



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI

**KOYUN VE KEÇİLERDE AYAK ÇÜRÜĞÜ VAKALARINDAN
DICHELOBACTER NODOSUS İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Doktora Tezi

İlhan ŞAHİN

Danışman
Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

SAMSUN
2022

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



KOYUN VE KEÇİLERDE AYAK ÇÜRÜĞÜ VAKALARINDAN
DICHELOBACTER NODOSUS İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU

Doktora Tezi

İlhan ŞAHİN

Danışman
Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Bu çalışma PYO.VET.1904.20.009 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN
2022

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

20/04/2022
İlhan ŞAHİN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: KOYUN VE KEÇİLERDE AYAK ÇÜRÜĞÜ VAKALARINDAN *DICHELOBACTER NODOSUS* İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 15/03/2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı :% 9

Tek kaynak oranı :% 1 çıkmıştır.

20/04/2022
Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

ÖZET

KOYUN VE KEÇİLERDE AYAK ÇÜRÜĞÜ VAKALARINDAN *DICHELOBACTER NODOSUS* İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

İlhan ŞAHİN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı

Doktora, Nisan/2022

Danışman: Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Ayak çürüğü, koyun ve keçilerde anaerobik bir bakteri olan *Dichelobacter nodosus*'un neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Bu çalışma, Samsun İli ve çevresinde koyun ve keçilerdeki ayak çürüğü vakalarından aşı çalışmalarında kullanılmak üzere *D. nodosus*'un izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla Samsun İli'ne bağlı 5 ilçede 27 çiftlik örnekleme için ziyaret edildi. Ayak problemi olan toplam 84 koyun ve 4 keçinin interdigital bölgesinden ve özellikle lezyonlu kısımlarından svaplar alındı. Toplanan materyaller, %10 koyun kanlı Eugon agara ekildi ve anaerobik ortamda 37°C'de en az 4-7 gün inkübe edildi. İdentifikasyon amacıyla tipik *D. nodosus* kolonileri seçildi. Seçilen izolatların identifikasyonu, *D. nodosus*'a özgü 16S rRNA genini hedefleyen PCR ile gerçekleştirildi. PCR ile tür düzeyinde identifikasyon sonucunda 10 adet bakteri *D. nodosus* olarak tanımlandı. *D. nodosus* izolatları multipleks PCR yöntemi ile sero gruplandırıldı.

Yedi izolat sero grup D, iki izolat sero grup H olarak tanımlandı. Bir izolat sero gruplandırılmadı. *D. nodosus* izolatlarının virülensi, virülanta spesifik klon pV470-13 (Vf1/Vr1, Vf2/Vr2), benign spesifik klon pB645-335 (Bf/Br), *intA*, *aprV2/B2*, *aprV5/B5*, *bprV/B* genlerinin varlığı ile genotipik olarak belirlendi. PCR sonuçlarına göre dokuz izolatın *intA* genini içerdiği belirlendi. Aynı üç izolat *aprV2/B2*, *aprV5/B5*, *bprV/B* için pozitif sonuç verdi. Ayrıca, virulent spesifik klon pV470-13'te bulunan Vf1/Vr1 primerleri ile beş izolatın pozitif olduğu saptandı. İzolatların filogenetik yakınlıkları RAPD-PCR ile %70-91 olarak belirlendi.

Sonuç olarak Samsun'da footrot olgularından *D. nodosus* sero grup D ve H'nin baskın olduğu ve olası aşı çalışmalarında bu sero grupların hedeflenmesi gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Aşı, *Dichelobacter nodosus*, karakterizasyon, piyeten

ABSTRACT

THE ISOLATION AND CHARACTERISATION OF *DICHELOBACTER NODOSUS* FROM FOOTROT CASES

İlhan ŞAHİN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Microbiology

Doctorate, April/2022

Supervisor: Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Foot rot is a contagious disease of sheep and goats caused by the anaerobic bacterium *Dichelobacter nodosus*. This study has been conducted for the isolation and molecular characterization of *D. nodosus* to be used in the selection of vaccine strains from footrot cases of sheep in Samsun province.

For this purpose, 27 farms in 5 districts of Samsun were visited for sampling. Swabs were taken from the interdigital region and especially from the lesioned parts of a total of 84 sheep and 4 goats with foot problems. The collected materials were inoculated on eugon agar with 10% sheep blood and incubated in anaerobic jars at 37°C for at least 4-7 days. Typical *D. nodosus* colonies were selected for identification. Identification of selected isolates was carried out by identification of the *D. nodosus* specific 16S rRNA gene. The bacterium isolated from 10 samples as a result of the identification at the species level by PCR was defined as *D. nodosus*. *D. nodosus* isolates were serogrouped by multiplex PCR method. Seven isolates were defined as serogroup D, and two isolates as serogroup H. One isolate could not be serogrouped. The virulence of *D. nodosus* isolates was determined genotypically by the presence of the genes of virulent-specific clon pV470-13 (Vf1/Vr1, Vf2/Vr2), benign-specific clon pB645-335 (Bf/Br), *intA*, *aprV2/B2*, *aprV5/B5*, *bprV/B*. According to the PCR results for virulence determination, nine isolates contained *intA* gene. Same three isolates were positive for *aprV2/B2*, *aprV5/B5*, *bprV/B*. Also, five isolates were found as positive with the primers of Vf1/Vr1 found in virulent-specific clon pV470-13. The phylogenetic relations of the isolates were determined as 70-91% by RAPD-PCR.

In conclusion, it was determined that *D. nodosus* group D and group H from footrot cases were dominant in Samsun, and these serogroups should be targeted in possible vaccine studies.

Keywords: Characterization, *Dichelobacter nodosus*, Foot-rot, Vaccine

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, kıymetli bilgi ve deneyimlerinden faydalanarak bugünlere gelmemi sağlayan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ'ye şükranlarımı sunuyorum.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Timur GÜLHAN, Doç. Dr. Arzu FINDIK ve Prof. Dr. Oktay GENÇ'e, tez çalışmalarım süresince yardımları nedeniyle Araş. Gör. Merve Gizem SEZENER, Veteriner Hekim Volkan Enes ERGÜDEN ve Veteriner Hekim Şeyda YAMAN'a, annem Emine ŞAHİN, babam Adem ŞAHİN ile kardeşlerim Arş. Gör. Dr. Fatih ŞAHİN ve Sınıf Öğretmeni Saliha ÇELİK'e teşekkür ederim.

Bu çalışma PYO.VET.1904.20.009 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

İlhan ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ayağın Anatomisi	2
2.2. Footrot (Piyeten, Ayak Çürüğü)	3
2.2.1. Etiyoloji	4
2.2.2. Epidemiyoloji	10
2.2.3. Patogenez	12
2.2.4. Semptomlar	13
2.2.5. Teşhis	16
2.2.6. Tedavi	24
2.2.7. Koruma ve Kontrol	25
2.2.8. Eradikasyon	29
3. MATERYAL ve METOT	31
3.1. Bakteriyolojik örnekleme	31
3.2. Lezyon Skorlaması	32
3.3. <i>D. nodosus</i> İzolasyonu	32
3.4. <i>D. nodosus</i> İdentifikasyonu	33
3.5. <i>D. nodosus</i> İzolatlarının Serogruplandırılması	34
3.6. İzolatların Virülensinin PCR ile Belirlenmesi	35
3.7. İzolatların Genotiplendirilmesi	37
4. BULGULAR	39
4.1. Bakteriyolojik Örnekleme ve Lezyon Skorlaması	39
4.2. <i>D. nodosus</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	41
4.3. <i>D. nodosus</i> İzolatlarının Serogruplandırılması	42
4.4. İzolatların Virülensinin PCR ile Belirlenmesi	42
4.5. İzolatların Genotiplendirilmesi	45
4.6. Bulguların Toplu Değerlendirmesi	46
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61
ÖZ GEÇMİŞ	73

SİMGELER KISALTMALAR

AprB2	: asidik proteaz izoenzim B2
<i>aprB2</i>	: asidik proteaz izoenzim B2 alleli
AprB5	: asidik proteaz izoenzim B5
<i>aprB5</i>	: asidik proteaz izoenzim B5 alleli
AprV2	: asidik proteaz izoenzim V2
<i>aprV2</i>	: asidik proteaz izoenzim V2 alleli
AprV5	: asidik proteaz izoenzim V5
<i>aprV5</i>	: asidik proteaz izoenzim V5 alleli
BprB	: asidik proteaz izoenzim B
<i>bprB</i>	: asidik proteaz B izoenzim alleli
BprV	: asidik proteaz izoenzim V
<i>bprV</i>	: asidik proteaz izoenzim V alleli
CODD	: contagious ovine digital dermatitis
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
EU	: Eugon agar
<i>fimA</i>	: Fimbrial alt ünite geni
FimA	: Fimbrial alt ünite proteini
glpA	: global reseptör protein A
HA	: Hoof agar
ID	: İnterdigital dermatitis
MHC	: Major Histocompatibility Complex
OID	: Ovine interdigital dermatitis
OLA	: Koyun lenfosit antijeni
OMP	: Dış membran proteini
ORF	: Açık okuma penceresi
RTX	: Repeat toksin benzeri protein
<i>Rtx</i>	: Repeat toksin geni
TAS	: Triptikaz Arjinin Serin
Vap	: Virulens-ilişkili protein
<i>Vrl</i>	: Virulens-ilişkili lokus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Çift tırnaklı hayvanlarda tırnak bölümleri	2
Şekil 2.2. At tırnağının yapısı	3
Şekil 2.3. <i>D. nodosus</i> 'un Clas I ve Clas II suşlarının fimbrial gen bölgelerinin genetik organizasyonunun şematik gösterimi	8
Şekil 2.4. Tip IV fimbrial sisteme katılan genlerin bazılarının genomik lokasyonu	9
Şekil 2.5. Footrot nedenli ayak lezyonlarında skorlama	15
Şekil 2.6. Örnek toplama işlemlerinin özeti	17
Şekil 2.7. Pozitif ve negatif elastaz testi	22
Şekil 2.8. Pozitif ve negatif jelatin testi	23
Şekil 3.1. Bakteriyolojik örnekleme yapılan işletmelerin coğrafi dağılımı	32
Şekil 3.2. <i>Dichelobacter nodosus</i> izolatının Kanlı eugon agara ekimi	33
Şekil 4.1. <i>D. nodosus</i> spesifik PCR görüntüsü	42
Şekil 4.2. <i>D. nodosus</i> serogruplandırması için yapılan multipleks PCR görüntüsü	42
Şekil 4.3. <i>D. nodosus</i> virülensinin belirlenmesi için yapılan PCR görüntüsü	43
Şekil 4.4. <i>D. nodosus aprV2/B2</i> gen varlığının PCR görüntüsü	43
Şekil 4.5. <i>D. nodosus aprV5/B5</i> gen varlığının PCR görüntüsü	44
Şekil 4.6. <i>D. nodosus bprV/B</i> gen varlığının PCR görüntüsü	44
Şekil 4.7. <i>D. nodosus</i> virülensinin belirlenmesi için V1 primeri ile yapılan PCR görüntüsü	45
Şekil 4.8. <i>D. nodosus</i> izolatlarının RAPD- PCR görüntüsü	45
Şekil 4.9. <i>D. nodosus</i> izolatlarının filogenetik analizi	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>Dichelobacter nodosus</i> ve <i>Fusobacterium necrophorum</i> arasındaki ayrım	5
Tablo 3.1. Bakteriyolojik örnekleme yapılan işletmeler ait bilgiler	31
Tablo 3.2. Ayak çürüğü skorlama sistemi	32
Tablo 3.3. Kanlı Eugon Agar içeriği	33
Tablo 3.4. Serogruplandırma için kullanılan oligonükleotid primerler ve beklenen bant büyüklükleri	35
Tablo 3.5. <i>D. nodosus</i> izolatlarının virülensinin belirlenmesi için kullanılan oligonükleotid primerler ve beklenen bant büyüklükleri	36
Tablo 4.1. Bakteriyolojik örnekleme yapılan işletmeler ve lezyon skorlama sonuçları	39
Tablo 4.2. Çalışma sonucunda elde edilen bulguların toplu sunumu	46



1. GİRİŞ

Ayak çürüğü (Footrot, piyeten) küçük ruminantların ayaklarını etkileyen ve dünya çapında koyunculuk sektörü için önemli bir sorun teşkil eden bulaşıcı bir hastalıktır (Wani and Samanta, 2006). Footrot koyun ve keçilerde hem hayvan refahını hem de verimi etkilemektedir (Albinsson, 2021). Birleşik Krallık'ta tedavi ve verim kayıpları ile ilişkili olarak hastalığın koyunculuk sektörüne yıllık maliyetinin yaklaşık 24-80 milyon sterlin olduğu bildirilmektedir (Wassink et al., 2010). Avustralya'daki yıllık kayıp ise 18,4 milyon doları bulmaktadır (Dhungyel et al., 2014). Almanya, İsviçre ve Avusturya'da footrot'un koyun başına yıllık maliyetinin 9,25 sterlin olduğu tahmin edilmektedir (Friedrich et al., 2012). Hastalık dünya çapında dağılım göstermesine rağmen özellikle Avustralya ve Yeni Zelanda gibi bol yağışlı ılıman ve sıcak iklimlere sahip olan ülkelerdeki koyun yetiştiriciliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Hastalığın tedavi ve kontrol maliyetlerinin artmasına ek olarak yapağı gelişimi ve vücut ağırlığında %10 kayıplara neden olduğu belirlenmiştir (Glynn, 1993). İngiltere'de yapılan bir anket çalışmasında koyun yetiştiricilerine Mayıs-2012 ve Nisan-2013 arası dönemi kapsayan sorular sorulmuş ve çiftliklerin %90,5'inde mevcut olan interdigital dermatitis çiftlik bazında en yaygın ayak lezyonu iken çiftliklerin %81,6'sında ise şiddetli ayak çürüğü tespit edilmiştir (Winter et al., 2015). İngiltere'de koyun topallıklarının yaklaşık %70'i ayak çürüğü kaynaklıdır (Clifton and Green, 2016). Ülkemizde de yaygın olarak görülen bu hastalığın ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir. Yeme erişimin zorlaşması ve yem tüketiminin azalmasına bağlı olarak ekonomileri olumsuz etkilemesi dolayısıyla dikkate alınması gereken bir hastalıktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ayağın Anatomisi

Bacağın articulatio metacarpo-metatarso phalangea (topuk eklemi) aşağısında kalan kısma “ayak” denir (Koç ve Alkan, 1994). Ayağın önemli unsurlarından biri olan tırnak çift tırnaklı hayvanlarda “ungule” olarak isimlendirilir ve kökeni farklı iki bölümden oluşur: derinin epidermis katmanından gelişen kapsula ungule ve derinin dermis katmanından gelişen koryum ungule (Tanyolaç, 1993). Kapsula ungule ve koryum ungule’de ayrıca anatomik olarak kısımlandırılır. Koryum ungule kapsula ungule’nin gelişmesini ve tırnağın uzamasını sağlayan elastik iplikler, damar ve sinirlerden zengin bir bölgedir. Kapsula ungule ise onu bir ayakkabı gibi sarıp dış etkilerden koruma görevini yapar. Bu iki tabaka çok sıkı bir şekilde birbirine geçmiştir ve ancak bazı hastalık olgularında ayrılırlar (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2) (Taşbaş, 1996).



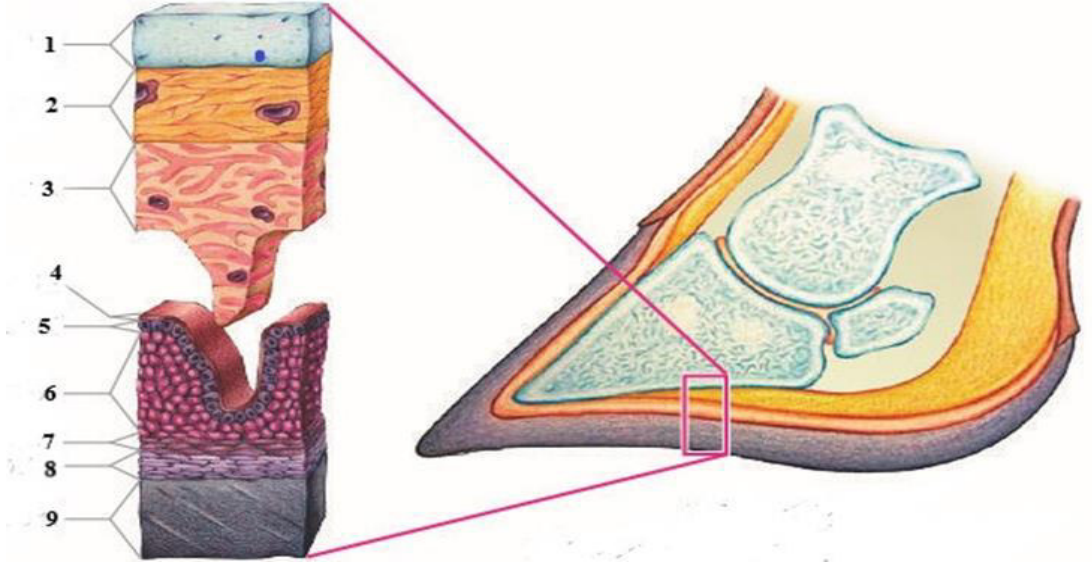
(a)

(b)

Şekil 2.1. Çift tırnaklı hayvanlarda tırnak bölümleri (Konig and Liebich, 2007) (a) Kapsula ungule (b) Koryum ungule

Ruminantlarda kapsula ungule ve koryum ungule tek tırnaklılardaki gibidir (Dursun, 2008).

Tırnağı oluşturan tabakalar aynen deride olduğu gibidir. Tırnağın üst yüzünde yer alan stratum corneum boynuzlaşmış ve nukleusları olmayan hücrelerden oluşmuştur. Bunun altında ve koryum’un üzerinde stratum germinativum (matriks) yer alır. Matriks stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum lucidum olmak üzere 4 tabakadan oluşur (Taşbaş, 1996).



Şekil 2.2. At tırnağının yapısı (Wendy, 2016'dan uyarlanmıştır). 1: Kemik; 2: Parmak Yastığı; 3. Corium (Derma); 4: Bazal membran; 5: Stratum bazale; 6: Stratum spinosum; 7: Stratum granulosum; 8: Stratum lucidum; 9: Stratum corneum

2.2. Footrot (Piyeten, Ayak Çürüğü)

Footrot, ilk defa on sekizinci yüzyılın sonlarında Fransa'da bildirilen bir hastalıktır (Delafond, 1838). Hastalık özellikle koyun keçilerin ekonomik olarak önemli ve bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık tırnak matriksinin ve tırnak arası derisinin nekrozunu takip eden eksudatif bir yangı ile karakterizedir. Bunun sonucunda tabandaki yumuşak doku toynaktan ayrılır. Etkilenen hayvanlarda topallık, vücut kondüsyon kayıpları, yün ve et üretiminde azalma ve fertilitede düşüş görülür (La Fontaine et al., 1993). Beveridge 1941'de ayak çürüğüne neden olan etkeni *Dichelobacter nodosus* olarak tanımlamıştır. Deneysel çalışmalar sayesinde ayak çürüğünün meydana gelmesi için sadece *D. nodosus*'un yeterli olduğu sonucuna varılmasına rağmen *Fusobacterium necrophorum* ve *Spirochaetes*'lerin dâhil olduğu diğer bakteri türleri mevcut olduğu zaman hastalık daha şiddetli seyretmektedir (Clifton and Green, 2016). Daha sonraki patogeneze çalışmaları interdigital dermatitis'in etkeninin *F. necrophorum* olduğunu bildirmiştir. *D. nodosus*'un kolonize olabilmesi için öncesinde *F. necrophorum*'un mevcut olması gerekliliği bildirilmektedir (Roberts and Egerton, 1969).

Hastalık dünya çapında dağılım göstermesine rağmen özellikle Avustralya ve Yeni Zelanda gibi bol yağışlı ılıman ve sıcak iklimlere sahip olan ülkelerdeki koyun yetiştiriciliğini önemli ölçüde etkilemektedir (Stewart, 1989). Hastalığın tedavi ve kontrol maliyetlerinin artmasına ek olarak yapağı gelişimi ve vücut ağırlığında %10

kayıplara neden olduğu belirlenmiştir (Glynn, 1993). Avustralya’da üretimin azalması, tedavilerin zaman alması ve hastalığın kontrol ve eradikasyonu için yapılan yönetim masrafları yüzünden footrot’un sadece yün endüstrisine yıllık maliyetinin 20 milyon Avustralya doları olduğu bildirilmektedir (Barton, 1986).

Koyun sürülerinde ayak çürüğünün ortaya çıkması konağa, çevreye ve mikroorganizmalara ilişkin faktörler ile ilişkilendirilmektedir (Egerton and Raadsma, 1991). Ayak çürüğü koyun ve keçilere özgü bulaşıcı bir hastalık olmasına rağmen sığır, at, domuz ve geyiklerde de rapor edilmiştir (Ghimire et al., 2002).

Ayak çürüğü ve interdigital dermatitisde herhangi bir klinik belirti olmaksızın koyunlarda virulent *D. nodosus* identifiye edilmesi yüzünden, virulent *D. nodosus* suşlarının varlığı ile klinik görünümün her zaman uyumlu olmadığı bildirilmiştir (Moore et al., 2005; Stäuble et al., 2014). Koyun tırnak arası derisinde *F. necrophorum*, *Treponema* türleri ve bazı diğer bakteri cinsleri izole edilmiştir (Bennet et al., 2009; Calvo-Bado et al., 2011; Frosth et al., 2015). Lezyonların başlangıç döneminde deri boynuz tırnak ayırım noktasında *F. necrophorum* baskın ve genellikle tek istilacıdır. *F. necrophorum*’un bu hastalık üzerindeki rolü üzerine güncel 2 hipotez vardır (Witcomb et al., 2015):

- (1) *F. necrophorum*’un *D. nodosus* enfeksiyonu öncesinde interdigital dermatitis şekillenmesinde önemli olduğu ve bu yüzden hastalığın başladığı,
- (2) İkincil bir patojen olarak fırsatçı bir rol oynadığı ve ayak çürüğü lezyonlarının şiddetine ve sürekliliğine neden olduğu.

2.2.1. Etiyoloji

Ayak çürüğüne neden olan mikroorganizma ilk defa 1938 yılında izole edilmiş ve bu organizmanın saf kültürleri ile deneysel hastalık oluşturulmuştur. Başlangıçta organizmanın *Bacterioides* cinsine ait olduğu düşünülmüştür (Beveridge, 1938). İlk zamanlarda *Bacterioides nodosus* ve *Fusififormis nodosus* olarak bilinen *D. nodosus* 1941 yılında Beveridge tarafından ayak çürüğü vakalarından birincil patojen olarak identifiye edilmiştir (Beveridge, 1941).

D. nodosus Cardiobacteriaceae familyası (Cardiobacteriales, Gammaproteobacteria) içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu familya ayrıca aerobik olan *Cardiobacterium* ve *Suttonella* cinslerini içerir. 16S rRNA gen dizilimi ailenin üç üyesi arasında %93 benzerlik olduğunu göstermiştir. Gram negatif, büyük düz veya kavisli çomaklar şeklindedirler. 1.0-1.7 µm çapında ve 3-6 µm uzunluktadır. Uçları

çoğunlukla şişkin ve son kısımları yuvarlak görünümündür. *D. nodosus* zorunlu anaerop (obligat/strict anaerop) bir bakteridir. Sporsuz ve kapsülsüzdür (Tablo 2.1) (Cooper, 1977). Sahip olduğu proteazlar ve keratinazlar sayesinde koyun tırnağını ayrıştırabilir. Bu enzimler *D. nodosus*'un patobiyolojisinde önemli rol oynarlar. Virüent suşların tespit edilmesi amacıyla bugün hala kullanılırlar ve ayak çürüğünün tanımlanmasında önemli role sahiptirler (Thomas, 1958). *D. nodosus* nazlı ve yavaş üreyen bir bakteri türüdür. Bu yüzden bu bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu zahmetli ve zaman alıcıdır (Gradin and Schmitz, 1977; Langworth, 1977).

