, A. J. (2004). The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Molecular microbiology*, 51(1), 255-269.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Fitzpatrick, E. S., Fanning, S., & Hartigan, P. J. (2011). *Pasteurella* species, *Mannheimia haemolytica* and *Bibersteinia trehalosi*. *Veterinary microbiology and microbial disease*, 300-308.
- Rajagopal, R., Nair, G. K., Mini, M., Joseph, L., Saseendranath, M. R., & John, K. (2013). Biofilm formation of *Pasteurella multocida* on bentonite clay. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(2), 120.
- Register, K.B., Brockmeier, S.L., de Jong, M.F., Pijoan, C., 2012. Pasteurellosis. In: Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G.W. (Eds.), *Diseases of Swine*, 10th ed. Wiley, Hoboken, NJ, pp. 798–910.
- Ribble, C. S., Jim, G. K., & Janzen, E. D. (1988). Efficacy of immunization of feedlot calves with a commercial *Haemophilus somnus* bacterin. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52(2), 191.
- Ryu, H. I., & Kim, C. J. (2000). Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide-protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. *Journal of Veterinary Science*, 1(2), 87-95
- Sakmanoğlu, A., Uslu, A., Sayin, Z., Karyeyen, Y., Gölen, G. S., Ilban, A., ... & Erganiş, O. (2021). Investigation of the nontypical *Pasteurella multocida*

- strains obtained from multiple sources, regions, and times: an unexpected increase was detected. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 45(5), 814-824.
- Scherrer, S., Frei, D., & Wittenbrink, M. M. (2016). A novel quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal swabs from swine. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58, 1-4.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., & Whittam, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and environmental microbiology*, 51(5), 873-884.
- Seo, J., Pyo, H., Lee, S., Lee, J., & Kim, T. (2009). Expression of 4 truncated fragments of *Pasteurella multocida* toxin and their immunogenicity. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73(3), 184.
- Sheppard, S. K., Colles, F., Richardson, J., Cody, A. J., Elson, R., Lawson, A., ... & McCarthy, N. D. (2010). Host association of *Campylobacter* genotypes transcends geographic variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5269-5277.
- Shewen PE and Conlon JAR (1993). *Pasteurella*. In: Gyles CL and Thoen CO (eds) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Ames, IA: Iowa State University Press, pp. 216– 225
- Singh, F., Sonawane, G. G., & Meena, R. K. (2018). Molecular detection of virulent *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in lung tissues of pneumonic sheep from semiarid tropics, Rajasthan, India. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 42(6), 556-561.
- Smith, E., Miller, E., Aguayo, J. M., Figueroa, C. F., Nezworski, J., Studniski, M., ... & Johnson, T. (2021). Genomic diversity and molecular epidemiology of *Pasteurella multocida*. *PLoS One*, 16(4), e0249138.
- Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 312-316.
- Srikumaran, S., Kelling, C. L., & Ambagala, A. (2007). Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Animal health research reviews*, 8(2), 215-229.
- Sthitmatee, N., Numees, S., Kawamoto, E., Sasaki, H., Yamashita, K., Takahashi, N., ... & Sawada, T. (2008). Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine*, 26(19), 2398-2407.
- Su, A., Tong, J., Fu, Y., Müller, S., Weldearegay, Y. B., Becher, P., ... & Herrler, G. (2020). Infection of bovine well-differentiated airway epithelial cells by *Pasteurella multocida*: actions and counteractions in the bacteria–host interactions. *Veterinary research*, 51, 1-11.
- Subaaharan, S., Blackall, L. L., & Blackall, P. J. (2010). Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Veterinary microbiology*, 141(3-4), 354-361.
- Svensson, C., Hultgren, J., & Oltenacu, P. A. (2006). Morbidity in 3–7-month-old dairy calves in south-western Sweden, and risk factors for diarrhoea and respiratory disease. *Preventive Veterinary Medicine*, 74(2-3), 162-179.