Tablo 2.1. *Dichelobacter nodosus* ve *Fusobacterium necrophorum* arasındaki ayırım* (Petrov and Dicks 2013'den uyarlanmıştır)

Karakteristik özellikler	<i>D. nodosus</i>	<i>F. necrophorum</i>
Hücre uzunluğu	3.0-6.0 µm	3.0-70.0 µm
Hücre genişliği	1.0-1.7 µm	0.5-0.6 µm
Pilus	tip IV fimbria	uzun filamentler
Geri çekilme hareketi	+	-
Fosfataz aktivitesi	zayıf	+
DNase aktivitesi	-	+
Lizin degradingasyon	-	+
Lipaz üretimi	-	+
İndol üretimi	-	+
Jelatinde proteolitik aktivite	+	-
Kazeinde proteolitik aktivite	-	-/zayıf
Hemoliz	-	+
Karbonhidratlardan gaz üretimi	-	+
Karbonhidratlardan asit üretimi	-	- (glikozdan butirik asit)
G+C içeriği (%)	44.4	29-31

*Her iki türde de suşlar Gram negatif sporsuz çomaklardır. Uçları yuvarlak şekillidir. Katalaz negatif ve kapsülsüzdür, anaerobik koşullarda ürerler. H₂S ve ekstrasellüler proteazlar üretirler. Nitrat'ı indirgeyemezler, üreaz üretmezler, nişasta ve eskülin'i hidrolize etmezler

Koyunda MHC sınıf II gen bölgesindeki allel genler (bir karakter üzerinde aynı ya da farklı yönde etkili olan iki veya daha fazla genlerden her biri) sayesinde footrot'a karşı doğal direncin kalıtsal genetik faktörler yoluyla oluştuğu bildirilmektedir (Escayg et al., 1997). SY6 ve SY1b moleküllerini içeren sınıf I koyun lenfosit antijenleri (OLA) aşılama sonrası antikor cevabı geliştirerek hastalığa karşı direnç oluşumuna katkıda bulunur. Ancak enfekte olmuş veya aşılanmış koyunlarda uzun dönem süren bir bağışıklık şekillenmez ve yeniden enfeksiyon oluşabilir (Buller and Eamens, 2014).

D. nodosus çok sayıda pilusa sahiptir. Pilus sayısına göre koloni morfolojisi değişkenlik gösterir (Dewhirst et al., 1990). Fimbria antijenleri esas alınarak *D.*

D. nodosus suşları 10 serogrup (A-I, M) ve 18 serotip olarak klasifiye edilmiştir. Klasifikasyonun temeli olmasının yanı sıra tip IV fimbria oldukça immunojeniktir ve virülens faktörü olarak bilinir. Tip IV fimbria *D. nodosus*'un konak hücreye yapışmasında rol oynar ve tipik kayma hareketine (twitching motility) neden olur (Kennan et al., 2001). *D. nodosus* izolatlarının virülensi, fimbria ile ilişkili motilitesi ve/veya proteazlarının aktif ve dayanıklı olması test edilerek ölçülebilir (Stewart et al., 1986). Ayrıca *intA* geni ve *vrl* geni gibi virülensle ilişkili genetik elementlerin belirlenmesine yönelik virülens testleri geliştirilmiştir (Cheetham et al., 2006).

D. nodosus'un virulent suşu olan VSC1703A'nın tüm genom dizilimi yapılarak genomun 14 Mbp boyutunda ve 1299 putative (varsayılan) gene sahip olduğu tespit edilmiştir. Fimbria oluşumunu kodlayan yirmi bir putative gen ve regülasyonda yer alan 10 gen genom dizisinde tanımlanmıştır (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4) (Myers et al., 2007).

D. nodosus'un fimbriası *fimA* geni tarafından kodlanan tek bir alt ünite pilin (fimbria proteini) polimerlerinden oluşan uzun proteinli bir eklentidir (Stephen et al., 1996). FimA proteini içindeki yapısal varyasyona ve fimbrial gen bölgesinin genetik organizasyonuna göre *D. nodosus* izolatları Sınıf I (A set *fimA*) ve Sınıf II (D set *fimA*) olmak üzere 2 sınıfa ayrılmıştır (Mattick et al., 1991). Sınıf I izolatlar A, B, C, E, F, G ve I serogruplarını kapsarken, sınıf II izolatlar D ve H serogruplarını kapsamaktadır (Elleman, 1988). Bakteriyel fimbria, morfolojik ve hemaglutinasyon özelliklerine göre 5 tipte (I-V) sınıflandırılmaktadır. *D. nodosus*'un fimbriası tip IV karakterindedir (Strom and Lory, 1993). Tip IV fimbrialar birçok önemli patojende mevcuttur. Tip IV fimbria aşırı ince, peritrik şekilde düzenlenmiştir. Mannoz dirençli (MR) hemaglutinasyon ve hücreler üzerine adezyon özellikleri gösterir. *D. nodosus*'da doğal transformasyon, adezyon, twitching hareketi ve proteaz sekresyonu gibi virülens özellikleri için gereklidirler (Kennan et al., 2001; Parker et al., 2006). Tip IV fimbriaların biyogenez genleri genom boyunca 8 bölgede dağılmıştır. Genom 21 putative biyogenez geni ve 10 regülatör gen içerir. Kayıp genlerin çoğu regülasyona dâhil edilir. Putative tip adhesin (*pilC*) ve sekretin (*pilQ*) genlerine ilave olarak potansiyeli dahilinde kayma hareketine karışan genler (*pilT*, *pilU*) ile onların regülasyon genleri (*chpA*, *pilJ*, *pilI*, *pilG*, *pilH*, *ppk*, *fimX*) identifiye edilmiştir (Myers et al., 2007). *D. nodosus*'un A-I, M olmak üzere 10 serogrubu ve 19 serotipi vardır (Chetwin et al., 1991).

D. nodosus suşları, ayak çürüğü hastalığında görülen doku hasarından sorumlu olan ve birbiri ile yakın ilişkili olduğu varsayılan 3 adet serin proteazı salgılar. *D. nodosus* proteazları tümüyle subtilisin benzeri proteazlar (subtilaz)'dır ve bu süper familyanın B alt familyasında klasifiye edilirler (Siezen and Leunissen, 1997). *D. nodosus*'un virulent suşlarının subtilisin benzeri ekstrasellüler proteazları: Asidik proteaz izoenzim 2 (AprV2), asidik proteaz izoenzim 5 (AprV5) ve bazik proteaz (BprV) olarak isimlendirilir. Bu proteazlar sırasıyla *aprV2*, *aprV5* ve *bprV* genleri tarafından kodlanır (Billington et al., 1996). Benign suşlar, BprB2, BprB5 ve BprB analog proteazlarını salgılar ve bunlar da sırasıyla *aprB2*, *aprB5* ve *bprB* genleri tarafından kodlanır (Billington et al., 1996; Kortt and Stewert, 1994). *D. nodosus*'un virulent bir suşunda (VSC17003A) ekstrasellüler proteaz aktivitesinin çoğundan AprV5'in sorumlu olmasına rağmen, ekstrasellüler elastaz aktivitesinin çoğundan ise AprV2'nin sorumlu olduğu ve virulens için zorunlu olduğu bildirilmiştir (Kennan et al., 2010). Virulent suşların sahip olduğu *aprV2* geni termostabil proteazı kodlarken, benign suşların sahip olduğu *aprB2* geni ise termolabil proteazı kodlamaktadır (Stauble et al., 2014). AprV2, benzeri olan AprB2'den sadece bir amino asit değişimi ile (Tyr92Arg) ayrılır. Genetik düzeyde bu farklılık *aprV2* ve *aprB2* genleri arasında 2 baz çiftinin değişimi ile olur (Riffkin et al., 1995).

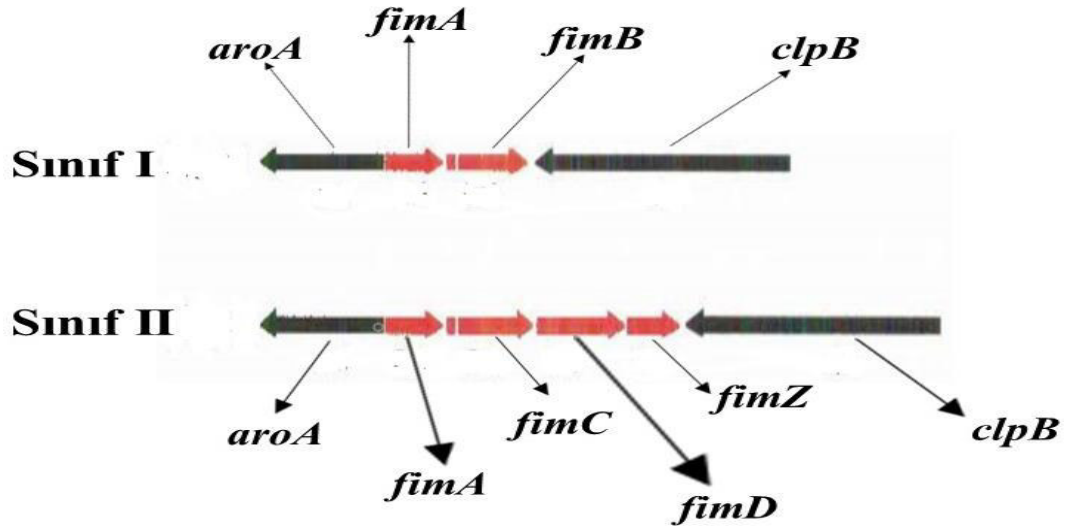
D. nodosus'un tüm genom diziliminde putative bir *rtx* geni tanımlanmıştır. Bu gen, Gram negatif bakterilerde önemli bir virülens faktörü olan RTX proteinini kodlamaktadır. RTX proteinleri büyük porlar şekillendirmek suretiyle konak hücrelerine zarar verir ve savunma mekanizmalarını bozar (Myers et al., 2007). *D. nodosus*'un RTX toksini, fimbrial ürün olan PilR/S (bu iki bileşenli uyarım transdüksiyon sistemi üzerinedir) ve alternatif bir sigma faktörü ($\sigma 54$) tarafından oluşturulmaktadır (Parker et al., 2006). Gram negatif bakterilerin çoğu RTX proteini sentezler. Bu proteini kodlayan gen genomda çoklu ardışık tekrarlar gösterir ve değişkenlik gösteren bir dizi olarak ortaya çıkar. RTX benzeri toksinin virülensle ilişkisi olabileceği bildirilmiştir (Myers et al., 2007).

D. nodosus'un dış membran proteini yapısal olarak farklı fakat bağlı 4 gen (*omp1A,B,C,D*) tarafından kodlanır (Moses et al., 1995). *D. nodosus*'un majör dış membran proteini olan Omp1 bölgesi değişkendir ve yakın ilişkili olan kümelenmiş 4 gen arasındaki yerleşiminde farklılıklar meydana gelmektedir (Myers et al., 2007). Omp1 koyunlarda enfeksiyon esnasında güçlü bir antikör cevabına neden olur (Moses et al., 1995). Genomun Omp1 bölgesi majör dış membran proteininin dört farklı

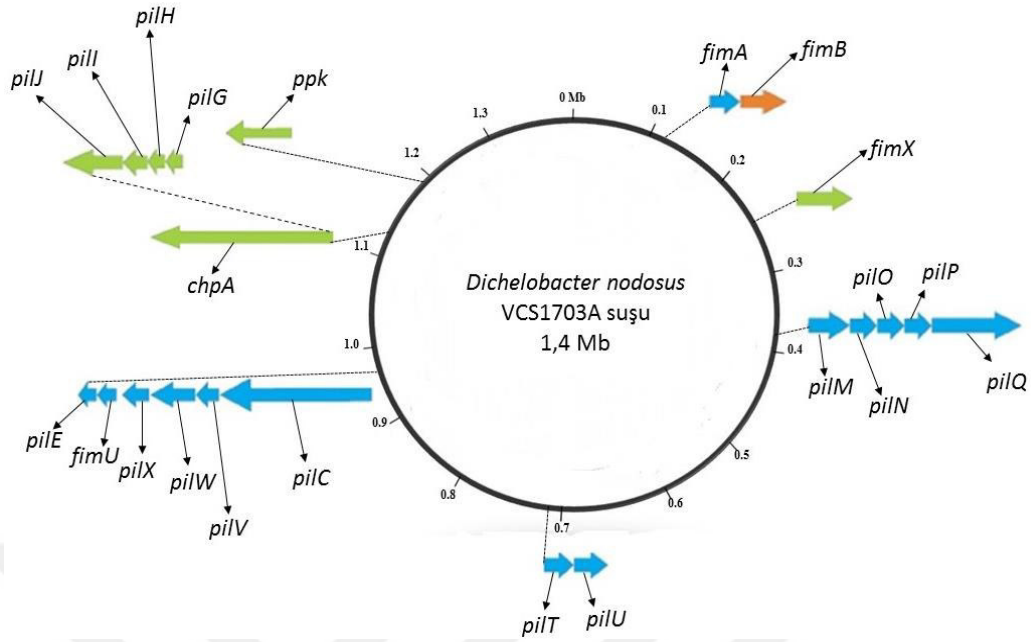
formunu (DNO_0382 ile DNO0_0385 arası) kodlayan dört ilişkili gen içerir. Bir diğer atipik nükleotid bileşim bölgesi (*pgr* geni) ise dokuz aminoasitlik tekrarlayan birimlerden oluşan ve virülens ile ilişkilendirilen bir proteini (DNO_0690) kodlar (Kennan et al., 2014).

DNO_0690 geni de *D. nodosus*'un virulensi ile ilişkilendirilmiştir. *DNO_0690* geni tekrarlayan 9 aminoasite sahip 32 aminoasitlik büyük bir salgısal proteini kodlar ve konak hücreye adezyonda rol oynadığı varsayılmaktadır (Myers et al., 2007).

D. nodosus'un virulent izolatları virulensle ilişkili *vap* (virulence-associated protein) ve *vrl* (virulence-related locus) olmak üzere iki gen bölgesi içermektedir (Myers et al., 2007; Rood, 2002). *D. nodosus* genomunun *vap* bölgeleri, genetik bir element olan *intA* (integra A) elementinin bir tRNA genine entegrasyonu ile ortaya çıkmıştır (Rood et al., 1996). Entegrasyon genleri bu *vap* bölgelerine komşu olarak bulunur ve bu bölgelerin ayrıntılı analizi *intA*, *intB*, *intC* ve *intD* elementleri olarak adlandırılmasına yol açmıştır (Bloomfield et al., 1997; Cheetham et al., 1995). *intA* isimlendirmesi virulensle ilgili bu protein (*vap*) için kullanılmıştır (Whittle et al., 1999). *D. nodosus*'un en iyi bilinen mobil elementleri *vrl* ve *intA*'dır (Rood et al., 1996). Hem *intA*, hem de *vrl*'nin *D. nodosus*'un potansiyel global genetik düzenleyicileri yakınında yerleştiği için virülens regülasyonunu etkileyebileceğini düşünülmektedir (Myers et al., 2007).



Şekil 2.3. *D. nodosus*'un Clas I ve Clas II suşlarının fimbrial gen bölgelerinin genetik organizasyonunun şematik gösterimi (Hobbs et al., 1991'den uyarlanmıştır)



Şekil 2.4. Tip IV fimbrial sisteme katılan genlerin bazılarının genomik lokasyonu (Kennan et al., 2011'den uyarlanmıştır)

D. nodosus'un virulent ve benign suşlarından hazırlanan genomik DNA'yı taramak için bu gen bölgelerini içeren plazmidler prob olarak kullanılmaktadır. Bu gen bölgelerinin fragmanlarını içeren plazmidler, virulent ve benign *D. nodosus*'un saha suşlarından hazırlanan genomik DNA'yı taramak için prob olarak kullanılmaktadır. Bu plazmidlerden üçü, pJIR313 ve pJIR314B (vrl bölgesinin parçalarını sunar) ve pJIR318 (vap bölgesini sunar) virulent suşlar ile ilişkili olarak bildirilmiştir (Mc Pherson, 2018).

Sirküler kromozoma sahip olan, hem virulent olan hem de doğal olarak şekil değiştirebilen *D. nodosus* VSC1703A suşu kullanılarak yapılan genom sekans analizi sonucunda tip IV fimbrial biyogenez genlerinin genom boyunca sekiz bölgeye dağıldığı belirlenmiştir. Genomun 21 fimbrial biyogenez geni ve 10 regülatör gen içerdiği bildirilmiştir (Myers et al., 2007).

Adezin (*pil C*) ve sekretin (*pil Q*) genleri olarak kabul edilen genlere ilave olarak kısmen kayma hareketine (twitching motility) katılan genler (*pilT*, *pilU*) ile onların regülasyon genleri (*chpA*, *pilJ*, *pilI*, *pilG*, *pilH*, *ppk*, *fimX*) tanımlanmıştır (Myers et al., 2007). Han et al. (2008) *pilU* mutantlarının hücre dışı proteaz salgılaması ve adezyon özelliğine doğal suş seviyelerinde sahip olduğunu fakat *pilT* mutantlarının epitel hücrelere bağlanmada ve proteaz salgılanmasında azalma gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bazı genler kromozom boyunca (*fimX*, *ppk*) dağılmıştır (Kennan et al., 2011). Bazıları ise genomda birkaç farklı lokus içerisinde yer alabilir (Myers et al., 2007). Gen lokuslarına örnek olarak; *pilMNOPQ* lokusu ve *pilT-pilU* lokusu (Han et al., 2008), *pilCVWXfimUpilE* lokusu (Han et al., 2007), *chpApilGHIJ* lokusu (Bertrand et al., 2010) gösterilebilir.

VSC1703A suşunda değişkenlik gösteren bölgelerin en büyüğü Mu-benzeri bakteriyofaja birleşmiş olduğu görülen 38.4-kb'lık bölgedir (Myers et al., 2007). Bu bölge muhtemelen lateral gen transferi ile kazanılmıştır (Frosth, 2016). Mu benzeri bakteriyofaj önceden bir başka izolatta *DinoH1* olarak adlandırılmıştır (Cheetham et al., 2008).

Genomdaki *vrl* ve *vap* bölgeleri virüslensle ilişkilendirilen bölgelerdir (Rood, 2002). VCS1703A suşunun *vrl* bölgesi, A198 suşunun 27 kb'lık *vrl* bölgesinden farklı olan yalnızca 3 bp'ye sahiptir (Billington et al., 1996). *D. nodosus*'un bir çok suşunda genomun sekiz değişken bölgesinin ikisinde *vap* bölgelerinin çoklu kopyaları bulunmuştur (Myers et al., 2007). Bu *vap* bölgeleri *tRNA* genine/genlerine bakteriyofaj veya plazmid eklenmesiyle ortaya çıkmıştır ve bu bölgelerin genomik adalar olarak adlandırılmasına neden olur (Rood, 2002). Genomda *vap* bölgelerine bitişik integrasyon genleri bulunması sebebiyle ilerleyen araştırmalarda *vap* bölgeleri *intA*, *intB*, *intC* ve *intD* elementleri olarak adlandırılmıştır (Bloomfield et al., 1997; Cheetham et al., 1995).

Bir diğer değişken bölge tipI restriksiyon ve modifikasyon sistemini kodlayan gen bölgesidir ve bu bölge yakın ilişkili *hsdR*, *hsdM*, *hsdS* genlerinden oluşur (Murray, 2000). Sekanslanmış *D. nodosus* suşlarının %95 inde her üç gen de vardır. Suşlar arasında major varyasyon sadece *hsdS* geninde gözlemlenmiştir (Kennan et al., 2014).

2.2.2. Epidemiyoloji

Ayak çürüğü mortalitesi düşük, morbiditesi yüksek bir hastalıktır (Hall et al., 2011). Hastalıktan etkilenen hayvanların aktif lezyonları ile kontamine olan toprak vasıtasıyla koyunlar enfektif mikroorganizmaya maruz kalmaktadır (Roberts and Egerton, 1969). Ayrıca, dışkıyla bulaşık çevreden enfeksiyonu alan hayvanlar sağlıklı hayvanlara hastalığı bulaştırır (Whittington and Nicholls, 1995). *D. nodosus* sadece hayvanların hastalıklı ayaklarında yaşar ve dışkıda, toprakta veya merada ise 7 ila 14 gün süre ile canlı kalır (Stewart and Claxton, 1993).

Çiftliklerin alçakta olması, barınaklarda hayvanların sıkışık olarak yetiştirilmesi, kış mevsimine bağlı hava şartları, rutin tırnak düzeltmeleri, yetersiz tedaviler ve hasta hayvanlar izole edilirken yapılan hatalar ayak çürüğünün oluşumu ile ilgili risk faktörleridir (Wassink et al., 2010).

Hastalık en çok Avustralya ve Yeni Zelanda olmak üzere Britanya, Brezilya, Kanada, Danimarka, Fransa, Almanya, Hollanda, Hindistan, Malezya, Nepal, Portekiz, İspanya, İsviçre, Amerika Birleşik Devletleri, İsveç ve Norveç'i kapsayan birçok ülkede bildirilmiştir (Buller and Eamens, 2014).

Bir sürüde ayak çürüğünün ortaya çıkmasına bakterinin virülensi, çevre koşulları ve konağın kalıtsal duyarlılığı olmak üzere 3 faktör neden olmaktadır (Egerton and Raadsma, 1991). *D. nodosus*'un virülent, benign ve intermedier suşları farklı şiddet derecesinde hastalık tablosu oluşturmaktadır (Raadsma and Egerton, 2013). Çevresel faktörler footrot'un klinik görünümünü ve bulaşmasını etkiler. Yıl boyu görülebilmesine rağmen genelde ortam ısısı 10°C'nin üzerinde iken ve yeterli nem olduğu zaman, erken yaz ve geç ilkbahar dönemlerinde yüksek bulaşıcılık gösterir. *D. nodosus* nemli toprakta yaklaşık 2 hafta yaşayabilir (Abbott and Egerton, 2003). Mikroorganizma deneysel koşullar altında 5°C ısıda ve tırnak tozu mevcudiyetinde 24 gün kadar canlı kalabilir (Cederlöf et al., 2013). Özellikle Avustralya'da tanımlanan ayak çürüğü vakalarında iklimsel koşulların bulaşmada çok etkin olduğu tespit edilmiştir (Graham and Egerton, 1968). İki ila üç ay süren yağışlar aylık 50 mm'yi aştığında ve ortalama günlük sıcaklığın düzenli olarak 10°C'yi aşmasıyla hastalık ortaya çıkar. Kalıcı olarak devam eden ıslak koşullar predispozisyon oluşturur. Ayrıca hastalığın oluşmasında nem etkilidir. Eğer uzun süre ve kalabalık meralarda ıslak mikroçevre koşulları altında kalırsa yoğun çiy ve yağışlar serbest neme neden olur. Genç koyunların yaşlı koyunlara göre ayak çürüğüne daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Plant et al., 2017).

Hastalık koyun ve keçilere spesifik olmasına rağmen, ayrıca sığır, at, geyik ve domuzlarda da bildirilmiştir (Ghimire et al., 2002). Sığırlarda ve geyiklerde hastalığın hafif bir formu gelişirken, koyun ve keçilerde şiddetli formu gelişebilir (Egerton and Laing, 1978). Bazı Avustralya koyun ırkları ayak çürüğüne karşı daha fazla duyarlı iken, bazı İngiliz koyun ırklarının daha az duyarlı olduğu ileri sürülmüştür (Emery et al., 1984). Bu hastalık Almanya ve İsviçre'de yaban keçisi ve dağ koyunu gibi yaban toynaklılarda da bildirilmiştir (Belloy et al., 2007). Koyun ırklarının tümü, her yaşta ve her iki cinsiyette ayak çürüğüne duyarlıdır.

2.2.3. Patogenez

Koyun ayak çürüğü;” interdigital dermatitis (ID)” ve “under-running ayak çürüğü (boynuz tırnak ile derinin ayrılması)” olmak üzere iki farklı klinik görünüm ile seyretnmektedir. İnterdigital dermatitis tırnak arası yangısının bir başlangıcıdır ve buradaki yüzeysel epidermal tabakalarda yangı, hasar ve düzensiz bir şekilde sıyrıklar görülür. Sonra, tabandaki yumuşak dokunun boynuz tırnaktan ayrılması ile karakterize under-running ayak çürüğü haline gelir (Egerton et al., 1969). Avustralya’da interdigital dermatitis ile benign ayak çürüğü (hafif ayak çürüğü) eş anlamlı olarak kullanılmıştır ve under-running ayak çürüğü de “virulent ayak çürüğü” olarak adlandırılmıştır (Raadsma and Dhungyel, 2013). Ekstraselüler proteazların enzimatik aktivitesi sayesinde *D. nodosus*’un virulent ve benign suşlarının konağın ekstraselüler matriksini ayrıştırma yeteneği farklıdır (Riffkin et al., 1995).

İleri aşamadaki ayak çürüğü lezyonları sıklıkla tırnak duvarını ve tabanını kapsamasına rağmen yeni enfeksiyonlar her zaman tırnak arası derisinden başlar. Tırnak arası derisi normalde bakteriyel enfeksiyonlara dirençlidir. Eğer tırnak arası derisi uzun süre ıslak koşullara maruz kalırsa deride yumuşama ve dirençte azalma meydana gelir. Bunun sonucunda da tırnak arası derisi oldukça duyarlı hale gelir (Cross, 1978).

F. necrophorum’un da içinde olduğu her koyunun çevresinde yaygın olarak bulunan bazı bakteriler daha sonra ovine interdigital dermatitis (OID) ile sonuçlanan enfeksiyon oluşturabilir. Bu durumun kendisi oldukça hafif ve yüzeysel olmasına rağmen, *D. nodosus* ile enfeksiyon oluşması için predispozisyon yaratır (Roberts and Egerton, 1969). Tırnak arası lezyonların gelişimini takiben ayak çürüğü ayak tabanının altında yatan hassas tabakaya uzanabilir ve sonra aşamalı olarak ayaktan ayırır (Deane and Jensen, 1955). Ayağın epidermal matriksine sızma için hem *F. necrophorum* hem de *D. nodosus* gereklidir. *F. necrophorum* ilk başta stratum corneum’a kolonize olur ve *D. nodosus* ile enfeksiyon oluşmasına olanak sağlar. Oluşan *D. nodosus* enfeksiyonu *F. necrophorum*’un daha derin dokulara penetre olmasını sağlar ve daha ileri düzeyde yangı ve epidermal yıkıma neden olur. *D. nodosus* daha az yangıya neden olur fakat epidermal matriksin öncelikli istilacısı olduğu görülür, tırnak ayrılma sürecinin başlatıcısı olarak ortaya çıkar ve *F. necrophorum*’un üremesi için ortam sağlar. Ayrıca *F. necrophorum*’un yıkıcı etkisini ve çoğalmasını arttıran faktörler üretir (Roberts and Egerton, 1969). *D. nodosus*’un proteaz enzimlerinin geniş kapsamlı

aktiviteleri dolayısıyla tırnakta ayrılmanın başlaması kaçınılmazdır (Stewart, 1979).

Ayak çürüğünde ayak tabanında uzanan yapıların tırnaktan ayrılması ve nekrotik materyal birikimine göre hastalığın şiddeti değişkendir (Thomas, 1962). Ayak çürüğünde epidermisdeki bakteriyel invazyona cevap olarak epidermise ve dermise doğru nötrofillerin ve lenfositlerin invazyonu görülür (Davenport et al., 2014).

Histolojik çalışmalar sonucunda ayak çürüğü hücresel dejenerasyon (hücre balonlaşması), mikro apselerin şekillenmesi ve birleşen vakuoller oluşumu ile sonuçlanan stratum granulosum ve stratum spinosum'un dejeneratif bir durumu olarak tanımlanmıştır (Thomas, 1962). Klinik olarak sağlıklı ve etkilenmiş ayaklarla ilgili güncel bir histolojik çalışma, sağlıklı, ID ve ayak çürüğü örnekleri arasında dermiste ve epidermise doğru lenfosit ve nötrofil sızmasında ilerleyici bir artış göstermiştir (Davenport et al., 2014). Ayak çürüğü vakalarında yangı, epidermal dejenerasyon, nekroz ve epidermal-dermal yarık alanları ortaya çıkmaktadır. Önceki çalışmalarda olduğu gibi epitelin stratum spinosum katmanında sitoplazmik balonlaşmaya nüklear yoğunlaşmanın (nüklear piknoz) eşlik ettiği (Thomas, 1962) ve bununla beraber doku hasarı ve kronik reaksiyonu gösteren fibrozis alanları gözlemlenmiştir (Egerton et al., 1969).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada ayak çürüğünden alınan örneklerden yapılan incelemelerde *D. nodosus* yükü ile IL-1 β ve CXCL-8 mRNA ekspresyon düzeyinin (IL-6 ve IL-17 mRNA hariç) ilişkili olduğu bildirilmiştir (Maboni et al., 2017a). Ayrıca, *D. nodosus* ile enfekte edilmiş koyun interdigital deri *ex vivo* organ explantlarının uyarılımasının IL-1 β salınımına neden olduğu belirlenmiştir (Maboni et al., 2017b). Yine son yıllarda ayak çürüğünden etkilenmiş ve sağlıklı ayaklarda koyun interdigital derisinin histopatolojik özelliklerini karşılaştırmak için analizler yapılmıştır. Bunun sonucunda epidermis ve dermisteki yangıyı değerlendirmek için yeni bir skorlama sistemi geliştirilmiştir. *D. nodosus* yükü ve pro-inflamator bir stokin olan IL-1 β ekspresyonu ile bu skorların ilişkisi incelenmiştir (Agbaje et al., 2018).

2.2.4. Semptomlar

Footrot'dan etkilenmiş koyunlarda topallık her zaman görülmemesine rağmen footrot'un ilk belirtisinin genellikle topallık olduğu bildirilmiştir. Genellikle bir toynaktan daha fazlası etkilenmektedir. Footrot tırnak arası derisinin yangısı ile başlamakta ve toynağın germinal tabakasının istilası ile ilerlemektedir. Bunun sonucunda da ayağın yumuşak dokuları, boynuz tırnaktan ayrılmaktadır (Beveridge,

1941). Oluşan lezyonlar belirgin bir kötü kokuya sahiptir ve boynuz tırnaktan ayrılan yumuşak dokunun yüzeyinde genellikle sulu, beyaz-gri, nekrotik materyal mevcuttur.

Ayak çürüğü ayaktaki lezyonlara göre ayırt edilebilen bir hastalıktır. Hastalıktan etkilenmiş hayvanlarda klinik bulgular hafif bir tırnak arası yangıdan boynuz tırnaktan hassas dokuların ayrılmasına ve tabanda iltihaplanmaya kadar geniş bir değişkenlik gösterir. Ayak çürüğünü subjektif değerlendirilmesi, lezyonların büyüklüğünün ve şiddetinin standart bir tanıma kavuşturulması için bir puanlama sistemi geliştirilmiştir (Raadsma and Egerton, 2013). Birçok ülkede bu puanlama sistemi veya bunun modifiye şekilleri kullanılmaktadır. Stewart ve Claxton 5'li puanlama sistemi kullanmıştır (Stewart and Claxton, 1993). Norveç'te 2 lezyon puanının 2A, 2B, 2C olarak detaylandırıldığı puanlama sistemi kullanılmıştır (Grøneng, 2015). Avustralya'da Ayak Çürüğü Çalışma Gurubu Raporu'na göre ve Hayvan Sağlık Komitesi tarafından onaylanan 3 lezyon puanının detaylandırıldığı bir puanlama sistemi kullanılmıştır (Buller and Eamens, 2014).

Toynak lezyonları, tırnak arası derisindeki hasarın derecesine göre 1 ile 5 arası puanlanmaktadır (Şekil 2.5) (Stewart and Claxton, 1993). Benign veya virulent footrot'u belirlemede sürü yaygınlığı yönünden yaklaşılr. Benign footrot'lu bir sürüde skorlama 1 ya da 2 olarak değerlendirilmektedir. Bu lezyonlar tedavi ile gerilemektedir (Seaman, 2014; Stewart and Claxton, 1993). Hastalığın çıkması için uygun çevresel koşullar altında, virulent footrot'a sahip bir sürüde tipik olarak 4 ve 5 puanlı lezyonlar görülmekte ve enfeksiyonda hızlı bir ilerleme görülebilmektedir (Seaman, 2014). Şiddetli footrot lezyonlarına sahip koyunlarda iştahsızlık meydana gelir. Bu da yün üretim oranının azalmasına neden olur. Azalmış vücut ağırlığı ve azalmış yün üretimi enfekte olmuş ayağın sayısı ve lezyonların şiddeti ile doğrudan ilişkilidir.

Footrot aşağıdaki klinik patolojilerin bir kısmını veya tamamını gösterebilir (Buller and Eamens, 2014):

- Tırnak arası derisinin ve boynuz-deri bağlantısının yangısı alttaki dokularda ilerleyici bir dejenerasyona neden olabilir.
- Boynuzsu tırnakta bozulma,
- Taban ve topuğun yumuşak boynuzunun altındaki iltihaplanma ve bu iltihaplanmanın sert boynuz duvarlarının altına uzaması,
- Tırnağın germinal tabakaları boynuzdan ayrılması.

Ayak çürüğü etkeninin virülensine bağlı olarak hastalık benign, virulent ve intermediate olarak kategorize edilir (Stewart et al., 1986). Footrot tırnak arası derisinde hafif bir yangı olarak başlar. Benign footrotta yangı ilerlemez veya çok az ilerler. Etkilenmiş koyunların küçük bir oranında arka taban ve topukta yumuşak boynuzun ayrılması görülebilir ancak virulent footrotta tam aksine az miktarda nekrotik eksudat birikintisi ve yumuşak dokuların altında azalmış nekroz vardır. Benign footrotta karakteristik olarak hafif bir topallık vardır ve çevre sıcak ya da kuru olduğu zaman veya tedavi sonrası hızlı bir iyileşme görülür (Buller and Eamens, 2014).



Şekil 2.5. Footrot nedenli ayak lezyonlarında skorlama (Raadsma and Egerton, 2013'den uyarlanmıştır). (a) Skor 1: Hafif interdigital dermatitis; (b) Skor 2: Daha yaygın interdigital dermatitis; (c) Skor 3: Şiddetli interdigital dermatitis, taban ve topuğun yumuşak boynuzunun ayrılması; (d) Skor 4: Skor 3'e ilave olarak ayrılmanın toynak duvarının sırt boynuzuna doğru uzaması

Virulent footrot olarak tanımlanan şiddetli bir lezyon, uygun koşullar altında başlangıçtaki enfeksiyonu takip eden genellikle 7-14 gün içinde sert ve yumuşak boynuzun tümüyle iltihaplanmasına kadar interdigital yangının hızlı ilerlemesi ile

karakterize edilmektedir. Topallıklar kronik ve şiddetli olabilir. Uygun bir çevrede hastalık hızlıca yayılır ve sürünün büyük bir oranı etkilenir. Kuru koşullar olduğu zaman lezyonların bazılarında gerileme meydana gelir fakat enfeksiyonların bazıları taban/duvar bağlantısında gelişir (Buller and Eamens, 2014). Etkilenen hayvanlar tedavi edilmezse çoğunda yıl boyu virulent footrot meydana gelebilir.

Tırnak arası derisi, deri boynuz bağlantısı ve boynuz hasarının boyutu ve tutarı bir lezyon numaralandırma sisteminin temelini şekillendirir. Hafif lezyonlar 1 veya 2 olarak, daha şiddetli lezyonlar 3,4,5 olarak numaralandırılır. Footrot'un intermedier bir formu Avustralya'daki bazı eyaletlerdeki otoriteler tarafından bildirilmiştir. Bu eyaletlerde etkilenmiş koyunların küçük bir oranı 3 veya 4 skoruna sahip olduğu görülmüş fakat 5 lezyon skoru görülmemiştir (Buller and Eamens, 2014).

2.2.5. Teşhis

2.2.5.1. Klinik Teşhis

Footrot'un klinik olarak teşhisi, toynak muayenesi sonrası lezyon skorlarının değerlendirilmesi ve yorumlanması ile yapılır. Toynak eksudatından alınan smearların bakteriyoskopisi ve kültürünü kapsayan laboratuvar testleri saha teşhisini doğrulamakta kullanılır. *D. nodosus*'un sağlıklı ayakta da bulunması nedeniyle numune toplanması ve izolasyonu, klinik tanının tamamlayıcısı olarak nitelendirilmektedir (Frosth, 2016).

Şap, mavi dil, tetanoz, ektima ve kas hastalıkları gibi sistemik hastalıklardaki koyun topallıkları için ayırt edici bulgulara dikkat edilmelidir. Ayrıca, travmatik yaralanmalar, ayak lezyonları ve osteoarthritis'in de topallıklara neden olabileceği gözden kaçırılmamalıdır (Grøneng, 2015).

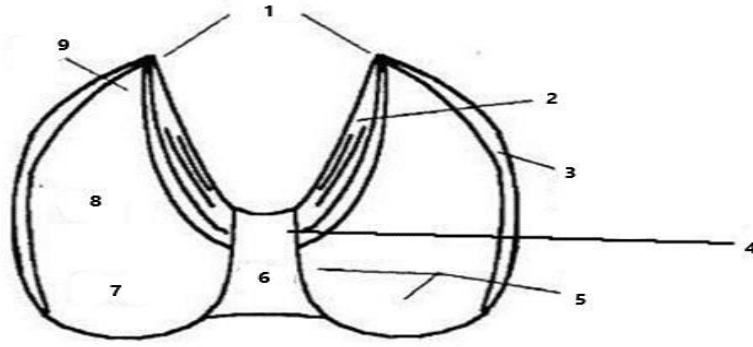
Ayak çürüğünün özellikle interdigital dermatitis ve kontagiyöz ovine digital dermatitis ile ayrımını iyi yapmak gerekir. Interdigital dermatitis, tırnak arasında bir kızarıklık şeklinde görülür. Ayrıca üzerinde gri veya beyaz renkli bir yapışkan olabilir. Etken *F. necrophorum*'dur. Lezyonlar sadece tırnak arasında görülür (Stewart, 1989; Winter, 2004). Kontagiyöz ovine digital dermatitiste ise lezyonlar koroner bantta görülür ve tüy kaybına neden olur. Hastalık *Treponema* cinsiyle ilişkilidir. Tırnak arasında lezyon görülmez. Tırnak altına ve tırnak duvarına ilerleyebilir. Şiddetli durumlarda tırnak kapsülünden ayrılabilir (Duncan et al., 2014).

Diğer topallıklar, tırnak ve ayak apseleri ile beyaz çizgi hastalığından (white line disease) kaynaklanabilmektedir (Winter, 2008). Ayağın daha az yaygın olan

infeksiyonları; strawberry footrot, post-dipping lameness (koyun erisipeli), toksik laminitis (rumen asidozu komplikasyonu), ektima (ORF), ülseratif dermatosis, mavi dil ve şap hastalığıdır (Raadsma and Egerton, 2013). Bu hastalıkların footrot ile karışması mümkün olabileceği için kesin teşhis etken izolasyon ve identifikasyonu ile yapılır.

2.2.5.2. Bakteriyolojik Teşhis

Footrot'un laboratuvar tanısında interdigital bölgeden ve özellikle de lezyonlu kısımlardan alınan svaplar kullanılmaktadır (Şekil 2.6). Footrot lezyonlarında *D. nodosus* varlığını göstermek için Gram boyamayı takiben mikroskopi, kültür ve/veya PCR gibi metotlar kullanılmaktadır. Bakteriyoskopi ve kültür sonuçlarını doğrulamak için PCR ve MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) gibi ek metotlar tercih edilmektedir (Frosth, 2016).



Şekil 2.6. Örnek toplama işlemlerinin özeti (Bennett and Hickford, 2011'den uyarlanmıştır). 1: Parmak; 2: Eksendeki duvar; 3: Dış duvar, Eksen dışı duvar, Sert boynuz; 4: Ayak çürüğünün başlangıç yeri olduğu için eğer mümkünse svaplar boynuz-deri bağlantısından toplanır; 5: Yumuşak boynuz; 6: Deri; 7: Topuk (ökçe); 8: Taban; 9: Tırnak

2.2.5.3. *Dichelobacter nodosus*'un İzolasyonu

Lezyonlu kısımlarda alınan svaplardan preparatlar hazırlanarak Gram boyama ile boyanır. Preparatlarda Gram negatif etkenler görülür ancak bu durum kesin tanı için yeterli değildir. Kültür için ayağın nemli tırnak arası derisinden ya steril bir bistüri ucu ile ya da svap ile toplanan materyal geçmişte en duyarlı metot olarak bildirilmekteydi. Günümüzde ise en iyi örnekleme yeri olarak ayak çürüğü vakalarının başlangıcında, boynuz tırnak deri bağlantısının tırnak arası derisindeki beyazımsı köpüklenmiş ölü doku olduğu kabul edilmektedir. İlerlemiş vakalarda örnekler tırnak arası derisindeki yarıkların dibinden veya ayrılma lezyonlarının geliştiği uçlardan alınmalıdır (Stewart and Claxton, 1993). Atılmış ayaklarda *D. nodosus* bulunmayacağı

göz önüne alınmalı ve bakteriyolojik inceleme için zayıf sonuçlar veren bu alanlardan örnek toplanmamalıdır.

Toplanan örnekler, 24 saat içinde buzda veya ortam sıcaklığında laboratuvara nakledilmelidir. Eğer nakil süresi 24 saati geçecek ise *D. nodosus*'un canlılığını devam ettirmek ve kontaminant bakterilerin üremesini engellemek için numuneler 4°C'de bekletilmelidir. Taşıma süresinin uzunluğu *D. nodosus* kültürünün başarı şansını etkiler. Üç gün içerisinde laboratuvara transport besi yeri içerisinde ulaştırılan örnekler başarılı sonuç vermektedir. Nakil süresi 5 günden fazla olan örnekler kültür için uygun değildir (Pitman et al., 1994).

Toplanan materyallerin laboratuvara ulaştırılmasında modifiye Stuart transport besi yeri tavsiye edilmektedir. Koyunun tırnak arası boşluğunun svap veya döküntülerinden alınan iyi korunmuş küçük miktarda bir numune (dağılma veya seyrelmesini önlemeye yardım etmek için) konsantrasyonu artırılmış agar içeren Stuart transport besi yeri sayesinde daha verimli olabilmektedir (Pitman et al., 1994). Alınan örnekler besi yerinin üzerinden 2-3 mm içeri doğru yerleştirilir veya gömülür. Alternatif olarak da svap ucu ortama tamamen batırılır ve çubuğu kırılıp, atılır. Bakteri kültürü için gerekli olan ve bakteri içeren numunenin çok fazla miktarda alınamayacağı göz önüne alınarak, modifiye edilmiş bildirilen söz konusu ortamının kullanılması önemlidir. Çünkü bu taşıma ortamı numunenin seyreltilmesini ve dağılmasını önlemek için yüksek konsantrasyonda agar içerir ve anaerobik koşulların sürdürülmesine yardımcı olur. Taşıma ortamının rengi bulutlu gri veya buz mavisi olmalıdır. Güçlü mavi bir renk, ortamın oksitlendiğini ve kullanım için uygun olmadığını gösterir.

D. nodosus'un kültüre edilmesi için anaerobik koşullara gereksinim vardır. Kültür için Hoof Agar (HA), TAS (trypticase, arginine ve serine) agar, modifiye TAS agar, TASH agar (Tırnak tozu ile modifiye edilmiş TAS agar), TASH agar izolasyon besi yeri (TASH-IM) ve TASH agar devam besi yeri (TASH-MM) ve kanlı Eugon agar kullanılmaktadır (Buller and Eamens, 2014).

İzolasyon için besi yerinde %4 oranında agar olması flagellar hareketi inhibe eder, kontaminantların üremesini ve kümelenmesini engeller; fakat ekim hattından uzakta koloniler oluşturmak için *D. nodosus*'un kayma hareketine izin verir.

Başlangıç kültür için %4 agar içeren TASH-IM agar kullanımı ve subkültür için %1,5 agar içeren TASH-MM agar kullanımı katı besi yerinde üreme için besin maddeleri açısından en iyi ortamı sağlamaktadır. İlave testler için TAS buyyon ve

modifiye Eugon buyyon gibi sıvı besi yerlerinde subkültür işlemi gerçekleştirilebilir (Buller and Eamens, 2014).

D. nodosus ortalama olarak 37-39°C’de üremektedir. Oda ısısında üremesi daha yavaştır. Anaerob bir bakteri olmasına rağmen kısa süreli (15 dk) havaya maruz kalmayı tolere edebilir. Koloniler steromikroskop altında 10’luk büyütmede incelenir ve şüpheli koloniler saf kültür elde etmek için subkültüre edilir (Buller and Eamens, 2014).

Agar pleytleri (TASH-IM, TAS, Hoof agar, Eugon agar) 37°C’de 15 dk’yı geçmeyecek şekilde yaklaşık 10 dk kurutulur. Kontaminantların aşırı yayılımını engellemek için nemsiz bir ortamın olması gerekir. Eğer mümkünse inoküle edilmemiş pleytler pleytlerin oksijen absorpsiyonunu engellemek için anaerobik bir ortamda saklanmalıdır (Buller and Eamens, 2014).

Toplanan örnekler Stuart transport besi yerinin üst kısmından içeri doğru yerleştirilir. Steril bir öze telinin ucu (paslanmaz çelikten, 1,5 mm çapta ve 75 mm uzunlukta) transport besi yerinden numune toplamak için kullanılabilir ve 2 adet izolasyon besi yerine (TASM-IM ve/veya Hoof agar) ekilir. Başlangıç ekim çizimi agarın yüzeyine doğru yapılır sonra inokulum pleytin dibine ve agarın içine doğru ittirilir. Sonra ikincil çizimler (1,2,3 numaralı ekim hatları) hafif bir iz bırakmak için agar yüzeyine doğru yapılır (Pitman et al., 1994).

Örnek almak için svap kullanılmış ise agar pleytlerine inokulasyonu özel bir şekilde gerçekleştirilir. Svap ile yapılan ilk ekim sonrası agarda ızgara deseni oluşturmak sureti ile seyreltme uygulanır. Besi yerleri 37°C’de 4-6 gün inkübe edilir ve *D. nodosus* kolonileri ekim çizgilerinin dışında yassı yarım daire şeklinde ürer (Frost, 2016).

Tipik *D. nodosus* kolonileri en dışta granülenmiş zonları ile tanınır ve kolonilerin merkezi kısmı ve dış kısım arasında üremenin olmadığı anlaşılan bantlar ayırt edilir. İnokulasyondan 5 gün sonra koloniler incelendiğinde oluşan “buzlu cam” görüntüsü spesifiktir. Koloni görünümü açıktır fakat kullanılan agara, agar yoğunluğuna ve *D. nodosus* izolatlarının özelliklerine göre değişkenlik gösterir (Skerman et al., 1981).

Çok sayıda numune ile çalışıldığı durumlarda mümkünse numuneler karbondioksit akış devamlılığı olan anaerob jarlara yerleştirilir. Tüm pleytler ekildikten sonra CO₂ tüpü çıkarılır, indikatör şerit içeren anaerobik hava üreten paket

eklenir, jar kapatılır ve 37°C'de en az 48 saat inkübe edilir. Eğer CO₂ akışı sağlanamıyorsa pleytler inokulasyondan 15 dk sonra uygun bir gaz üreten paket içeren anaerobik jarlara yerleştirilir. Gaz üreten ticari paketler oksijeni % 1'de az ve karbondioksiti % 9-13 olan hava üretir. İnkübasyondan 48 saat sonra küçük büyütmede (10x) ve dikey aydınlatmaya sahip steromikroskopta ayırım yapılır. *D. nodosus*'un tipik kolonilerini ayırt etmek için bir büyüteç veya kuyumcu gözlüğü kullanılır. Koloniler buzlu cam görünümüne sahiptir, bu görünüm özellikle koloni kenarları civarındadır. Koloniler ekim hattından uzakta ve dışarıda üreme gösterir (Buller and Eamens, 2014).