- Tatum, F. M., Yersin, A. G., & Briggs, R. E. (2005). Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* fhaB2 mutant in turkeys. *Microbial pathogenesis*, 39(1-2), 9-17.
- Tawab, A., Akbar, N., Hasssan, M., Habib, F., Ali, A., Rahman, M., ... & Iqbal, M. (2020). Mass spectrometric analysis of lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida*. *RSC advances*, 10(51), 30917-30933.
- Tel, O. Y., & Keskin, O. (2010). Koyun akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(1), 31-34.
- Tegtmeier, C., Uttenthal, A. A., Friis, N. F., Jensen, N. E., & Jensen, H. E. (1999). Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 46(10), 693-700.
- Tocqueville, V., Kempf, I., Paboeuf, F., & Marois-Créhan, C. (2017). Quantification of *Pasteurella multocida* in experimentally infected pigs using a real-time PCR assay. *Research in veterinary science*, 112, 177-184.
- Tolera, T., Wirtu, A., Kumsa, B., Zerabruk, E., Albene, Y., Tadesse, F., ... & Tolera, T. S. (2019). Identification of serotypes *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* from cattle and sheep in central Ethiopia. Research Square, DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.2.9508/v1>
- Tomich, M., Planet, P. J., & Figurski, D. H. (2007). The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 363-375.
- Tsuji, M., & Matsumoto, M. (1988). Evaluation of relationship among three purified antigens from *Pasteurella multocida* strain P-1059 and of their protective capacities in turkeys. *American journal of veterinary research*, 49(9), 1516-1521.
- Turni, C., Singh, R., & Blackall, P. J. (2018). Genotypic diversity of *Pasteurella multocida* isolates from pigs and poultry in Australia. *Australian veterinary journal*, 96(10), 390-394.
- Ugolini, M., Gerhard, J., Burkert, S., Jensen, K. J., Georg, P., Ebner, F., ... & Sander, L. E. (2018). Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses. *Nature immunology*, 19(4), 386-396.
- Ulker, H., Kucuk, D., Cantekin, Z., & Solmaz, H. (2012). Hatay yöresinde kesimhanede kesilen sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. *AVKAE Dergisi*, 2(2), 10-14.
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151-159.
- Van Donkersgoed, J. (1992). Meta-analysis of field trials of antimicrobial mass medication for prophylaxis of bovine respiratory disease in feedlot cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, 33(12), 786.
- Vanderkooi, O. G., Church, D. L., MacDonald, J., Zucol, F., & Kellner, J. D. (2011). Community-based outbreaks in vulnerable populations of invasive infections caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 5 and 8 in Calgary, Canada. *PloS one*, 6(12), e28547.
- Vasfi Marandi, M., & Mittal, K. R. (1997). Role of outer membrane protein H (OmpH)-and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in

- protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infection and immunity*, 65(11), 4502-4508.
- Virtala, A. M., Gröhn, Y. T., Mechor, G. D., & Erb, H. N. (1999). The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life. *Preventive veterinary medicine*, 39(1), 25-37.
- Wang, H., Xin, L., Wu, Y., Liu, Y., Yao, W., Zhang, H., ... & Zhu, L. (2023). Construction of a one-step multiplex real-time PCR assay for the detection of serogroups A, B, and E of *Pasteurella multocida* associated with bovine pasteurellosis. *Frontiers in Veterinary Science*, 10.
- Watt, J. M., Swiatlo, E., Wade, M. M., & Champlin, F. R. (2003). Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. *FEMS microbiology letters*, 225(1), 9-14.
- Weber, D. J., Wolfson, J. S., Swartz, M. N., & Hooper, D. C. (1984). *Pasteurella multocida* infections: report of 34 cases and review of the literature. *Medicine*, 63(3), 133-154.
- Welsh, R. D., Dye, L. B., Payton, M. E., & Confer, A. W. (2004). Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994–2002. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 16(5), 426-431.
- Wilkie, I. W., Harper, M., Boyce, J. D., & Adler, B. (2012). *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. *Pasteurella multocida: Molecular Biology, Toxins and Infection*, 1-22.
- Wilson, B. A., & Ho, M. (2012). *Pasteurella multocida* toxin interaction with host cells: entry and cellular effects. *Pasteurella multocida: Molecular Biology, Toxins and Infection*, 93-111.
- Wilson, B. A., & Ho, M. (2013). *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 631-655.
- Wisselink, H. J., Cornelissen, J. B., van der Wal, F. J., Kooi, E. A., Koene, M. G., Bossers, A., ... & Antonis, A. F. (2017). Evaluation of a multiplex real-time PCR for detection of four bacterial agents commonly associated with bovine respiratory disease in bronchoalveolar lavage fluid. *BMC veterinary research*, 13, 1-10.
- Wobeser, G. (1992). Avian cholera and waterfowl biology. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(4), 674-682.
- Wong, S. M., & Akerley, B. J. (2012). Genome-scale approaches to identify genes essential for *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 23.
- Woodrow, K. A., Bennett, K. M., & Lo, D. D. (2012). Mucosal vaccine design and delivery. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 17-46.
- Yates, W. D. (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 46(3), 225.

ÖZGEÇMİŞ

Aslı GÖNÜLKIRMAZ, ilkokul eğitimini Selimiye Köyü İlkokulu, orta ve lise eğitimini Alaşehir Şehitleri Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında Alaşehir Şehitleri Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2004 yılında başladığı Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2011 yılında bitirdi. 2015 yılında Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Fakülteden mezun olduktan sonra iki yıl kadar serbest klinik veteriner hekimliği yaptı. Daha sonra 2013 yılında Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesindeki Giresun'un Dereli İlçesi'nde veteriner hekim olarak çalışmaya başladı. Halen Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesindeki, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Bakteriyel Teşhis Laboratuvarı'nda veteriner hekim olarak görev yapmaktadır.