İzolasyon sonrası bakterileri saflaştırmak için TASH-MM, Hoof agar, TAS agar, modifiye TAS agar, TASH veya kanlı Eugon agar gibi besi yerlerine subkültür gerçekleştirileir ve bu amaçla 2 metot kullanılır. Şüpheli koloniler bir öze ile veya bir mikrospatül kullanarak agarlı koloni çıkartılabilir. Alınan koloni veya koloni ile birlikte agar bloğu, subkültür için kullanılan besi yeri yüzeyine koloni aşağı gelecek şekilde yerleştirilir. Bir numuneden bir pleyte 3-4 bakteri subkültüründen fazlası yapılmamalıdır (Buller and Eamens, 2014).

Subkültürler ve orjinal izolasyon besi yerleri anaerobik koşullarda ve 37°C'de en az 48 saat inkübe edilir. Subkültürler üreme saflığı açısından bir mercek veya steromikroskopla incelenir. Saflık Gram boyama ile kontrol edilir. Negatif raporlama öncesi *D. nodosus* olmadığı görülen koloniler 2-6 gün daha inkübe edilir.

Saf üremeler jelatin test (proteaz termostabilitesini belirlemede) ve zimogram testlerinde kullanılmak üzere TAS veya HEPES-TAS buyyona ekilir.

D. nodosus kültürlerinin kısa süre için (2-3 hafta) anaerobik koşullarda TASH-MM agar, Hoof agar, TAS agar veya Eugon agar'da canlılığı devam ettirilebilir ve karanlıkta oda ısısında saklanabilir (Buller and Eamens, 2014).

Uzun süre saklama için liyofilize edilir veya -80 °C'de saklanır. -80 °C'de saklama için, boncuklu bakteri koruma tüpleri başarıyla kullanılabilir (Buller and Eamens, 2014). İşlem, 48 saatlik bir kültürden bir öze dolusu üremenin emülsiyon haline getirilmesini ve boncuk sıvısına karıştırılmasını, ardından sıvının uzaklaştırılmasını ve boncukların -80°C'de dondurulmasını içerir. Alternatif yöntem olarak kültür, %20 gliserol içeren buyyonlarda -80°C'de saklanabilir.

İzolatların saklanması için kullanılan diğer bir yöntem de liyofilizasyon olup, 2 mL Wheaton serum şişelerinde kriyoprotektan olarak 1 mL miktarında inositol içeren

at serumu eklenmesi ile gerçekleştirilir. Kriyo-protaktan sıvı ile nemlendirilmiş steril pamuk uçlu bir svap, liyofilizasyondan önce sıvı nitrojen içinde hızlı bir şekilde dondurulmadan önce kriyoprotaktan sıvı içinde süspanse edilen *D. nodosus* hücrelerini toplamak için kullanılır. Kriyoprotaktan olarak yağsız süt kullanımı da tavsiye edilmektedir (Buller and Eamens, 2014).

2.2.5.4. Biyokimyasal Testler

D. nodosus'un identifikasyonunda, bakteride varyasyonların olması nedeniyle, biyokimyasal testler güvenilir olarak kabul edilmemektedir. Bakteri hareketsiz olmasına rağmen kayma hareketi görülebilir ve bu durum katı besi yerinde yayılma üremesi olarak görülür.

Bakterinin oksidaz, katalaz, üreaz, arginin dekarboksilaz (ADH), DNaz, indol oluşumu, nitrat redüksiyonu, nişasta hidrolizi, eskülin hidrolizi ve glukoz/sorbitol fermentasyonu negatiftir.

Ornitin dekarboksilaz ve H₂S üretimi pozitifdir.

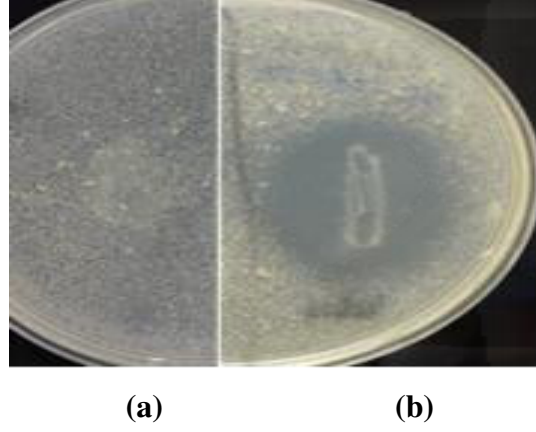
Proteolitik aktivite, jelatin, kazein ve albümin içeren ortamlarda görülmektedir.

ADH ve nitrat reaksiyonları değişkenlik göstermektedir (Buller and Eamens, 2014).

2.2.5.5. Virülens Testleri

Elastaz testi: Testin prensibi *D. nodosus* izolatlarının elastin agarda ürettikleri elastaz miktarının ölçümüne dayanır. Yıllar geçtikçe, bu test geliştirilmiştir ve izolatanın bir elastin agar pleytine inokulasyonundan elastaz aktivitesinin saptanmasına kadar geçen süre artık o izolatanın virülansını sınıflandırmak için kullanılmaktadır (Stewart, 1979). Virülene suşlar elastin agardaki elastinin tamamını yıkımlar, benign suşlar ise parçalamaz (Liu and Yong, 1997).

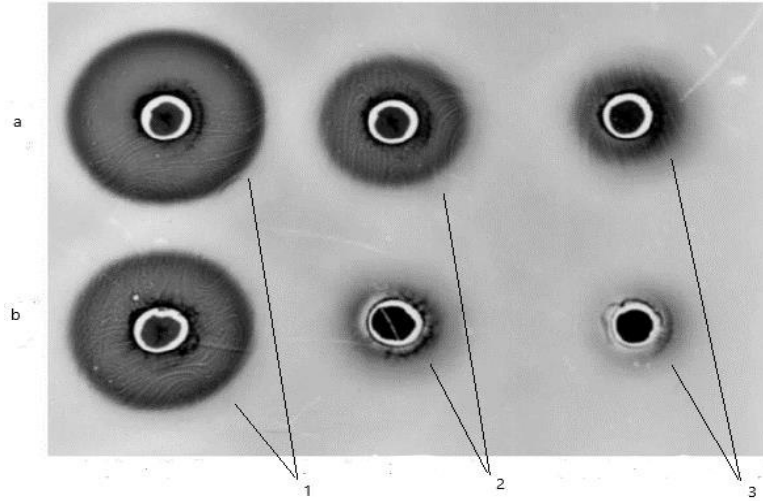
Elastin partikülleri çözülmeden dökülen agara *D. nodosus* düz bir çizgi şeklinde inokule edilir ve anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılır (Stewart, 1979). Pleytler 4 gün arayla toplam 28 gün süre ile incelenir. Kolonilerin etrafındaki çözülmemiş elastin partiküllerinin sağladığı açıklık zonunun yoğunluğu elastaz aktivitesinin bir göstergesidir (Şekil 2.7) (Stewart, 1979). Virülene suşlar elastaz aktivitesini 8-12 günde gösterirken, benign suşlar 24-28 günde zayıf elastaz aktivitesi gösterir veya göstermez. Yaklaşık 14-21 gün sonra görülen gecikmiş elastaz aktivitesi, bakterinin intermedier suş olduğunu gösterir (Claxton, 1986).



Şekil 2.7. Pozitif ve negatif elastaz testi (Buller and Eamens, 2014'den uyarlanmıştır) (a) 21 gün sonunda negatif elastaz testi, (b) 7 gün sonunda pozitif elastaz testi

Jelatin testi: Jelatin testi, proteaz dayanıklılığına göre *D. nodosus*'un benign ve virulent suşlarını ayırt eder. Benign suşlar tarafından salgılanan proteaz ısıya duyarlı iken virulent suşlar tarafından salgılanan proteaz ısıya dayanıklıdır (Palmer, 1993). Test için *D. nodosus* TAS buyyonda üretilir ve sıvı kültürden alınan süpernatantın bir kısmı 68°C'de 8 ve 16 dk'lık peryotlarla ısıtılır. Isıtılmış ve ısıtılmamış süpernatant kısımları jelatin eklenmiş agarın üzerindeki kuyucuklara yerleştirilir. Jelatinin hidrolizi proteaz aktivitesini gösterir. Hidroliz zonları ölçülür. Isı görmemiş proteaz aktivitesi ile ısı görmüş proteaz aktivitesi karşılaştırılır ve termostabilite, proteaz aktivitesindeki yüzde değişim belirlenir. Sonuç “Yüzde Sabitesi = (ısıtılmış zon büyüklüğü/ısıtılmamış zon büyüklüğü)x100” formülü ile hesaplanır.

Onaltı dk'lık ısıtma sonrası jelatinde açılma olmuş ise pozitif, açılma olmamış ise negatif olarak değerlendirilir. Parçasal açılmalar ise şüpheli (hatalı zon çapı ölçülmüş olabilir) olarak kaydedilir (Şekil 2.8). Isıtılmamış örnekte zon çapı 12 mm'den az ise test geçersiz kabul edilir (başlangıç proteaz aktivitesi düşük olabilir). İzolatlardaki geçersiz ve şüpheli değerler yeniden test edilebilir. Virulent ve benign referans suşlar sırasıyla pozitif ve negatif sonuç vermedikçe test geçersiz olarak değerlendirilir (Links and Morris, 1996).



Şekil 2.8. Pozitif ve negatif jelatin testi (Buller and Eamens, 2014'den uyarlanmıştır) (a) ısıya dirençli suş; (b) ısıya duyarlı suş; (1) ısı uygulanmamış suş; (2) 8 dk ısı uygulanmış suş; (3) 16 dk ısı uygulanmış suş

Zimojen testi: Zimojen test, virulent ve benign suşların salgıladıkları ekstrasellüler proteazların elektroforetik hareketlerinin oranına göre ayrımını sağlar (Mc Pherson, 2018). Zimojen testte virulent suşların 4 bant oluşturduğu, benign suşların ise 5 bant oluşturduğu tespit edilmiştir. Benign izolatlar 2 bant varlığı ile virulent suşlardan ayrılmaktadır. Bunlar birinci ve ikinci bantlar olup daha az etkili proteazlardır. Fakat bu bantları belirlemek zordur. Bu test ile intermedier suşlar ayırt edilemez (Liu et al., 1994; Stewart et al., 1986).

2.2.5.6. Serolojik Teşhis

Serolojik teşhis amacıyla yapılan çalışmalarda virulent ve benign suşlara özgü monoklonal antikorlar kullanılarak, izolatlarda belirli proteazların varlığını veya yokluğunu göstermek için ELISA yöntemleri geliştirilmiştir. Saf kültürler kullanılarak elde edilen monoklonal antikor içeren ELISA'ların virulent ve benign izolatları konvansiyonel testlere benzer şekilde ayırabildiği bildirilmiştir. ELISA'nın spesifitesi ile elastaz ve jelatin jel testleri gibi testler arasındaki korelasyonun sınırlı olduğu görülmüştür (Dhungyel et al., 2002; Links et al., 1995). Bu yüzden antijen antikor reaksiyonuna dayanan serolojik testler teşhis amacıyla tercih edilmemektedir.

2.2.5.7. Moleküler Teşhis

Bakteriyoskopi ve kültür sonuçlarını doğrulamak için PCR ve MALDI-TOF-MS gibi moleküler metotlar kullanılmaktadır (Frosth, 2016). PCR genellikle spesifik ribozomal rRNA sekanslarının tespitine dayanmaktadır (La Fontaine et al., 1993). *D.*

D. nodosus'un belirlenmesi için ayrıca fimbrial gen sekansları ortaya çıkartılmış ve *D. nodosus* tanısında serogrup spesifik PCR analizleri geliştirme olasılığı vurgulanmıştır. *D. nodosus*'un *fimA* genini belirleyebilen ve u1, u2, d1, d2 ve d3 primerlerinin kullanıldığı PCR metodu ile tanımlanmaktadır (Zhou and Hickford, 2000).

Benign ve virulent spesifik primerler kullanılarak ve hibridizasyon problemlerinden yararlanılarak, bakterinin virulent, benign ve intermedier suşlarının ayrımı yapılabilmektedir (Katz et al., 1991; Liu and Webber, 1995; Stewart et al., 1990). Son yıllarda virülensin modülasyonu ile ilgili hareketli bir genetik element olan *intA* geninin tespitine yönelik PCR temelli analizler kullanılmaktadır (Cheetham et al., 2006; Whittle et al., 1999).

D. nodosus'un proteazlarını kodlayan genler de bakterinin serogruplandırılması için tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. On *D. nodosus* serogrubundan 9'u (A-I) multipleks PCR metotları ile ayrılabilmiş ve tanımlanmıştır. PCR'lar serogrup spesifik 9 reverse primer ve yaygın bir forward primer kullanımı ile *D. nodosus*'un tip IV fimbriasının majör subunit fimbrial geni olan *fimA*'yı tespit etmeyi hedeflemektedir (Dhungyel, 2002). Bununla beraber hali hazırda 10. serogrup olan serogrup M'yi belirlemek için bir PCR bildirilmemiştir. Primerler spesifik olarak serogrup sınıf I için geliştirilmiş, ancak amplifikasyonda ve sonrasında bu özel serogrupların identifikasyonunda da kullanılmaktadır (Zhou and Hickford, 2000).

2.2.6. Tedavi

Koyun ayak çürüğünün tedavisinde kullanılan çeşitli metotlar bulunmaktadır ve en iyi sonucun bu metotlardan birkaçının kombine edildiği zaman alındığı bildirilmiştir (Whittier and Steven, 2009). Tedavi metotları genel olarak tırnak kesimi, ayak banyoları/emdirmeleri, kuru kimyasal kullanımı, oral terapi, antibiyotik enjeksiyonları ve lokal uygulamalar başlıkları altında incelenmektedir.

Bakterilerin yoğun olarak bulunduğu enfekte tırnağın temizliği, bakterilerin saklanabileceği çatlak ve yarıkların sayısını azaltır. Böylece havanın ve ilaçların mikroorganizma üzerindeki etkinliğini artırır. Tırnak kesiminin rutin bir yönetim uygulaması olarak, yılda en az bir iki kere yapılması gerekmektedir. Kesim esnasında malzemelerin steril olmasına dikkat edilmelidir. Şiddetli enfeksiyon dönemlerinde tedavi uygulanmaksızın tırnak kesiminin hastalığın şiddetini arttırdığı bildirilmektedir (Whittier and Steven, 2009).

Ayak banyoları/emdirmeleri için yaygın olarak kullanılan solüsyonlar çinko sülfat ve bakır sülfattır. Tedavi için birkaç hafta süreyle haftada bir iki kez kullanılmalıdır. Çinko sülfat; %10'luk olarak hazırlanır. 75,6 litre suya 7 248 gr katılarak elde edilir. Genellikle bu iki solüsyon içerisinde en etkili ve az toksik olanıdır. Bakır sülfat da aynı şekilde hazırlanır. Koyunlar tarafından tüketilirse toksik etkiler gözlenebilir (Whittier and Steven, 2009).

Kuru kimyasal kullanımı, içerisinde koyunların yürütüleceği bir alanda bir kutu içerisine kuru çinko sülfat yerleştirmek suretiyle uygulanır. Oral terapi, özellikle rasyonda çinko eksikliği varsa hem tedavi hem de koruma maksatlı olarak 21 gün süreyle her gün 0,5 gram olarak uygulanır (Whittier and Steven, 2009).

Antibiyotik enjeksiyonları olarak penisilin ve streptomisin kombinasyonları ya tek seferlik olarak (ya da yaklaşık 10 gün süreyle her gün kullanıldığında ayak çürüğünün tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Prokain penisilin G ve diğer penisilin ürünleri aynı dozda ayrıca etkilidir. Uzun etkili tetrasiklinlerin tek dozluk uygulamaları bazı vakalarda başarılı bulunmuştur. Bu ilaçlar veteriner hekime danışılarak kullanılmalıdır. Kasaplık hayvanlar atılım sürelerinden önce asla kesime sevk edilmemelidir (Whittier and Steven, 2009).

Lokal uygulamalar ayak çürüğünün kontrolüne yardım etmek için özellikle tırnak kesimi veya kabukların dökülmesi sonrası hızlıca tırnağa uygulanabilir. Bu amaçla aşağıda bildirilen solüsyonlar kullanılabilir (Whittier and Steven, 2009):

- a. Çinko sülfat (% 10) - bir litre su içinde $\frac{1}{4}$,
- b. Sirkede bakır sülfat (% 10) - bir litre sirkede $\frac{1}{4}$,
- c. Çam katranında bakır sülfat - bir kısım çam katranında 2 parça CuSO_4 .
- d. Alkol içinde oksitetrasiklin çözeltisi – bir adet 25,69 gram poşet ile $\frac{1}{2}$ su bardağı su karıştırılır, daha sonra 2 litre çözeltiliye getirmek için alkol eklenir.
- e. Alkol içinde penisilin - 10 cc su ile 5 milyon IU potasyum penisilin G karıştırılır, daha sonra 1 litre alkol eklenir.

2.2.7. Koruma ve Kontrol

Hastalıktan korunmak, tedavi etmekten daha kolay ve daha düşük maliyetlidir. Ayak çürüğünün hastalısız bir sürüye sokulmasını önlemeye yönelik beş temel yönetim prensibi vardır (Whittier and Steven, 2009).

1. Hayvanlar etkilenmemiş gibi gözükse bile ayak çürüğü olan bir sürüden asla hayvan alınmamalıdır.

2. Enfekte ve temiz hayvanların bir arada toplanacağı veya aynı alanın içerisinde geçeceği hayvan pazarları veya satış alanlarından koyun almaktan kaçınılmalıdır.

3. Enfekte koyunların son iki hafta içinde buldukları tesisler (izleme alanları, ağıllar, daldırma bölgeleri) kullanılmamalıdır.

4. Koyunlar kesinlikle kirli ve dezenfekte edilmemiş araçlarla taşınmamalıdır.

5. Tüm yeni gelen koyunların tırnakları kesilmeli ve ayakları tedavi edilmelidir. Sonrasında 30 günlük izolasyon süresinde periyodik olarak tekrar muayene edilmelidir.

Formalin, çinko sülfat, bakır tuzlarının solüsyonlarıyla sıklıkla ayak banyosu yapma ayak çürüğünün sürüde yayılmasını sınırlandırdığı görülmüştür. Ayak banyosunun başarısında uygulama sıklığı önemlidir. Riskteki sürünün tamamı, riskin yüksek olduğu dönemler boyunca en azından haftada bir kere ayak banyosu solüsyonu içerisinde yürütmelidir. Bu şekilde kullanılan lokal solüsyonlar bakterilerin tırnak arası deriden daha ileriye sızmasını engeller ve bu yüzden bir çok hayvanda hastalığın şiddeti sınırlı kalır. Yayılma döneminde bireysel olarak koyunların ayağını hazırlamadan ayak banyosu yaptırılmalıdır. Şiddetli enfeksiyon geçiren hayvanlar ayak banyosundan yarar sağlayacaktır ama tedavi edici olması beklenmez. Hastalığın nüks ihtimalinin olduğu dönemde tedaviye yönelmek zaman ve emek israfıdır. Yukarıda belirtilen her bir kimyasal bu amaç için eşit derecede etkilidir fakat çinko sülfat ve bakır tuzları koyunlar için daha kullanışlıdır ve daha az ağrıya sebep olur (Raadsma and Egerton, 2013).

Ayak çürüğünün kontrolü için bazı ön koşullar bulunmaktadır (Winter, 2004):

1. Hastalığın bulaşıcı bir hastalık olduğunun farkında olunmalıdır.

2. Hastalığın sürüler arasında ve sürü içinde şiddetinin farklı olabileceği bilinmeli ve en uygun tedavi protokolü seçilmelidir.

3. Hastalığın sıcak ve nemli havalarda kolaylıkla yayılacağı bilinmelidir. Yayılma 10°C'nin altında veya sıcak kuru havalarda gerçekleşmez. Barınaklarda özellikle nemli ve kirli altlıkların kullanılması yayılmayı hızlandırır.

Temel kontrol önlemleri de aşağıdaki şekilde olmalıdır (Winter, 2004):

1. Enfekte hayvanları belirlemek için bir grup veya sürüdeki bütün hayvanlar muayene edilmelidir.

2. Enfekte olan hayvanlar, enfekte olmayanlardan ayrılır ve tedavi edilir. Etkilenmiş hayvanlar içeride veya dışarıda tutulabilir. Çinko sülfat emdirilmiş

altlıkların kullanımı dikkate almaya değerdir. Yem ve su oluklarının önüne yerleştirilebilir fakat düzenli olarak tazelenmelidir.

3. Hastalıklı veya biçimsiz ayağa sahip olan koyunlar ile kronik enfekte koyunlar sürüden çıkarılmalıdır. Bunlar sürüdeki diğer hayvanlar için yeni bir enfeksiyon kaynağıdır.

4. Hem tedavi edici hem de koruyucu etkisi olan aşılama programlarına başlanmalıdır. Doğru program riskteki sürüdeki her bir hayvan için risk dönemleri esas alınarak yapılmalıdır.

5. Aşı başlangıçta bir doz uygulanır; sonraki dozların zamanlaması, hayvanların ilk tedaviye cevabına bağlı olarak değişir.

6. Topallığın prevalansını izlemek için sürü düzenli olarak muayene edilmelidir. Eğer prevalansın arttığı düşünülüyorsa alternatif yöntemlere başvurulmalıdır.

7. Hastalığın erken aşamalarında kontrolünü sağlamak için çinko sülfatlı ayak banyosu düzenli olarak yaptırılmalıdır.

8. Enfekte hayvanlarla birlikte kullanılan otlaklar en az 2 hafta dinlendirilmelidir.

9. Satın alınan hayvanlar en az 3 hafta süreyle karantina yerlerinde tutulmalıdır.

10. Satın alınan hayvanlar yerleşik hayvanlara karıştırılmadan önce koyunların 4 ayağının tamamı incelenmeli ve ayak banyosu yaptırılmalıdır.

D. nodosus'a karşı aşılarda ayak çürüğünden korunma ve tedavide etkili olduğu belirlenmiştir (Liardet et al., 1989). İdeal olarak aşılama muhtemel bir bulaşmadan önce yapılmalıdır. Prevalansın yüksek olduğu yerlerde aşının tedavi edici etkisinden yarar sağlamak için daha erken aşılama tercih edilebilir. Yıl içerisinde yapılan aşı tekrarlarında hastalığın epidemiyolojisi dikkate alınmalıdır. Aşının tekrarı bilinen bulaşma dönemlerinden önce yapılırsa aşılamanın etkinliği artmaktadır (Raadsma and Egerton, 2013).

D. nodosus'un major serogruplarını içeren aşılarda ayak çürüğünün kontrolünde başarılı olmaktadır. Saha enfeksiyonlarına genellikle birden fazla serogrup neden olur. Serogruplar arasında çapraz koruma çok azdır veya yoktur. Bu nedenle aşılarda 10 serogruptan her birine karşı antikor titresini uyarması gerekir (Raadsma and Egerton, 2013).

Konağın immun cevabındaki antijenik yarışma nedeniyle oluşan düşük antikor titresini sorunu kombine aşının etkinliğini sınırlar (Raadsma et al., 1994). Uygun monovalan bir aşının kullanımı için ayak çürüğüne neden olan virulent *D. nodosus*

suşlarından sadece bir serogruba ihtiyaç vardır. Ayak çürüğünü kontrol etmek için bu serogrubun izolasyonu, virülens özelliklerinin belirlenmesi ve identifikasyonun ardından monovalan aşı uygulaması gerekir. Böyle bir yaklaşım dünyanın çeşitli bölgelerinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Bennett and Hickford, 2011).

İlk ayak çürüğü aşısı 1969 yılında araştırma maksatlı üretilmiştir ve yağlı bir adjuvantta *D. nodosus*'un monovalent bütün hücre emülsiyonu kullanılmıştır (Egerton, 1970). İlk identifiye edilen 2 serogrubu içeren bivalan aşı hazırlanmış ve saha denemeleri gerçekleştirilmiştir (Egerton, 1973) Kontrollere göre aşılansmış koyunlar daha hafif şiddette lezyonlara sahip olmasına rağmen, bu aşının saha denemelerinde kullanımı sonucunda oldukça değişken sonuçlar elde edilmiştir (Egerton, 1974).

İlk ticari monovalan aşı 1971 yılında patent almış ve 1972 yılına kadar 3 aşuya ticari olarak erişilebilmiştir. Bu aşular kısmi ve kısa süreli koruma (8-10 hafta) sağladığı için etkisi zayıf bulunmuştur. Bunun sonucunda piyasadan çekilmiştir (Keogh, 1976; Lambell, 1986).

İlk multivalan deneysel ayak çürüğü aşuları Avustralya'da çoğu saha enfeksiyonunu temsil eden 5 major serogrubun tüm hücrelerini içeren aşular olarak geliştirilmiştir. Bu aşular homolog enfeksiyonlara karşı koruyucu fakat aşının içermediği serogrublara karşı etkisiz bulunmuştur (Reed et al., 1981).

Rekombinant aşular üzerinde de çalışılmıştır. Aşı hazırlamada toplu fimbria üretimindeki problemlerin önüne geçmek için *D. nodosus*'un fimbrial alt ünitesini kodlayan genler Tip 1 fimbrialı bakteri olan *Escherichia coli*'de ve daha sonra ise Tip 4 fimbrialı *Pseudomonas aeruginosa*'da klonlanmıştır (Anderson et al., 1984; Mattick et al., 1987).

Gerek multivalan tüm hücre aşuları, gerekse rekombinant aşular ticari olarak üretilmiş ancak kısmi ve kısa süreli koruma sağlamıştır (Dhungyel et al., 2014; Raadsma et al., 1994; Schwartzkoff et al., 1993). Son yıllarda yapılan bir çalışmaya göre dört antijene sahip aşular daha az etkili olmasına rağmen humoral immun yanıt üzerinde olumsuz bir etki yapmaksızın bivalan rekombinat fimbrial antijenlere göre virulent ayak çürüğüne karşı daha etkili bulunmuştur. Bu çalışma *D. nodosus*'un çeşitli fimbrial antijenlerine karşı humoral immun yanıt üzerinde olumsuz bir etki olmaksızın bivalan iki farklı aşı arasında üç aylık bir süre olacak şekilde uygulanabileceğini göstermiştir. Bu durum, çok suşlu enfeksiyonlara karşı aşılanmanın, aşığı tehdit eden antijen rekabeti olmaksızın mümkün olabileceğini ve

multivalan veya çok suşlu mikropların neden olduğu hastalıklara karşı aşılama daha geniş bir uygulamaya sahip olabileceğini göstermektedir (Dhungyel and Whittington, 2009).

Güncel aşı çalışmaları şu noktalara odaklanmıştır.

1. *D. nodosus*'un çoklu serogrupları ile enfeksiyon önlenemez ve antijenik yarış ile engellenmeyen *D. nodosus*'dan identifiye edilen potansiyel antijenlerini kodlayan genom dizilimi vasıtasıyla tersine aşılama yöntemi (reverse aşılama) kullanılarak yeni evrensel aşılar geliştirilebilir (Myers et al., 2007).

2. Ayak çürüğü salgınlarının önlenmesi amacıyla monovalan aşılarda geliştirilmesi daha etkin korunma için önemlidir (Dhungyel et al., 2008).

2.2.8. Eradikasyon

Eradikasyon metotları genel olarak şu başlıklar altında özetlenmektedir (Raadsma and Egerton, 2013):

1. Sürüdeki tüm hayvanların elden çıkarılması,
2. Enfeksiyondan etkilenen hayvanların sürüden çıkarılması,
3. Enfekte hayvanların tespit edilmesi ve tedavisi,
4. Eradikasyon programlarını takiben sürüde virulent ayak çürüğünün olup olmadığının gözlemlenmesi

Hastalığın eradikasyonu zor olmasına rağmen başarı şansı da bulunmaktadır. Başarı için tutarlı ve planlanmış yönetimsel programlara gereksinim bulunmaktadır (Mulvaney, 2013). Başarılı bir yönetim planlamasının da bazı gereklilikleri vardır. Bu prensipler hastalık bilgisi ve hastalığın anlaşılması, başarılı bir yönetim planını belirlenmesi, doğru tanı ve tedavi ile beraber iyi tasarlanmış ve korunmuş tesisleri kapsamaktadır.

Eradikasyon programları çiftlikten çiftliğe ve bireysel ihtiyaçlara göre farklılık gösterebilir. Çoğu çiftçi virulent ayak çürüğü tespit edildikten sonra hızlı hareket etmek ister fakat aceleci kararlar olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Örneğin; ayak çürüğünü ilkbaharda eradike etmek olası değildir. Çünkü bu dönemde koyundan koyuna yayılma devam eder ve program uygulayıcılarını uğraştırır. Aksine yaz aylarında ve çok kuru dönemlerde hastalık koyundan koyuna yayılmamakta ve eradikasyon daha basit olmaktadır (Webb and Kluver, 2014).

Her bir bölge için iyi organize edilmiş kontrol planları tasarlanmalıdır. Eradikasyon programlarının amacı *D. nodosus*'u bölgeden ve sürüden tamamen

ortadan kaldırmaktır. Bazen bölge özelliklerine göre total koyun sayısını en aza indirmek hastalığı tamamen ortadan kaldırmaktan daha gerçekçi bir yaklaşımdır. Koyunlarda ayak çürüğü eradikasyonu ile ilgili olarak bazı temel prensipler geliştirmiştir. Bu prensipler şunlardır (Mulvaney, 2013):

1. Tüm koyunların ayakları dikkatli bir şekilde incelenmeli ve enfekte koyunlar izole edilmelidir.

2. Sağlıklı koyunlara ayak banyosu yaptırılmalı ve en az 2 hafta öncesine kadar koyun otlatılmamış meraya sokulmalıdır.

3. Enfekte koyunlar tedavi edilmelidir. İyileşen koyunlarda güçlü bir nüks eğilimi olduğu için enfekte olmuş bu koyunlar en azından bir ay arayla iki muayene geçirene kadar izole kalmalıdır.

4. Eradikasyon sadece hastalığın prevalansının %5'den az olduğu zaman uygulanmalıdır.

Bu tez çalışması Samsun ili ve ilçelerinde koyunların ayak çürüğü vakalarından *Dichelobacter nodosus* izolasyonu ve genotipik karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilmiştir.

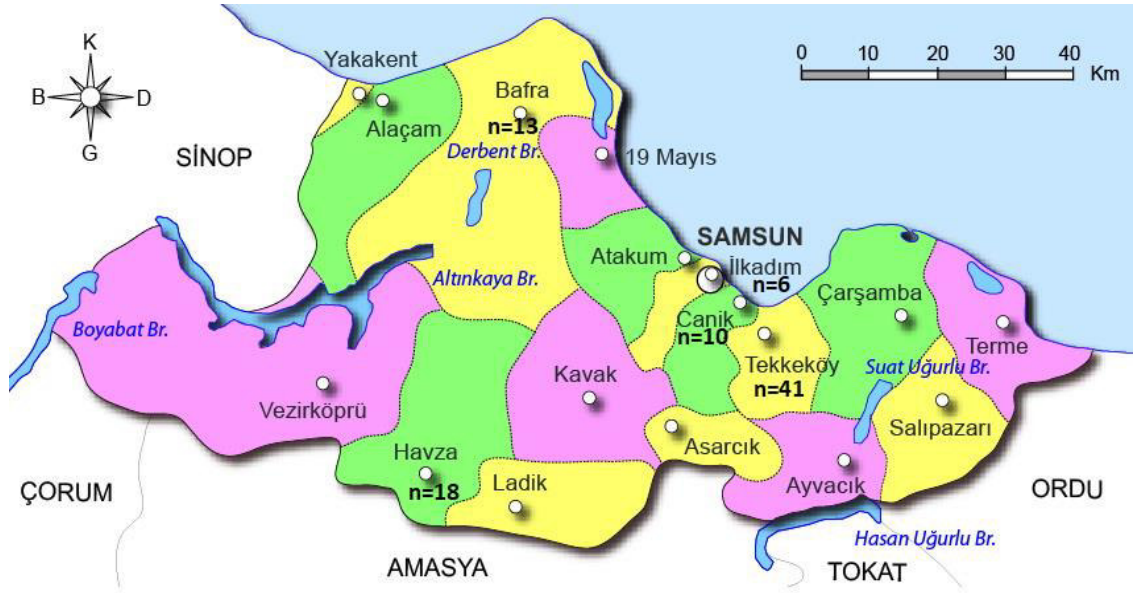
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bakteriyolojik Örnekleme

Tez çalışması kapsamında Samsun ve çevresinde bulunan koyun ve keçi işletmelerinden Samsun İli Damızlık Koyun ve Keçi Yetiştiriciliği Birliği işbirliği ile bakteriyolojik izolasyon amacıyla örnekler alındı. Birliğe bağlı olan Canik, İlkadım, Tekkeköy, Havza ve Bafra olmak üzere 5 ilçede bulunan 27 işletme örnekleme için ziyaret edildi (Şekil 3.1). İşletmelerde bulunan ve klinik olarak enfekte olduğu belirlenen 84 adet koyun ve 4 adet keçi olmak üzere toplam 88 adet hayvan örnekleme amacıyla seçildi. Koyun ve keçilerin interdigital bölgesinden ve özellikle de lezyonlu kısımlardan 88 adet svap örneği alındı (Tablo 3.1). Svap örnekleme ortamı sağlayan Stuart/Amies transport besi yerine konuldu ve soğuk zincir şartlarında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirildi

Tablo 3.1. Bakteriyolojik örnekleme yapılan işletmelere ait bilgiler

İşletme no	İlçe	Örnek sayısı
1	İlkadım	6
2	Canik	6
3	Canik	4
4	Tekkeköy	7
5	Tekkeköy	2
6	Tekkeköy	2
7	Tekkeköy	5
8	Tekkeköy	7
9	Tekkeköy	3
10	Tekkeköy	3
11	Tekkeköy	1
12	Tekkeköy	6
13	Tekkeköy	4
14	Tekkeköy	1
15	Havza	3
16	Havza	4
17	Havza	1
18	Havza	2
19	Havza	2
20	Havza	4
21	Havza	2
22	Bafra	1
23	Bafra	1
24	Bafra	3
25	Bafra	2
26	Bafra	2
27	Bafra	4
Toplam		88



Şekil 3.1. Bakteriyolojik örnekleme yapılan işletmelerin coğrafi dağılımı

3.2. Lezyon Skorlaması

Ayak çürüğü lezyonlarının skorlama yöntemi ile değerlendirilmesi lezyonların büyüklüğüne ve şiddetine göre gerçekleştirildi (Raadsma and Egerton, 2013). Skorlama için değerlendirme kriterleri Tablo 3.2’de sunuldu. Sunulan tanımlama kriterlerine göre örnek alınan hayvanların lezyon skorlamaları gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. Ayak çürüğü skorlama sistemi (Raadsma and Egerton, 2013)

PUANLAMA	TANIMLAMA
0	Normal kuru veya ıslak deri
1	Sınırlı interdigital dermatitis
2	Daha yaygın interdigital dermatitis
3	Şiddetli interdigital dermatitis, taban ve topuğun yumuşak boynuzunun ayrılması
4	Skor 3’e ilave olarak ayrılmanın toynak duvarının sırt boynuzuna doğru uzaması

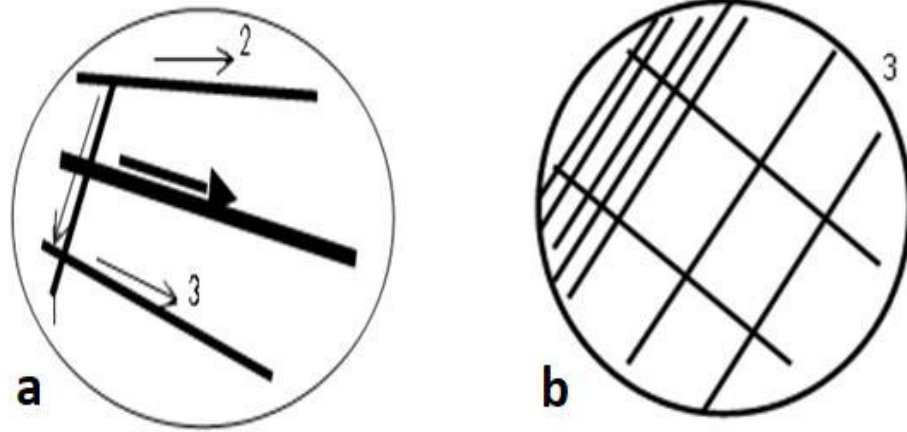
3.3. *D. nodosus* İzolasyonu

Laboratuvara ulaştırılan svap örneklerinden *D. nodosus* izolasyonu için %10 kanlı Eugon agar hazırlandı (Tablo 3.3). Kanlı eugon agar hazırlanması için ilk olarak maya ekstraktı distile suda çözdürüldü ve pH 8,0’a ayarlandı. Eugon agara maya ekstraktı solüsyonu eklendi ve 121°C’de 15 dk otoklavlandı. Besi yeri 50 °C’ye soğutuldu ve %10 sığır kanı eklendi. Her bir agar plağına yaklaşık 20 ml olacak şekilde aseptik olarak dağıtıldı ve kontaminasyon kontrolü için etüvde 1 gece bekletildi. Hazırlanan besi yerleri kullanılmıncaya kadar 4 °C’de saklandı.

Tablo 3.3. Kanlı Eugon Agar içeriği (Gradin and Schmitz, 1977)

İçerik	Miktar
Eugon agar	45,4 g
Maya ekstraktı	2,0 g
Sığır kanı (%10 v/v)	100 mL
Distile Su	1 L

Laboratuvara ulaştırılan svap örnekleri Şekil 3.2’de gösterildiği gibi Eugon agara inokule edildi. Besi yerleri anaerobik jarlarda 37 °C’de 4-6 gün inkübe edildi (Buller and Eamens, 2014; Stewart and Claxton, 1993). İnkübasyon süresi sonunda en dışta granüllemiş zon oluşturan tipik *D. nodosus* kolonileri identifikasyon amacıyla seçildi.



Şekil 3.2. *Dichelobacter nodosus* izolatının Kanlı eugon agara ekimi. (a) Öze teli ile besi yerinin içerisine doğru çizik oluşturacak şekilde uygulanan ekim hattı. Büyük ok, inokulumun birincil çizgisi; küçük oklar (2, 3) ikincil çizgilerin sırası ve yönü; (b) Ekim sonrası görülen çizgi deseni

3.4. *D. nodosus* İdentifikasyonu

Seçilen izolatların identifikasyonu amacıyla izolatlardan kaynatma yöntemi ile DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için tüm şüpheli izolatlardan saf kültür halindeki bir öze dolusu şüpheli koloni seçilerek 250 µl steril distile su içerisinde süspanse edildi. Örnekleri içeren süspanسیونlar 100°C’de 10 dk kaynatıldı ve sonrasında 10 000 g’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen DNA’ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü ve tüm DNA’lar konsantrasyonları 10 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Ekstrakte edilen DNA’lar

PCR’da hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

D. nodosus identifikasyonu amacıyla spesifik 16S rRNA genini (F: CGGGGTTATGTAGCTTGC; R: TCGGTACCGAGTATTTCTACCCAACACCT) hedef alan PCR, Wani et al. (2007) tarafından bildirilen protokol ile gerçekleştirildi. Bu amaçla 10 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 3 mM MgCl₂, 0,5 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 0,5 U *Taq* polimeraz ilave edilerek toplam 25 µl PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 94°C’de 5 dk ön denatürasyon, 35 siklus olmak üzere 94 °C’de 30 sn, 57 °C’de 30 sn, 72 °C’de 30 sn amplifikasyon ve 72 °C’de 10 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %1’lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 783 bp’lik bant görülmesi *D. nodosus* için pozitif olarak değerlendirildi.

3.5. *D. nodosus* İzolatlarının Serogruplandırılması

D. nodosus izolatlarının serogruplandırılması için Dhungyel et al. (2002) tarafından bildirilen protokolün modifikasyonu kullanılarak konvansiyonel multipleks PCR gerçekleştirildi. Serogruplandırma amacıyla gerçekleştirilen PCR için kullanılan serogrup spesifik primerler Tablo 3.4’de sunuldu. Serogrup belirlenmesi için beklenen bant büyüklükleri göz önüne alınarak 3 farklı multipleks PCR tasarlandı.

Birinci protokol D, H ve G serogruplarının belirlenmesi için gerçekleştirildi. Bu amaçla 10 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz içerecek şekilde toplam 25 µl PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 95 °C’de 10 dk ilk denatürasyon, 35 siklus olmak üzere 95 °C’de 30 sn, 60 °C’de 30 sn, 72 °C’de 1 dk amplifikasyon ve 72 °C’de 5 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %2’lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 314, 401 ve 278 bp’lik bant görülmesi sırasıyla serogrup D, H ve G için pozitif olarak değerlendirildi.

İkinci protokol B, C ve I serogruplarının belirlenmesi için gerçekleştirildi. Bu amaçla toplam 25 µl PCR karışımı 10 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 95 °C’de 10 dk ilk denatürasyon, 35 siklus olmak üzere 95 °C’de 30 sn, 58 °C’de 30 sn, 72 °C’de 1 dk amplifikasyon ve 72 °C’de 5 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium

bromid (2 µg/ml) içeren %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 281, 326 ve 188 bp'lik bant görülmesi sırasıyla serogrup B, C ve I için pozitif olarak değerlendirildi.

Üçüncü protokol F, E ve A serogruplarının belirlenmesi için gerçekleştirildi. Bu amaçla 10 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz içerecek şekilde toplam 25 µl PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 95 °C'de 10 dk ilk denatürasyon, 35 siklus olmak üzere 95 °C'de 30 sn, 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 1 dk amplifikasyon ve 72 °C'de 5 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 239, 356 ve 410 bp'lik bant görülmesi sırasıyla serogrup F, E ve A için pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 3.4. Serogruplandırma için kullanılan oligonükleotid primerler ve beklenen bant büyüklükleri (Dhungyel et al., 2002)

Primer	Hedef gen	Oligonükleotid baz dizisi	Amplikon büyüklükleri
FP	<i>fimA</i>	CCTTAATCGAACTCATGATTG	-
RA	<i>fimA</i>	AGTTTCGCCTTCATTATATTT	415 bp
RB	<i>fimA</i>	CGGATCGCCAGCTTCTGTCTT	283 bp
RC	<i>fimA</i>	AGAAGTGCCTTTGCCGTATTC	325 bp
RD	<i>fimA</i>	TGCAACAATATTTCCCTCATC	314 bp
RE	<i>fimA</i>	CACTTTGGTATCGATCAACTTGG	363 bp
RF	<i>fimA</i>	ACTGATTTCCGGCTAGACC	241 bp
RG	<i>fimA</i>	CTTAGGGGTAAGTCCTGCAAG	279 bp
RH	<i>fimA</i>	TGAGCAAGACCAAGTAGC	401 bp
RI	<i>fimA</i>	CGATGGGTCAGCATCTGGACC	189 bp

3.6. İzolatların Virülensinin PCR ile Belirlenmesi

D. nodosus izolatlarının virulent veya benign virulent olup olmadığının belirlenmesi için intA, thermostabil asit proteaz B (*aprV2/B2*), asidik proteaz V5 (ekstraselüler subtilisin-benzeri proteaz, *aprV5/B5*), serin proteaz (*bprV/B*) ile *D. nodosus* 16S rRNA'ya ait virulent-spesifik klon pV470-13, ve benign-spesifik klon pB645-335 gen varlıkları araştırıldı. Söz konusu genleri hedef alan primerlere ait oligonükleotid dizilimleri ve beklenen bant büyüklükleri Tablo 3.5'de gösterildi.

Tablo 3.5. *D. nodosus* izolatlarının virülensinin belirlenmesi için kullanılan oligonükleotid primerler ve beklenen bant büyüklükleri

Gen	Oligonükleotid baz dizisi	Amplikon büyüklüğü (bp)	Referans
<i>intA-F</i>	ACATCATGCGACTCACTGAC	530	Zhou et al. (2010)
<i>intA-R</i>	TCTCTGGTCGGTCGTACAAT		
Vf1	GGACATTTCGATGGAAAACAA	460/472	Liu and Webber (1995)
Vr1	GCATTGCCATCTTTAAACTC		
Vf2	CGCGTCAATCCCCATTGTGC	857	Liu and Webber (1995)
Vr2	GTTTATCAAAAAGGCAATATT		
Bf	TTTTGGCGAGGGCGGAACGTTATTT	609	Liu and Webber (1995)
Br	GCCGGAATTCTTGCTCATTATATT		
<i>aprV2/B2</i>	TCC AAC CGC TGC TCC AAA TG	436	Stauble et al. (2014)
<i>aprV2/B2</i>	ACC ACC GCA ACG ACC CAA TG		
<i>aprV5/B5</i>	CTG TTG CCG TAG TAG ATA CAG	1107	Stauble et al. (2014)
<i>aprV5/B5</i>	TTA ATT GAC TCG GAT CAG TAT G		
<i>bprV/B</i>	CGT GGA TAC TGG AAT TTT GG	1256	Stauble et al. (2014)
<i>bprV/B</i>	GCG CTT TAT CGG TTA CTT TC		
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	değişken	Versalovic et al. (1991)

D. nodosus izolatlarının *intA* geni varlığı Zhou et al. (2010)'nın bildirdiği yöntemle göre belirlendi. Amplifikasyon için toplam 25 µl karışım içerisine; 10 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 0,5 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz ilave edildi. DNA Amplifikasyon için 94°C'de 4 dakika ön denaturasyon basamağını takiben 35 kez 94°C'de 30 sn denaturasyon, 58°C'de 30 sn annealing ve 72°C'de 30 saniye uzama aşamaları gerçekleştirildi. Son olarak, 72°C'de 2 dakika son uzama aşaması ile amplifikasyon tamamlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 530 bp'lik bant görülmesi *intA* için pozitif olarak değerlendirildi.

D. nodosus izolatlarının virulent ve benign klonlarına ait gen dizisi varlığı Liu and Webber (1995) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlendi. Vf1 - Vr1 ile Vf2 - Vr2 virulent primerleri pV470-13 klonuna ve Bf - Br benign primerleri pB645-335 klonuna ait gen dizilimine göre literatürde bildirildiği gibi sentezletildi (Tablo 3.5). Bu primerler kullanılarak reaksiyon koşulları aynı olan ve her birinde 100 pmol ilgili primerlerin kullanıldığı 3 farklı PCR gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamasında Vf1-Vr1 ile Vf2-Vr2'yi hedef alan PCR için toplam 25 µl karışım içerisine 10 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz ilave edildi. DNA Amplifikasyon için 94°C'de 3 dk ön denaturasyon

basamağını takiben 35 kez 94°C’de 60 sn denaturasyon, 50°C’de 45 sn annealing ve 72°C’de 90 saniye uzama aşamaları gerçekleştirildi. Son olarak, 72°C’de 7 dk son uzama aşaması ile amplifikasyon tamamlandı. BF-PCR için toplam 25 µl karışım içerisine 10 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz ilave edildi. DNA Amplifikasyon için 94°C’de 3 dk ön denaturasyon basamağını takiben 35 kez 94°C’de 60 sn denaturasyon, 55°C’de 60 sn annealing ve 72°C’de 90 saniye uzama aşamaları gerçekleştirildi. Son olarak, 72°C’de 7 dk son uzama aşaması ile amplifikasyon tamamlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %1,5’luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 460, 857 ve 609 bp’lik bant görülmesi sırasıyla V1, V2 ve BF genleri için pozitif olarak değerlendirildi.

D. nodosus izolatlarının thermostabil asit proteaz B (*aprV2/B2*), asidik proteaz V5 (ekstraselüler subtilisin-benzeri proteaz, *aprV5/B5*), serin proteaz (*bprB*) genlerinin varlığı Stauble et al. (2014)’ın bildirdiği yöntemle göre belirlendi. Söz konusu genlerin amplifikasyonu için kullanılan primerler Tablo 3.5’de sunuldu. Bu primerler kullanılarak reaksiyon koşulları aynı olan ve her birinde 100 pmol ilgili primerlerin kullanıldığı 3 farklı PCR gerçekleştirildi. Amplifikasyon için toplam 25 µl karışım içerisine; 10 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz ilave edildi. DNA Amplifikasyon için 94°C’de 3 dk ön denaturasyon basamağını takiben 35 kez 94°C’de 60 sn denaturasyon, 55°C’de 60 sn annealing ve 72°C’de 90 saniye uzama aşamaları gerçekleştirildi. Son olarak, 72°C’de 7 dk son uzama aşaması ile amplifikasyon tamamlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %1’lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 436, 1107 ve 1256 bp’lik bant görülmesi sırasıyla *aprV2/B2*, *aprV5/B5* ve *bprB* genleri için pozitif olarak değerlendirildi.

3.7. İzolatların Genotiplendirilmesi

İzolatların filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla ERIC-2 primeri kullanılarak Versalovic et al. (1991)’nın bildirdiği yöntemle göre RADP-PCR gerçekleştirildi. RAPD-PCR için toplam 25 µl olmak üzere DNaz/RNaz’dan arı distile su, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0.2 µM dNTP, 0.25 µM primer, 1U *Taq* Polimeraz enzimi ve 2 µl hedef DNA eklenerek PCR karışımı oluşturuldu. Amplifikasyon koşulları olarak thermalcycler cihazı 94°C’de 5 dk başlangıç denatürasyonu, 94°C’de

1 dk denatürasyon, 36°C’de 1 dk primer bağlanması, 72°C’de 3 dk uzama döngüsünden toplam 40 döngü ve son uzama aşaması 72°C’de 7 dakika olacak şekilde ayarlandı. Amplikonların görüntülenmesi amacıyla 1X TBE buffer içerisinde %1,5’luk agaroz içeren jel hazırlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %1,5’luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında oluşan bantlar kaydedildi. Oluşan bantların UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metotunu kullanan görüntü analiz programı ile değerlendirmesi yapıldı ve dendrogramları çizildi.



4. BULGULAR

4.1. Bakteriyolojik Örnekleme ve Lezyon Skorlaması

Proje kapsamında örnekleme yapılan hayvanlara ait ayak çürüğü lezyonlarının skorlama yöntemi ile değerlendirilmesi, lezyonların büyüklüğüne ve şiddetine göre gerçekleştirildi. Lezyon skorlama sonuçları Tablo 4.1’de sunuldu. Makroskopik değerlendirme sonucunda hayvanların 12 (%13,64), 39 (%44,32), 28 (%31,82) ve 9 (%10,22)’unda sırasıyla 1-4 lezyon skorlarına sahip olduğu saptandı.

Tablo 4.1. Bakteriyolojik örnekleme yapılan işletmeler ve lezyon skorlama sonuçları

İşletme No	Numune No	Lezyon Skoru	İrki	İlçe	<i>D. nodosus</i> izolasyonu
1	1	2	Sakız melezi	Canik	negatif
	2	3	Sakız melezi	Canik	negatif
	3	2	Sakız melezi	Canik	negatif
	4	2	Sakız melezi	Canik	negatif
	5	2	Sakız melezi	Canik	negatif
	6	3	Sakız melezi	Canik	negatif
2	7	2	Sakız melezi	Canik	negatif
	8	1	Sakız melezi	Canik	negatif
	9	1	Sakız melezi	Canik	negatif
	10	1	Sakız melezi	Canik	negatif
3	11	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	12	3	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	13	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	14	1	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	15	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	16	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	17	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
4	18	3	Kargılı	Tekkeköy	pozitif
	19	1	Kargılı	Tekkeköy	negatif
5	20	2	Kargılı	Tekkeköy	pozitif
	21	3	Kargılı	Tekkeköy	negatif
6	22	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	23	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	24	1	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	25	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	26	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif

Tablo 4.1. (devam)

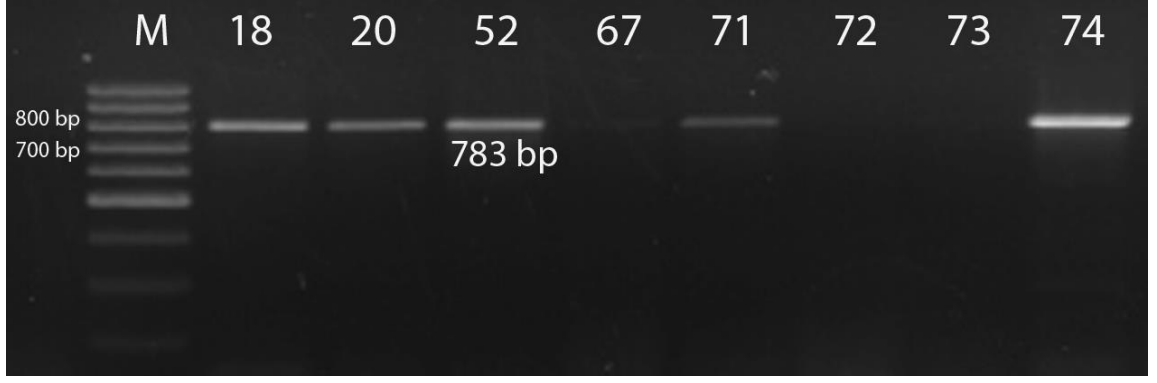
İşletme No	Numune No	Lezyon Skoru	İrki	İlçe	<i>D. nodosus</i> izolasyonu
7	27	3	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	28	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	29	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	30	3	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	31	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	32	2	Kargılı	Tekkeköy	negatif
	33	1	Kargılı	Tekkeköy	negatif
8	34	4	Sakız melezi	İlkadım	negatif
	35	3	Sakız melezi	İlkadım	negatif
	36	4	Sakız melezi	İlkadım	negatif
	37	1	Sakız melezi	İlkadım	negatif
	38	3	Sakız melezi	İlkadım	negatif
	39	3	Sakız melezi	İlkadım	negatif
9	40	3	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	41	2	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	42	3	Karayaka	Tekkeköy	negatif
10	43	3	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	44	3	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	45	3	Karayaka	Tekkeköy	negatif
11	46	3	Karayaka	Tekkeköy	negatif
12	47	4	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	48	4	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	49	4	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	50	4	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	51	3	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	52	3	Karayaka	Tekkeköy	pozitif
13	53	2	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	54	2	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	55	4	Karayaka	Tekkeköy	negatif
	56	4	Karayaka	Tekkeköy	negatif
14	57	3	Karayaka	Tekkeköy	negatif
15	58	3	Karayaka	Havza	negatif
	59	3	Karayaka	Havza	negatif
	60	2	Karayaka	Havza	negatif

Tablo 4.1. (devam)

İşletme No	Numune No	Lezyon Skoru	İrki	İlçe	<i>D. nodosus</i> izolasyonu
16	61	4	Keçi	Havza	negatif
	62	3	Keçi	Havza	negatif
	63	3	Keçi	Havza	negatif
	64	3	Keçi	Havza	negatif
17	65	2	Sakız melezi	Havza	negatif
18	66	2	Sakız melezi	Havza	negatif
	67	1	Sakız melezi	Havza	pozitif
19	68	2	Sakız melezi	Havza	negatif
	69	1	Sakız melezi	Havza	negatif
20	70	1	Sakız melezi	Havza	negatif
	71	2	Sakız melezi	Havza	pozitif
	72	1	Sakız melezi	Havza	negatif
	73	3	Sakız melezi	Havza	negatif
21	74	2	Sakız melezi	Havza	pozitif
	75	2	Sakız melezi	Havza	negatif
22	76	2	Karayaka	Bafra	negatif
23	77	2	Karayaka	Bafra	negatif
24	78	2	Karayaka	Bafra	negatif
	79	2	Karayaka	Bafra	negatif
	80	3	Karayaka	Bafra	negatif
25	81	2	Karayaka	Bafra	negatif
	82	2	Karayaka	Bafra	negatif
26	83	2	Karayaka	Bafra	pozitif
	84	2	Karayaka	Bafra	pozitif
27	85	2	Karayaka	Bafra	negatif
	86	2	Karayaka	Bafra	pozitif
	87	3	Karayaka	Bafra	negatif
	88	3	Karayaka	Bafra	pozitif

4.2. *D. nodosus* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

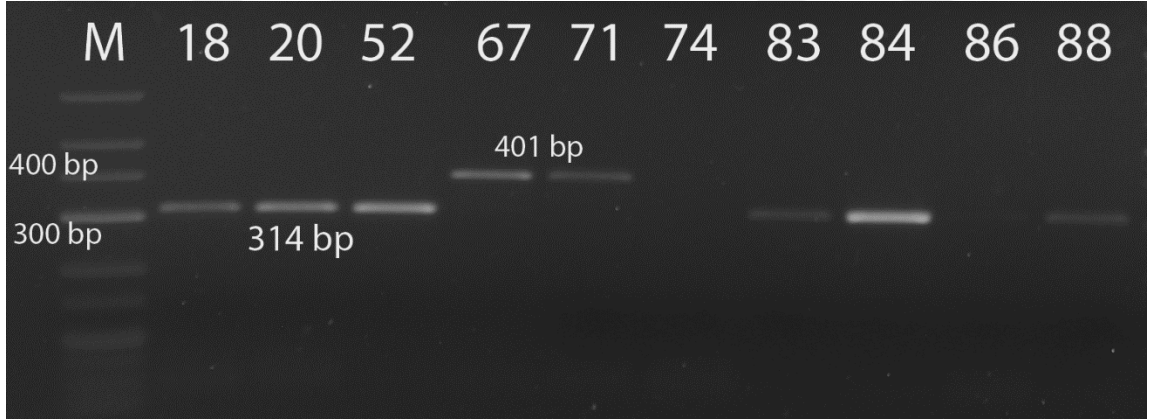
Laboratuvara ulaştırılan 88 adet svap örnekleme sinin tamamında bakteri üremesi görüldü. İnkübasyon süresi sonunda üreyen *D. nodosus* şüpheli kolonilerin identifikasyonu amacıyla yapılan PCR sonrasında 783 bp'lik bant görülen 10 adet bakteri (18, 20, 52, 67, 71, 74, 83, 84, 86, 88 no'lu izolatlar) *D. nodosus* için pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *D. nodosus* spesifik PCR görüntüsü

4.3. *D. nodosus* İzolatlarının Serogruplandırılması

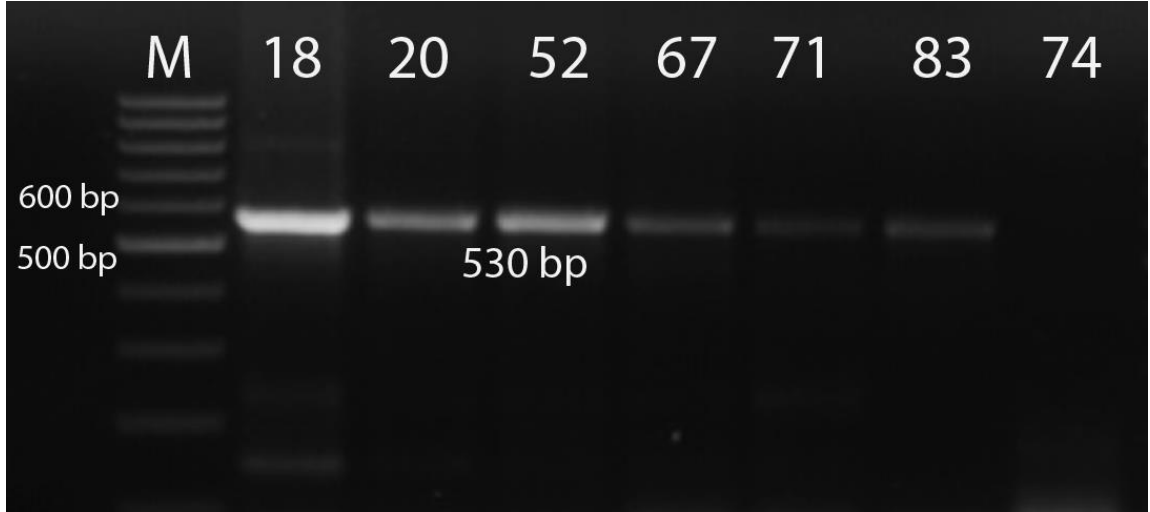
D. nodosus izolatlarının serogruplandırılması için yapılan konvansiyonel mültipleks PCR değerlendirilmesi sonucunda 410, 281, 326, 314, 356, 239, 278, 401 ve 188 bp'lik bantlar sırasıyla serogrup A, B, C, D, E, F, G, H ve I serogrupları için pozitif olarak kabul edildi. PCR sonucunda 7 izolat (18, 20, 52, 83, 84, 86, 88 no'lu izolatlar) 314 bp ve 2 izolat (67, 71 no'lu izolatlar) da 401 bp'lik bant oluşturdu. Bir izolat (74 no'lu izolat) ise PCR'da sonuç vermedi. Bu sonuçlara göre 7 izolat serogrup D ve 2 izolat da serogrup H olarak tanımlandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *D. nodosus* serogruplandırması için yapılan multipleks PCR görüntüsü. 18, 20, 52, 83, 84, 86, 88: serogrup D; 67, 71: serogrup H; 74: negatif

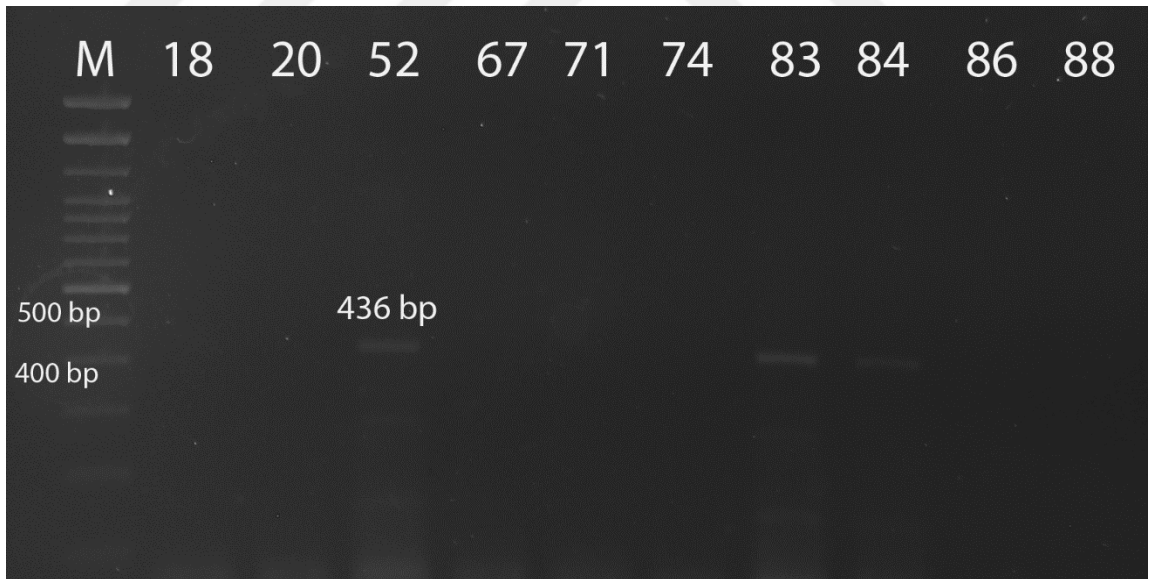
4.4. İzolatların Virülensinin PCR ile Belirlenmesi

D. nodosus izolatlarının *intA* geni varlığının belirlenmesi için yapılan PCR sonucunda 9 izolatın (18, 20, 52, 67, 71, 83, 84, 86, 88 no'lu izolatlar) 530 bp'lik bant oluşturduğu ve *intA* pozitif olduğu görüldü (Şekil 4.3). Bir izolat (74 no'lu izolat) ise PCR'da sonuç vermedi ve *intA* negatif olarak değerlendirildi.

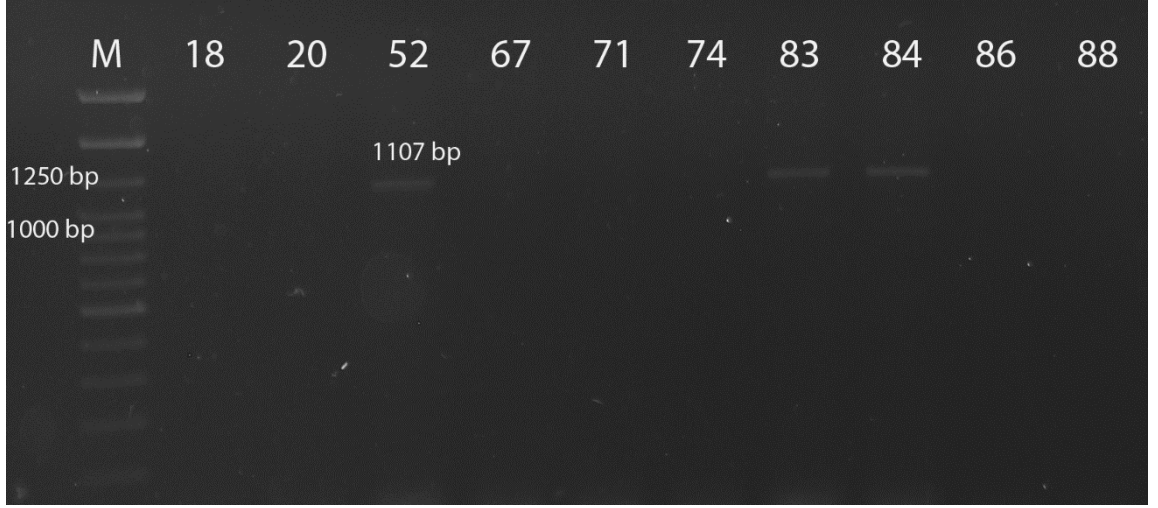


Şekil 4.3. *D. nodosus* virülensinin belirlenmesi için yapılan PCR görüntüsü.18, 20, 52, 67, 71, 83: *intA* pozitif; 74: *intA* negatif

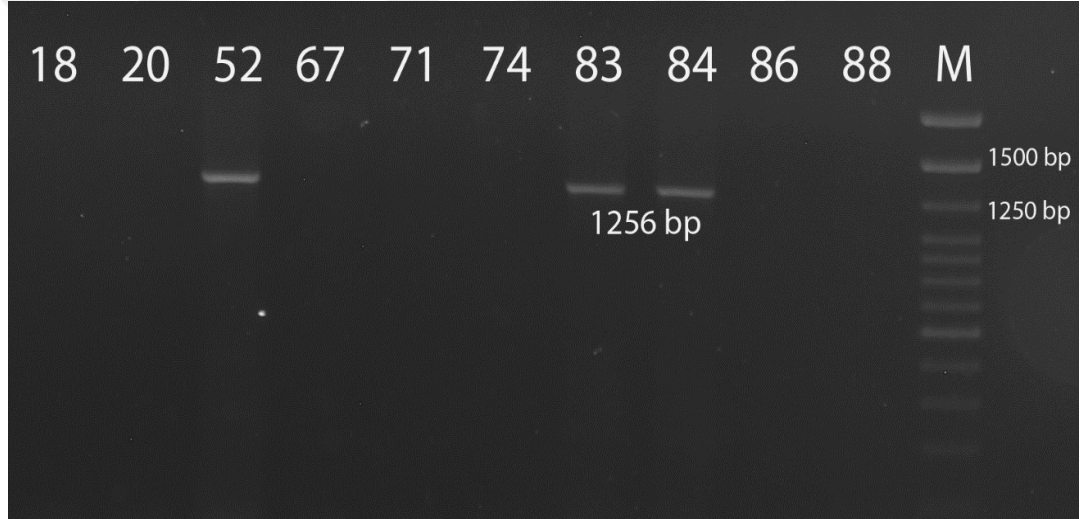
Termostabil asit proteaz B (*aprV2/B2*), asidik proteaz V5 (ekstraselüler subtilisin-benzeri proteaz, *aprV5/B5*), serin proteaz (*bprV/B*) için yapılan PCR sonucunda aynı 3 izolatın (52, 83, 84 no'lu izolatlar) 436, 1107 ve 1256 bp'lik bant oluşturduğu ve pozitif sonuç verdiği saptandı (Şekil 4.4-4.6). Diğer izolatlar ise PCR'da sonuç vermedi ve söz konusu genler yönünden negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.4. *D. nodosus aprV2/B2* gen varlığının PCR görüntüsü. 52, 83 ve 84 no'lu izolatlar *aprV2/B2* pozitif

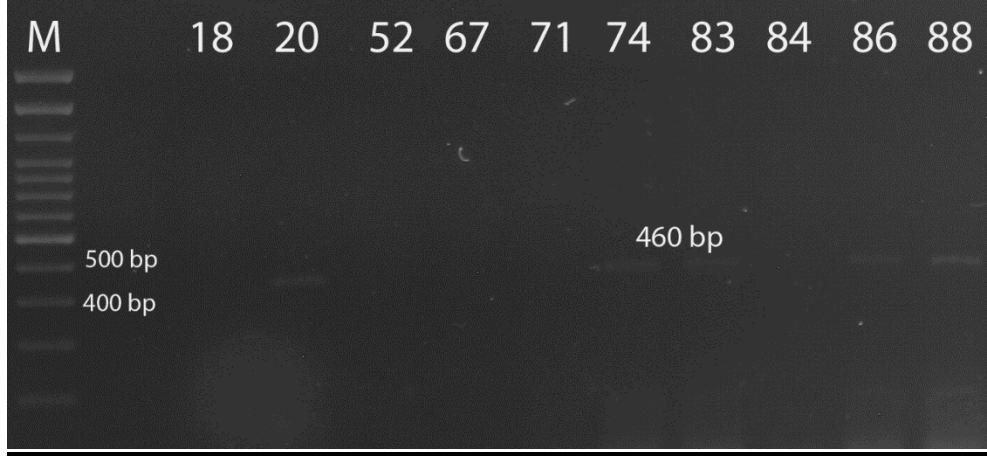


Şekil 4.5. *D. nodosus aprV5/B5* gen varlığının PCR görüntüsü. 52, 83 ve 84 no'lu izolatlar *aprV2/B2* pozitif



Şekil 4.6. *D. nodosus bprV/B* gen varlığının PCR görüntüsü. 52, 83 ve 84 no'lu izolatlar pozitif

D. nodosus izolatlarının virüent ve benign klonlarına ait gen dizisi varlığı Vf1 - Vr1 ile Vf2 - Vr2 ve Bf - Br primerleri kullanılarak araştırıldı. PCR sonucuna göre 5 izolat (20, 52, 83, 84, 88) V1 primeri ile pozitif sonuç verdi (Şekil 4.7). V2 ve B primerleri ile yapılan PCR'da ise bant görülmedi ve bu gen varlıkları yönünden negatif olarak değerlendirildi.

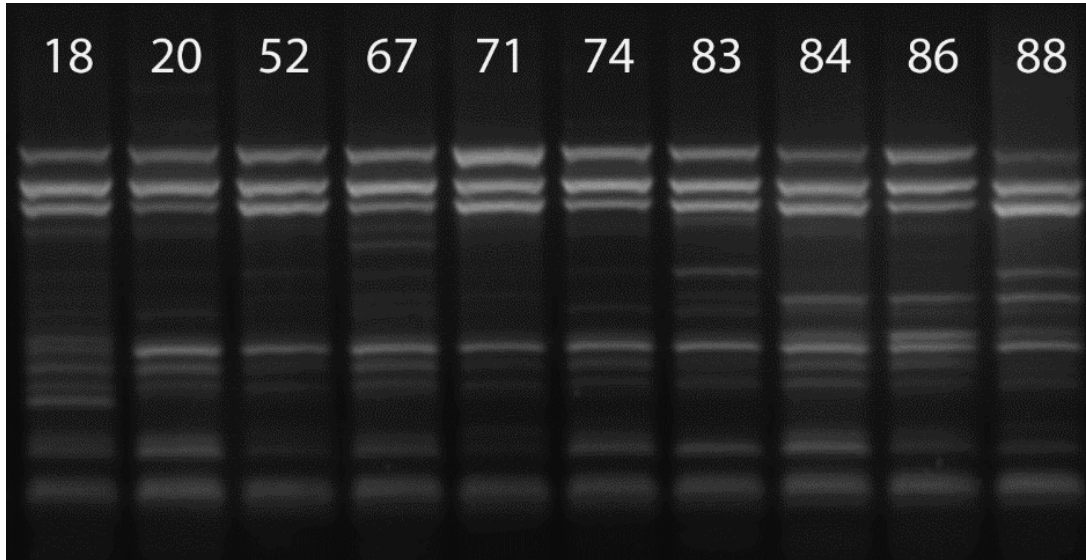


Şekil 4.7. *D. nodosus* virülensinin belirlenmesi için V1 primeri ile yapılan PCR görüntüsü. 20, 74, 83, 86 ve 88 no'lu izolatlar pozitif

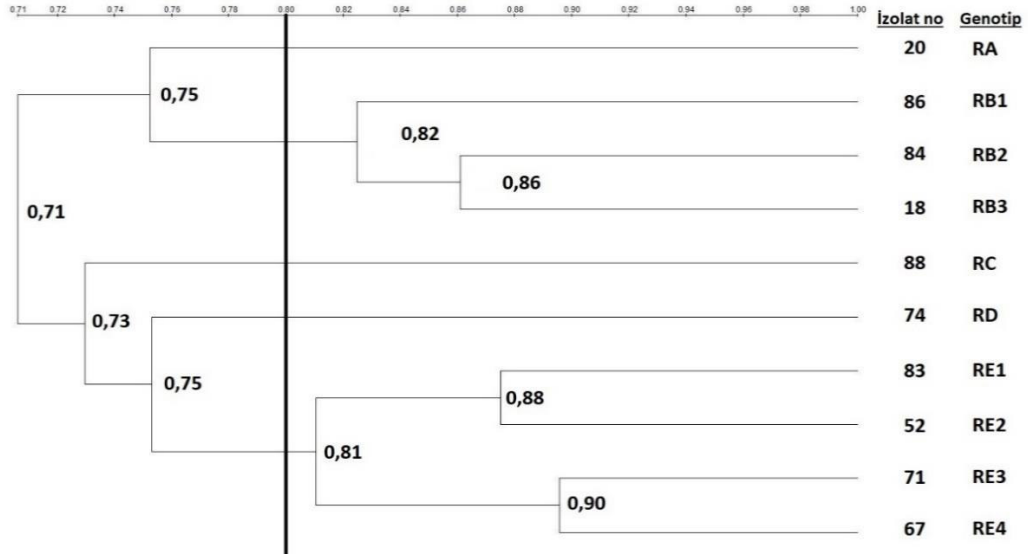
4.5. İzolatların Genotiplendirilmesi

İzolatların filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan RADP-PCR sonrasında elde edilen bantlar, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metotunu kullanan görüntü analiz programı ile dendrogramları çizildi (Şekil 4.8 ve 4.9).

Dendrogramın değerlendirmesi sonucunda izolatların %71-90 arasında benzerlik gösterdiği belirlendi. Genotiplendirme amacıyla da %80 benzerlik eşik değeri temel alınarak 3 tekli (RA, RC, RD) ve 2 çoklu (RB, RE) genotip belirlendi. Çoklu genotiplerden RB'nin 3 ve RE'nin de 4 izolatı içerdiği saptandı.



Şekil 4.8. *D. nodosus* izolatlarının RAPD-PCR görüntüsü



Şekil 4.9. *D. nodosus* izolatlarının filogenetik analizi

4.6. Bulguların Toplu Değerlendirmesi

Elde edilen bulgular doğrultusunda (Tablo 4.2), Samsun ve çevresinde D serogrupuna ait *D. nodosus* suşlarının baskın olduğu görüldü. Serogrup D'ye ait 52, 83 ile 84 no'lu izolatların intA, aprV2/B2, aprV5/B5, bprV/B ve VF1 spesifik PCR sonucunda pozitif olduğu görüldü. Bu izolatlar PCR sonucuna göre virüent suşlar olarak değerlendirildi. Bu üç izolattan 52 ve 83'ün filogenetik olarak %88 oranında benzerlik gösterdiği ve 84 no'lu izolat ile benzerlik oranının da % 71 olduğu belirlendi.

Tablo 4.2. Çalışma sonucunda elde edilen bulguların toplu sunumu

İzolat no	Serogruplandırma				Virülens genleri				Genotip
	D	H	I	INT	aprV2/B2	aprV5/B5	bprV/B	VF1	
18	+	-	-	+	-	-	-	-	RB
20	+	-	-	+	-	-	-	+	RA
52	+	-	-	+	+	+	+	+	RE
67	-	+	-	+	-	-	-	-	RE
71	-	+	-	+	-	-	-	-	RE
74	-	-	-	-	-	-	-	-	RD
83	+	-	-	+	+	+	+	+	RE
84	+	-	-	+	+	+	+	+	RB
86	+	-	-	+	-	-	-	-	RB
88	+	-	-	+	-	-	-	+	RC

5. TARTIŞMA

Ayak çürüğü, anaerobik bir bakteri olan *D. nodosus*'un neden olduğu bulaşıcı bir koyun ve keçi hastalığıdır. Hastalık koyun ve keçilerde topallık ile sonuçlanmakta ve buna bağlı olarak verim kaybı oluşmaktadır. Ayak çürüğü koyun ve keçilere özgü bulaşıcı bir hastalık olmasına rağmen sığır, at, domuz ve geyiklerde de bildirilmiştir (Beveridge, 1967; Ghimire et al., 2002). Hastalık tırnak matriksinin ve tırnak arası derisinin nekrozunu takip eden eksudatif bir yangı ile karakterizedir. Yangı sonucunda tabandaki yumuşak doku, toynaktan ayrılır. Etkilenen hayvanlarda topallık, vücut kondüsyon skorunda kayıplar, yün ve et üretiminde azalma ve fertilitede düşüş şekillenmektedir (La Fontaine et al., 1993; Stewart, 1989). *D. nodosus* ilk defa 1941 yılında Beveridge tarafından ayak çürüğüne neden olan etken olarak tanımlanmıştır. Deneysel çalışmalar ile ayak çürüğünün meydana gelmesi için sadece *D. nodosus*'un yeterli olduğu sonucuna varılmasına rağmen, *Fusobacterium necrophorum* ve *Spirochaetes*'lerin dâhil olduğu diğer bakteri türleri ile miks enfeksiyon mevcut olduğu zaman hastalık daha şiddetli seyretmektedir (Clifton and Green, 2016). Bazı patogenezi çalışmalarında *D. nodosus*'un kolonize olabilmesi için öncesinde *F. necrophorum*'un mevcut olması gerekliliği bildirilmektedir (Roberts and Egerton, 1969). Ayak çürüğünün klinik olarak virülent ayak çürüğü (VFR), intermediate ayak çürüğü (IFR), benign ayak çürüğü (BFR) olmak üzere 3 ayrı klinik formu tanımlanmıştır. Bu klinik formlar tek başlarına görülebildiği gibi miks enfeksiyonlar da oluşabilmektedir (Stewart, 1989). Ayak çürüğü ayakta lezyonlara göre ayırt edilebilen bir hastalıktır. Hastalıktan etkilenmiş hayvanlarda klinik bulgular hafif bir tırnak arası yangıdan, tırnaktan yumuşak dokuların ayrılmasına ve tabanda irinli yangıya kadar geniş bir değişkenlik gösterir (Beveridge, 1941). Ayak çürüğünün subjektif değerlendirilmesi ve lezyonların büyüklüğünün ve şiddetinin standardize edilebilmesi için skorlama sistemi geliştirilmiştir (Raadsma and Egerton, 2013): Skor 0, Normal kuru veya ıslak deri; Skor 1: Sınırlı ID; Skor 2: Daha yaygın ID; Skor 3: Şiddetli ID, taban ve topuğun yumuşak dokunun ayrılması; Skor 4: Skor 3'e ilave olarak ayrılmanın tırnak duvarına doğru uzaması. Proje kapsamında Samsun ve çevresinde bulunan koyun ve keçi işletmelerinde bulunan koyunlardan ayak problemi yaşayan ve klinik olarak enfekte toplam 88 adet hayvanın ayak çürüğü lezyonlarının skorlama yöntemi ile değerlendirilmesi lezyonların büyüklüğüne ve şiddetine göre gerçekleştirildi. Makroskopik değerlendirme sonucunda hayvanların 12 (%13,64), 39

(%44,32), 28 (%31,82) ve 9 (%10,22)'unda sırasıyla 1-4 lezyon skorlarına sahip olduğu saptandı. Koyun ve keçiler arasında lezyon skorlarında niteleyici ve niceleyici farklılıkları değerlendiren metotlar, konakçı cevabının tahmin edilmesi için önemli olarak kabul edilmektedir. Her 8 tırnakta lezyonları değerlendiren metotlar, ayak içinde tırnakta değerlendirme yapmayan metotlara göre daha etkin bulunmuştur. Whittington ve Nichols (1995), koyun piyeten hastalığının akut fazında bireysel lezyonların derecelendirilmesini gerçekleştirmişler ve derecelendirmenin saha çalışmaları, çiftlik çalışmaları ve ahır çalışmalarının çoğu tipi için uygun olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bu çalışmada koyun piyeten hastalığında lezyonların derecelendirilmesi oldukça zor ve subjektif olarak değerlendirildi.

Ayak çürüğünün laboratuvar teşhisinde interdigital bölgenin özellikle lezyonlu kısımlarından alınan svaplar kullanılmakta ve *D. nodosus* varlığını belirlemek için Gram boyamayı takiben mikroskopi, kültür veya PCR gibi metotlar ile teşhis yapılmaktadır. Bakteriyoskopi ve kültür sonuçlarını doğrulamak için PCR ve MALDI-TOF-MS gibi ek metotlar tercih edilmektedir (Frosth, 2016). Serolojik teşhis amacıyla yapılan çalışmalarda virulent ve benign suşlara özgü monoklonal antikorlar kullanılarak farklı izolatlarda belirli proteazların varlığını ortaya koymak için ELISA yöntemleri geliştirilmiştir. ELISA'nın doğruluğu ile elastaz ve jelatin jel testleri gibi konvansiyonel testler arasındaki korelasyonun sınırlı olduğu görülmüştür (Dhungyel et al., 2002; Links et al., 1995). Bu yüzden antijen antikor reaksiyonuna dayanan serolojik testler teşhis için tercih edilmemektedir. *D. nodosus*'un belirlenmesi için geliştirilmiş olan PCR yöntemleri hızlı ve hassas olduklarından günümüzde büyük ölçüde kabul görmüşlerdir (de Albuquerque, 2019). Bu amaçla birkaç farklı hedef gen belirlenmiştir. Bunlardan ilki 1993 yılında tanımlanan 16S rRNA genidir (La Fontaine et al., 1993). *D. nodosus*'un 16S rRNA geninin değişken bölgesini hedefleyen konvansiyonel PCR testi geliştirilmiştir (La Fontaine et al., 1993). Moore vd. (2005) tarafından bu cPCR testi modifiye edilmiştir. Frosth vd. (2012) tarafından 16S rRNA genini hedefleyen qPCR testi geliştirilmiş ve testin Moore vd. (2005) tarafından geliştirilen cPCR testinden daha hassas olduğu bildirilmiştir. *D. nodosus*'un laboratuvar teşhisinde ayrıca fimbrial gen sekanslarının tanımlanması sonrasında *D. nodosus*'un *fimA* genini belirleyebilen ve u1, u2, d1, d2 ve d3 primerlerinin kullanıldığı PCR metodu geliştirilmiştir (Zhou and Hickford, 2000). RNA polimeraz'ın sigma-70 faktörünü kodlayan ve genomda tek kopyası olan *rpoD* geninin de *D. nodosus* tespiti için uygun bir hedef olduğu kanıtlanmıştır (de Albuquerque, 2019). *D. nodosus*'un

genomunda üç kopyası olan *16S rRNA* geninin hedef alındığı testlerin duyarlılığı genomda tek kopyası olan genlere göre daha yüksek olduğu için *D. nodosus*'un tespitinde *16S rRNA* geninin hedef gen olarak tercih edilmesi daha uygun bulunmuştur (La Fontaine and Rood, 1996). Genomunda üç kopyası olan *16S rRNA* genini hedefleyen analizlerin duyarlılığının, tek kopya genleri hedefleyen testlerden daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür (Mc Pherson, 2018). *D. nodosus* türleri için spesifik olan ve tüm suşlarda mevcut olan polinükleotid fosforilaz geni (*pnpA*) de teşhis için alternatif bir gendir (Whittle et al., 1999). Calvo-Bado vd. (2011) polimeraz sigma-70 faktör genini (*rpoD*) hedefleyen bir eş zamanlı qPCR testi geliştirmiştir. Cheetham et al. (2006) polinükleotid fosforilaz genini (*pnpA*) hedefleyen konvansiyonel PCR ve. Stäuble et al. (2014) da polinükleotid fosforilaz genini (*pnpA*) hedefleyen qPCR testi geliştirmiştir. Serotip ve virülens tespiti için geliştirilen PCR testlerinin de ayrıca *D. nodosus*'un belirlenmesi içinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Dhungyel et al., 2013; Greber et al., 2016; Locher et al., 2015).

İsveç'te farklı piyeten lezyonları gösteren koyun sürülerinde *D. nodosus* ve *F. necrophorum* varlığı gösterilmiştir (Frosth et al., 2015). İngiltere'de de topallık görülen koyunların %90'ından fazlasına *D. nodosus*'un neden olduğu bildirilmiştir (Smith et al., 2017). Avustralya'da 12 merinos sürüsünden ayak lezyonu bulunan 260 koyundan alınan 269 ayak svapından 290 *D. nodosus* izolatu elde edilmiştir (Mc Pherson et al., 2018). König vd. (2001), İsveç'te koyunlarda piyetenin görülme sıklığını %5,8 olarak bildirmişlerdir. Wani vd. (2015) tarafından koyun ve keçilerde 216 adet piyeten lezyonlu örnek incelenmiş ve örneklerin %6,48'inin *D. nodosus* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar Hindistan'da yaptıkları diğer bir çalışmada 2374 piyeten örneğinin %60,90'ının PCR ile *D. nodosus* pozitifliği gösterdiğini bildirmişlerdir (Wani et al., 2019). Keşmir'de yapılan bir çalışmada piyetenin prevalansı %12,54 olarak belirlenmiştir (Rather et al., 2011). Kumar vd. (2016), piyetenli koyunlardan alınan örneklerin %45,94'ünde ve keçilerden alınan örneklerin %30,30'unda PCR ile *D. nodosus* pozitifliği rapor etmişlerdir. Piyeten hastalığı ile ilgili ülkemizde sınırlı sayıda mikrobiyolojik çalışma bulunmaktadır. Özgen vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada piyetenli koyunlardan alınan 83 svap örneğinde *D. nodosus* pozitiflik oranını %55,4 olarak saptanmıştır. Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada, Kars ve yöresinde 10 farklı sürüye ait koyunların %2,75'sinin piyeten şüpheli olduğu ve alınan örneklerin %82,99'undan bakteriyel izolasyon gerçekleştirildiği bildirilmiştir. İzole edilen bakterilerin %78,46'sı PCR ile *D. nodosus*

olarak belirlenmiştir (Çelebi vd., 2016). Araştırmacılar, Kars yöresindeki koyunlarda hastalığın prevalansının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında incelenen 88 adet örneğin tamamından bakteriyel izolasyon gerçekleştirildi ve *D. nodosus* şüpheli kolonilerin identifikasyonu amacıyla spesifik 16S rRNA genini hedef alan PCR sonrasında 10 adet (%8.8) izolat *D. nodosus* için pozitif olarak değerlendirildi. Literatürde *D. nodosus* prevalans bulguları geniş bir aralık içerisinde rapor edilmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da Samsun İli ve çevresinde *D. nodosus*'un piyeten vakalarından sorumlu olduğunu gösterdi. Çalışmada bildirilen sonuçlar izolasyon oranını göstermekte olup, örneklerden direkt olarak PCR ile etken belirlenmesi ile prevalansın daha yüksek bulunabileceği düşünüldü.

D. nodosus hem bağışıklıkta hem de patojenitede önemli rol oynayan çok sayıda fimbriaya (pili) sahiptir (Vijayalakshmi, 2017). *D. nodosus* fimbriyası yaklaşık 6 nm çapında ve 10 µm uzunluğundadır (Stewart, 1973). Fimbria *fimA* geni tarafından kodlanmakta ve tek bir alt ünite pilinin (fimbria proteini) polimerlerinden oluşmaktadır (Billington et al., 1996). *D. nodosus*'un farklı suşlarının fimbrial alt ünite proteinlerinin 16,5 -19 KDa moleküler ağırlığında olduğu bildirilmiştir (Mattick et al., 1984). Fimbrianın fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen, bakterinin tırnağın epidermal matriksine adhezyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Virü lent izolatlar çok sayıda fimbria içerirken, avirü lent veya benign izolatların az sayıda fimbriaya sahip olduğu veya fimbria içermediği bildirilmiştir (Depiazzi and Richards, 1985; Stewart et al., 1986). *D. nodosus*'un fimbriyası yüksek derecede immunojeniktir ve serogruplandırmanın temelini oluşturur (Claxton, 1989). *D. nodosus* izolatları fimbrial gen bölgesinin genetik organizasyonu ve FimA proteinindeki yapısal varyasyonlara dayanarak iki büyük sınıfa ayrılmıştır (Hobbs et al., 1991; Mattick et al., 1991). Sınıf I suşlar *fimA* geninin aşağı yönünde lokalize olan *fimB* gen bölgesini, Sınıf II suşlar ise *fimA* geninin aşağı yönünde lokalize olan *fimC*, *fimD* ve *fimZ* gen bölgelerini içermektedir (Hobbs et al., 1991). Kennan vd. (2011) *fim B* geninin fimbrial biyogenez için gerekli olmadığını bildirmiştir. Hobbs vd. (1991) hem *fim B* hem de *fim D*'nin fimbrial yapılanmaya dâhil olan, iç membran proteini olduğu kabul edilen bir proteini kodladığını ve *fimD* geninin sınıf II suşlarda *fimB* geninin fonksiyonel analogu olabileceğini bildirmiştir. Kennan vd. (2014) *fimC*, *fimD* ve *fimZ* genlerinin fonksiyonunun henüz açıklığa kavuşturulamadığını bildirmiştir. Fimbrial gen bölgeleri yukarı yönde *aroA* ve aşağı yönde *clpB* geninin arasında yer almaktadır. *aroA* geni enopiruvil shikimat-3-fosfat sentetazı kodlarken,

clpB ise ATP bağımlı bir proteaz genidir. Hobbs vd. (1991) bu iki gen tarafından kodlanan proteinlerin tip IV fimbriaya sahip olmayan bakterilerin çoğunda bulunduğu için, fimbriyal fonksiyon ya da morfogenez sebebin olmadığını bildirmiştir. Serolojik çeşitliliğin temelinde fimbriyal yapıdaki varyasyonların neden olduğu ileri sürülmüştür (Elleman, 1988). Güncel olarak *D. nodosus*'un 10 farklı serogrubu (A, B, C, D, E, F, G, H, I ve M) tanımlanmıştır (Claxton, 1989; Ghimire et al., 1998). Bu serogruplar da cross-absorbsiyon testlerine göre 19 serotipe (A1, A2, B1, B2, B3, B4, C1, C2, D, E1, E2, F1, F2, G1, G2, H1, H2, I ve M) ayrılmıştır (Claxton et al., 1983; McKern et al., 1989). Serogrup A, B, C, E, F, G, I ve M sınıf I fimbriyal alt üniteye sahip iken, serogrup D ve H sınıf II fimbriyal alt üniteye sahiptir (Ghimire et al., 1998; Hobbs et al., 1991).

Geçmişte *D. nodosus*'un serogruplandırması zaman alıcı bir süreç olan bakteriyel izolasyon, kültür ve lam aglütinasyon testi ile gerçekleştirilmekteydi (Best et al., 2018). Son yıllarda on serogrubun dokuzunu ayırt etmeyi mümkün kılan serogrup spesifik multipleks PCR testi geliştirilmesi, serogrupların belirlenmesini kolaylaştırmış ve test süresini kısaltmıştır (de Albuquerque, 2019). *fimA* genini hedefleyen serogrup spesifik PCR testlerine göre *D. nodosus* 9 serogruba ayrılmıştır (Dhungyel et al., 2002). Tip IV fimbria alt ünitesinin karboksi-terminal bölgesindeki varyasyonlara dayanarak ise 10 serogrubu (A-I ve M) belirlenmiştir (Dhungyel et al., 2002; Ghimire et al., 1998). Dokuz major serogrubun fimbriyal alt ünitelerindeki genleri sekanslanmıştır (Hobbs et al., 1991; Mattick et al., 1991). Serogrup M'nin genetik dizilenmesi henüz yapılmadığı için ve uygun primer mevcut olmadığından dolayı, identifiye edilmesi için kültür ve lam aglütinasyon testi bu serogrup için geçerliliğini korumaktadır (Best et al., 2018). Moore vd. (2005), İngiltere ve Galler'deki piyeten vakalarından elde edilen izolatları lam aglütinasyon testi ile serogruplandırmışlar ve Serogrup H'nin baskın olduğu bildirmişlerdir. Zou ve Hickford (2000), Yeni Zelanda'da predominant olarak serogrup B'yi bildirmişler ve ayrıca F, H, G serotiplerini rapor etmişlerdir. Rather vd. (2011), Keşmir'de *D. nodosus* suşlarında B, D, E, I ve G serogruplarını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Vijayalakshmi (2017), Hindistan'da 86 *D. nodosus* izolatının %67,47'sinin serogrup B, %27,91'sinin serogrup I, %6,98'sinin serogrup A, %2,33'ünün serogrup E ve %1,16'sının serogrup H olduğunu rapor etmişlerdir. Best vd. (2018) Avustralya'da *D. nodosus* suşlarını serogruplandırmışlar ve en yaygın olarak serogrup B bulunurken, diğerleri A, G, H, I, C, D, E ve F olarak bildirmişlerdir. Çalışmada

örneklene sürülerin %50'sinde birden fazla serogrup gözlenirken, %50'sinde sadece bir serogrup olduğu belirtilmiştir. Wani vd. (2007) tarafından Hindistan'ın Keşmir bölgesinde izole edilen *D. nodosus* suşlarının 2 örnek hariç hepsinin serogrup B ve diğer 2'sinin de serogrup E olduğunu bildirilmiştir. Wani vd. (2019) yaptıkları diğer bir çalışmada ise *D. nodosus* izolatlarının %92,46'sının serogrup B, %17,08'inin serogrup E, %5,94'ünün serogrup I ve %0,069'unun serogrup G olduğunu rapor etmiştir. Çalışmada B ve E serogruplarının %8,78'inde, B ve I serogruplarının %3,18'inde ve B, E ve I serogruplarının %1,79'unda mik s enfeksiyon saptanmıştır. Bhat vd. (2012), Hindistan'ın farklı bölgelerinden 220 piyetenli koyundan izole ettikleri pozitif örneklerin %83,60'ında serogrup B'yi tespit etmişlerdir. Hadimli vd. (2018), yaptıkları projede izole edilen *D. nodosus* suşlarının 9'unun serotip F, 2'sinin serotip I ve 2'sinin de F ve I olduğunu saptamışlardır. Kumar vd. (2013) 16 adet *D. nodosus* ile yaptıkları çalışmada izolatların %43,76'sının serogrup B, %25'inin serogrup A ve % 18,75'inin serogrup I olduğunu bildirmişlerdir. Kumar vd. (2016) da yaptıkları çalışmada *D. nodosus* serogrup H, B ve I'nın yaygın olarak bulunduğunu tespit etmişlerdir. İngiltere'de 164 sürüde yapılan bir çalışmada H ve B serogruplarının dominant olduğu saptanmıştır (Prosser et al., 2020). Tez çalışmasında *D. nodosus* izolatlarının serogruplandırılması için konvansiyonel multipleks PCR gerçekleştirildi ve PCR sonucuna göre 7 izolat serogrup D (%70) ve 2 izolat (%20) ise serogrup H olarak tanımlandı. Literatürde Dünyanın çeşitli bölgelerinde görülen serogruplar çok çeşitlilik gösterdiği ve serogrup B'nin en fazla bölgede görülen serogrup olduğu belirlenmiştir. Konya ve çevresinde yapılan bir projede de F ve I serogrupları saptanmıştır (Hadimli vd., 2018). Bununla beraber çalışmamızda D serogrubunun baskın olarak belirlenmesi diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir. *D. nodosus* serogruplarının çeşitliliğinden dolayı aşı çalışmalarının farklı serogruplar ile tekli ya da çoklu olarak gerçekleştirilmesi ve uygulanacağı bölgede dominant olan serogrupları hedef alması gerektiği kanısına varıldı.

D. nodosus suşlarının virülensi genellikle mevsimsel faktörler ve yerel koşullardan etkilenir. Ayak çürüğü virülensinin klinik teşhisi öznel ve kesin bir ayırım yapılamamaktadır (Liu et al., 1994). Virulent ve benign suşlar arasında ayırım yapılabilmesi için son 20 yılda elastaz, jelatin testi ve elektroforetik zimogram testleri de dahil olmak üzere çeşitli laboratuvar testleri geliştirilmiştir (Depiazzi et al., 1991; Liu and Yong, 1993; Palmer, 1993). Deneysel çalışmalardan elde edilen veriler elastaz testi dışında net bir sonuç alınamadığını göstermiştir. Bununla beraber,

intermediate ayak çürüğünün teşhisinde elastaz testi de yeterli bulunmamıştır. Bazı izolatlar düşük elastaz aktivitesi gösteren termostabil proteazlar üretebilmekte veya tam tersi bir durum da oluşabilmektedir (Liu and Yong, 1993). Ayrıca fizyobiyokimyasal değerlendirmeye dayandıkları için *D. nodosus*'un fenotipik özellikleri birçok faktöre bağlı olarak değişebilir ve bakterilerin fenotipik ifadesinde varyasyonlar gözlenebilir. Ayrıca bu testler 10-35 gün arasında sonuç verebilmekte ve bu durum da tedavi ve kontrol programlarının uygulanmasını geciktirmektedir. *D. nodosus* suşlarının patojenik kapasitesinin DNA düzeyinde belirlenmesi, test sonuçlarının herhangi bir dış faktörden etkilenme olasılığını ortadan kaldıracaktır.

D. nodosus yaklaşık 1 400 bp'lik oldukça küçük bir genoma sahiptir ve genomun yaklaşık %20'si lateral gen transferi ile kazanılmıştır. Bu lateral gen transfer bölgeleri çoğunlukla virülens ile ilişkilendirilmiştir. Hücre içi bakterilerin genomlarından farklı olarak biyosentez yeteneği de büyük ölçüde korumuştur (Myers et al., 2007). Kennan vd. (2014) tarafından 103 izolat ile yapılan çalışmada genomun %95 oranında korunduğu tespit edilmiştir. Bu 103 izolatın bir veya daha fazlasında farklı bulunan 31 627 nükleotid, tek nükleotid polimorfizm analizine göre değerlendirilmiştir ve izolatlar iki farklı dala (clade I ve clade II) ayrılmıştır. Bu ayırım virulent ve benign hastalık görünümü ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca virulent suşlar tarafından üretilen AprV2, benign suşlar tarafından üretilen AprB2 proteazlarındaki tek bir aminoasit farklılığı da bu ayrımı desteklemiştir. İncelenen izolatların benzer fimbriaya sahip oldukları fakat farklı ekstraselüler proteazları içerdikleri tespit edilmiştir. *D. nodosus*'un virulent suşları subtilisin benzeri ekstraselüler proteazlar sentezler. Asidik proteaz izoenzim 2 (AprV2), asidik proteaz izoenzim 5 (AprV5) ve bazik proteaz (BprV) olarak isimlendirilen bu proteazlar, sırasıyla *aprV2*, *aprV5* ve *bprV* genleri tarafından kodlanır (Billington et al., 1996; Lilley et al., 1992). Bu proteaz genleri kromozomun yüksek oranda korunmuş bölgelerine lokalize olmuştur. *aprV5* ve *bprV* genleri birbirine çok yakın, *aprV2* ise farklı bir bölgede yer alır (Han et al., 2012). Benign suşlar analog proteazlar olarak AprB2, AprB5 ve BprB'yi salgılar ve bunlar da sırasıyla *aprB2*, *aprB5* ve *bprB* genleri tarafından kodlanır (Billington et al., 1996; Kortt and Stewert, 1994). Virulent suşlarda yer alan üç genden biri olan *aprV2*, bir diğer asidik proteaz olan *aprV5* ve bazik proteaz *bprV* ile sırasıyla nükleotid ve aminoasit düzeyinde yaklaşık %70 benzerlik gösterir. Benign suşlar tarafından üretilen proteazlar sadece birkaç aminoasit değişimine neden olacak şekilde virulent suşlara göre sekans farklılığı gösterir. Proteaz *aprV5* ve *aprB5* sekansları DNA

düzeyinde %99 benzerlik gösterir. Matur bölgede bir ve ön uç bölgede (pre-pro region) bir olmak üzere sadece iki aminoasit değişikliği görülür. %99 benzerlik gösteren aminoasit dizileri ise yine ön uç bölgede ve matur bölgede yer alır (Riffkin et al., 1993).

D. nodosus'un virulensi kısmen *aprV2* tarafından kodlanan bir proteazın salınmasına bağlıdır. Hücre dışı *aprV2*, *aprV5* ve *bprV* proteaz genleri de mutasyona uğramıştır. Bu mutantların analizi; *AprV5*'in büyük hücre dışı proteaz olduğunu ve *AprV2*'nin hücre dışı elastaz aktivitesinden sorumlu ısıya dayanıklı proteaz olduğunu göstermiştir. Virulens denemeleri *AprV2* proteazın virulens için gerekli olduğunu göstermiştir (Kennan et al., 2011). Araştırmacılar dört farklı Avrupa ülkesinde piyeten olguları görülen veya sağlıklı koyun sürülerinden alınan klinik materyallerde sekans analizi ile bu proteaz genlerinin moleküler genetik epidemiyolojik analizlerini yapmışlardır. Piyetenli sürülerden alınan örneklerde *AprV2* geni tek allel olarak bulunmuştur. Bununla beraber sağlıklı sürülerden alınan örneklerde *AprB2* geni çeşitli allellerle ilişkili olarak tespit edilmiştir. *AprV5* ve *AprB5* genleri piyetenli ve piyeteniz sürüler arasında ayırım yapmaksızın dağılmış birkaç allel formda bulunmuştur. Bu bulgular virulent *D. nodosus* suşunda *AprV2*'nin öne çıkan rolü doğrulamaktadır ve diğer proteaz genlerinin ve bunların klinik örneklerinde allelik varyantlarının varlığına ışık tutmaktadır. Mc Pherson vd. (2017), dört farklı coğrafyadaki 40 sürüde bulunan 960 koyunun ayak lezyonlarından toplanan örnekleri kullanılarak *aprV2* ve *aprB2* proteaz gen allelleri için qPCR'in analitik özelliklerini değerlendirmişler ve bunları fenotipik (elastaz ve jelatin) testlerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmışlardır. Hem sürüler hem de örnek düzeylerinde klinik teşhis ve qPCR sonuçları arasında düşük seviyede bir uyum olduğunu ve ayrıca qPCR sonuçları ve fenotipik virülens test sonuçları arasında da uyumsuzluk olduğunu bildirmişlerdir. Frosth vd. (2015) ve Stäuble vd. (2014) tarafından *D. nodosus*'un virülensinin belirlenmesi için *aprV2/aprB2* allelleri hedefleyen PCR testleri geliştirilmiştir. Her iki testin de *D. nodosus*'un virulent ve benign suşlarını ayırt edebildiğini bildirilmiştir (Mc Pherson et al., 2017). Bu çalışmada *D. nodosus* izolatlarının virülensinin belirlenmesi için *aprV2/B2*, *aprV5/B5*, *bprV/B* gen varlıkları araştırıldı. *aprV2/B2*, *aprV5/B5* ve *bprV/B* için yapılan PCR sonucunda aynı üç izolatın pozitif sonuç verdiği saptandı. Diğer izolatlar ise PCR'da sonuç vermedi ve söz konusu genler yönünden negatif olarak değerlendirildi. Elde edilen bulgular pozitif sonuç veren üç izolatın virulent olduğu gösterdi.

D. nodosus'un virulent ve benign suşlarının hızlı ayrımı için virülensle ilişkili üç gen probu kullanılarak bir hibridizasyon metodu geliştirilmiştir (Katz et al., 1991). Bununla birlikte, iyi huylu izolatlar testte bu problemlerle hibritleşmediğinden, 16s ribozomal RNA'nın türe özgü bir bölgesine dayalı PCR kullanılması, ayak çürüğü izolatlarının ayrımı için gerekli olarak nitelendirilmiştir (La Fontaine et al., 1993). *D. nodosus*'un virulent bir klonu olan pV470-13 ve benign bir klonu olan pB645335 ile yapılan hibridizasyon denemeleri sonucunda, virulent, orta veya iyi huylu ayak çürümesine neden olan *D. nodosus* suşlarının hızlı ve kesin bir şekilde ayırt edilebilmesi mümkün hale gelmiştir (Liu et al., 1994). pV470-13 ve pB645-335'in nükleotid baz dizilerinin analizi sonrası, *D. nodosus* suşlarının virülensinin daha iyi belirlenmesi için PCR'da virulent ve iyi huylu spesifik oligonükleotit primerleri kullanma potansiyeli incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, virulent ve benign spesifik primerlerin kullanıldığı PCR testinin virulent, intermediate veya benign suşların hızlı, spesifik ve hassas ayrımını yapabildiğini göstermektedir (Liu and Wabber, 1995). Virulent spesifik primerler olan Vf1/Vr1 çoğu virulent suşta pozitif sonuç vermiştir. Bu primerler, bazı intermediate suşlarda da bant oluşturmuştur. Virulent spesifik primerler olan Vf1/Vr1 incelenen 20 benign izolattan ikisinde bant görülürken, Vf2/Vr2 primerleri ile 20 benign izolattan üçünde farklı boyutlarda ürün saptanmıştır. Öte yandan, benign spesifik Bf/Br, benign ve intermediate izolatlarda bant oluşturmuştur. Vf1/Vr1 tarafından hem virulent hem de intermediate suşlarda ampikon oluşturma yeteneği, *D. nodosus*'un bu gen bölgesinin muhtemelen korunduğunu göstermiştir. Öte yandan, virulent ve intermediate suşlarda farklı büyüklükteki iki fragmanın Vf2/Vr2 tarafından amplifikasyonu, virulent izolatların intermediate izolatlardan biraz farklı genetik yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada *D. nodosus* izolatlarının virulent ve benign klonlarına ait gen dizisi varlığı Vf1/Vr1, Vf2/Vr2 ve Bf/Br primerleri kullanılarak araştırıldı. PCR sonucuna göre beş izolat Vf1/Vr1 primeri ile pozitif sonuç verdi. Vf2/Vr2 ve Bf/Br primerleri ile yapılan PCR'da ise bant görülmedi ve bu gen varlıkları yönünden negatif olarak değerlendirildi. Liu ve Wabber (1995) tarafından yapılan çalışmada, 46 merinos koyun çiftliğinden çeşitli klinik ayak çürüklüğü formlarına sahip toplam 141 *D. nodosus* izolatı Vf2/Vr2 ve Bf/Br spesifik primerleri içeren PCR ve jelatin jel testi ile incelenmiştir. PCR'ın *D. nodosus*'un birçok virülens faktöründen sadece ikisi için spesifik olduğu ve bu bakterinin virülensinin daha ileri karakterizasyonuna gereksinim duyulduğunu bildirmiştir. Ayak çürüğünün klinik belirtileri ile PCR ile amplifiye

edilen spesifik DNA ürünleri arasında gözlemlenen ilişkinin tam olmadığı sonucuna varılmıştır. Virülens-spesifik primerler Vf1/Vf2 ve Vf2/Vr2 ile benign-spesifik primerler Bf/Br'nin PCR'deki kombinasyonunun, virüent, intermediate veya benign ayak çürüğüne neden olan *D. nodosus* suşları arasında hızlı, spesifik ve hassas bir ayırım sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Literatürde bu primerler ile yapılan başka bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda Vf1 ile pozitif sonuç veren 5 izolat virüent olarak değerlendirildi.

D. nodosus'un bir çok suşunda, genomun sekiz değişken bölgesinin ikisinde *vap* bölgelerinin çoklu kopyaları bulunmuştur (Myers et al., 2007). Bu *vap* bölgeleri *tRNA* genlerine bakteriyofaj veya plazmid eklenmesiyle ortaya çıkmış ve bu bölgelerin “genomik adalar” olarak adlandırılmasına neden olmuştur (Rood, 2002). *Vap* bölgelerinde identifiye edilen başlıca major genler *vapA*, *vapB*, *vapC*, *vapD*, *vapE* olarak tanımlanan bir dizi virülensle ilişkili protein genleri ve *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* ile *Vibrio cholerae*'nin bazı bakteriyofajlarının integrazlarına amino asit benzerliği olan integrase A (*intA*) genidir (Cheetham et al., 1995; Katz et al., 1992). Genomda *vap* bölgelerine bitişik integras genleri bulunması sebebiyle araştırmalarda *vap* bölgeleri *intA*, *intB*, *intC* ve *intD* elementleri olarak adlandırılmıştır (Bloomfield et al., 1997; Cheetham et al., 1995). Rood vd. (1996) *vap* bölgesinin test edilen virüent suşların %98'inde, benign suşların ise sadece %30'unda bulunduğu ve bu *vap* bölgelerinin virülensle ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Katz vd. (1994) tarafından *D. nodosus*'un virüent suşu A198'de *vap1*, *vap2* ve *vap3* olarak tanımlanan bölgelerde *intA* elementinin çoklu kopyalarının bulunduğu bildirilmiştir. *intA* genetik elementi virüent suşların neredeyse tümünde bulunmakta fakat benign suşların çoğunluğunda bulunmamaktadır (Katz et al., 1991; Rood et al., 1996). *intB*, *intA* geni ile yüksek düzeyde ilişkili bir genidir (Palanisamy, 2007). Bu gen ya *intA* geni ile birlikte bulunur ya da *intA* geninin yerini alır (Whittle et al., 1999). *intB* elementi regülatör bir gen olan *regA* ve fonksiyonu bilinmeyen *gepA*, *gepB*, *gepC* genlerini içerir (Bloomfield et al., 1997). Virüent olup olmaması fark etmeksizin *intB* elementi *D. nodosus*'un tüm suşlarında mevcuttur (Whittle et al., 1999). *intC* elementi genellikle *askA* geninin yanına integre olmuştur (Palanisamy, 2007). *intC* geni, bir eklenti sekansı olan IS1253 ve *D. nodosus*'un *vap* bölgesindeki bilinen genlerine benzemeyen iki yeni ORF'ye (ORF242 ve ORF171) sahiptir (Palanisamy, 2007). Virülensteki rolü ile ilgili olarak; virüent suş 1311'in *intC* elementi laboratuvar pasajları ile yok edildiğinde proteaz termostabilitesinde bir azalma görüldüğü ileri sürülmüştür (Whittle et al., 1999).

Ancak yine de *intC* elementi hem virulent hem benign suşların çoğunda bulunmuştur. *intD*, çoğunlukla benign suşlarda ve genellikle *pnpA* geninin yanında olmak üzere *D. nodosus* suşlarının %20'sinde mevcuttur. Tip IV sekresyon sistemini kodlayan bir gen takımını içeren open reading frame (ORF)'lere sahiptir (Palanisamy, 2007). *D. nodosus*'un diğer genetik elementlerinin transferinde rol oynadığı düşünülmektedir (Tanjung, 2004). Rood vd. (1996) tarafından *D. nodosus* genomunda bulunan *vap* bölgeleri *intA* genetik elementinin bir tRNA genine integrasyonu ile ortaya çıkmıştır. Whittle vd. (1999) tarafından *D. nodosus*'un 17 farklı suşunda *intD* elementinin sekanslarının mevcut olduğu belirlenmiştir. *D. nodosus*'un virulent, intermediate ve benign suşlara ayrılması, başlangıçta elastaz testi, ardından jelatin jel testi ve ardından monoklonal antikorların kullanımını içeren ELISA ve hibridizasyon problemleri ile yapılmıştır. Yakın zamanda Cheetham vd. (2006) tarafından virülensin düzenlenmesi ile ilişkili birleştirici bir genetik element olan *intA* geninin tespiti için PCR geliştirilmiş ve *intA* geninin varlığı ile suşun virulent ayak çürümesine neden olma yeteneği arasında yüksek bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada *D. nodosus* izolatlarının virülensinin belirlenmesi için *intA* geni varlığının araştırıldı ve PCR sonucunda 9 izolatın (%90) *intA* pozitif olduğu görüldü. Bir izolat ise PCR'da sonuç vermedi ve *intA* negatif olarak değerlendirildi. Hadimli vd. (2018) tarafından izole edilen *D. nodosus* suşlarının virülensini belirlemek için PCR ile *intA* geni (%48) varlığı araştırılmıştır. PCR ile *intA* geninin belirlenmesi hem kolay, çabuk ve daha güvenilir bulunmuştur. Dhungyel vd. (2013), *intA* geni varlığına göre *D. nodosus* izolatlarının %41'ini virulent olarak tanımlamışlardır. Wani vd. (2007), Hindistan'da izole edilen *D. nodosus* suşlarının %72,28'inin *intA* genine sahip olduğu ve virulent olarak nitelendirildiği bildirilmiştir. Wani vd. (2019) tarafından yapılan diğer bir çalışmada *D. nodosus* izolatlarında *intA* geni varlığını %72,79 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ile literatür verileri karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği zaman çalışmamızda *intA* geninin yüksek oranda bulunduğu ve pozitiflik bulunan izolatların virulent olarak değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.

Bakteriyel enfeksiyonların epidemiyolojisi ile beraber patojenlerin dağılımının ve filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi, enfeksiyonlardan korunma amacıyla etkili kontrol stratejilerinin oluşturulması için temel bir hedeftir (Nazik vd., 2007). Konvansiyonel serotiplendirme, faj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme ve biyotiplendirme gibi fenotipik metotlar çevresel faktörlerden daha çok etkilendiği için, bakterilerin tiplendirilmesinde moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Genel

olarak moleküler metotlar fenotipik metotlara göre daha yüksek ayırım gücü ve güvenilirliğe sahiptir. Moleküler teknikler, bir mikroorganizmanın kromozomal DNA'sındaki nükleotid varyasyonlarını tespit etmektedir. Bir hastalık salgınında genellikle enfeksiyonun ortak bir kaynağı ve/veya etiyolojik ajanı bulunmaktadır ve bu nedenle salgına dahil olan mikroorganizmaların klonal olarak ilişkisinin belirlenmesi hastalığın epidemiyolojisinin aydınlatılmasında önemlidir. Klonal olarak ilişkili organizmalar aynı virülens faktörlerine, fenotipe, biyokimyasal özelliklere ve aynı genetik özelliklere sahip olabilirler. Salgının seyri boyunca, tek kaynaktan kaynaklanan sonraki organizma nesilleri çeşitlilik gösterebilir (Olive and Bean, 1999). Moleküler epidemiyoloji ile bakteri suşlarındaki varyasyonun belirlenmesi için hali hazırda kullanılan birçok moleküler yöntem vardır. Bu tür yöntemler arasında Pulsed Field Jel Elektrofrezisi (PFGE) (Feizabadi et al., 1996), Kısıtlama Parçası Uzunluğu Polimorfizmleri (RFLP) (Grimont and Grimont, 1986), Amplifiye Fragman Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) (Lin et al., 1996; Valsangiacomo et al., 1995), Infrequent Restriction Site PCR (Mazurek et al., 1996), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)-PCR (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990), BOX (korunmuş tekrar elementlerine dayalı olarak)-PCR (van Belkum et al., 1996) ve enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensüs sekansları (ERIC)-PCR (Rivera et al., 1995; Versalovic et al., 1991) yer almaktadır. Tiplendirme veya epidemiyolojik araştırmalar için seçilen moleküler yöntemin ayırım gücünün yüksek ve tekrarlanabilirliğinin fazla olması tercih nedeni olarak bildirilmektedir. Bu metotlardan PFGE, spesifite ve sensitivite yönünden “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber, pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. Tekniğin duyarlılığı, güncel evrimsel farklılıkları saptayacak şekildedir ve bu nedenle moleküler epidemiyolojik araştırmalar için çok uygundur (Arbeit et al., 1990). RAPD ve Arbitrally Primed (AP) PCR yöntemleri rastgele dizili tek primer kullanılarak DNA polimorfizmlerinin saptanması esasına dayanmaktadır. Primerlerin uzunluğu 20-30 nükleotitten (Welsh and McClelland, 1990) 10 nükleotide kadar (Williams et al., 1990) farklılık gösterebilir. Spesifik nükleotid bilgisinin olmadığı durumlarda polimorfizmleri tespit edebilecek bir yöntemdir. Yöntemde, spesifik olmayan primerlerin araştırılan organizmanın DNA'sına bağlanmasını sağlamak için 36°C'de düşük annealing içeren PCR döngüleri kullanılır. Bu teknik, 20-30 nükleotidlik primerler için AP-PCR ve 10 nükleotid uzunluğundaki primerler için RAPD-PCR olarak adlandırılmıştır. PCR-tabanlı yöntemlerden RAPD- ve ERIC-

PCR son yıllarda basit, hızlı, duyarlı, ucuz ve kısa zamanda sonuç vermesi nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilen bir yöntemdir.

Literatürde *D. nodosus* suşlarının moleküler tiplendirmesini içeren sınırlı sayıda makale bulunmaktadır. Buller (2010), bir koyun sürüsüne deneysel olarak bir *D. nodosus* izolatu inokule etmiş ve ilk enfeksiyondan 12 ay sonra test edildiğinde altı farklı genetik çeşitliliğin oluştuğunu belirlemiştir. Bu durum *D. nodosus*'un hızlı bir genetik değişime uğradığını göstermektedir. Bu da hastalık salgınlarının ve geriye dönük izlemlerinin enfeksiyondan sonra mümkün olan en kısa sürede yapılması gerektiği anlamına gelmektedir. Aynı araştırmacı, Avustralya'da *D. nodosus*'un 796 adet saha izolatu ile gerçekleştirdiği bir çalışmada PFGE ve IrsT metotları ile genotiplendirme yapmıştır. Çalışma sonucunda 94 IrsT tipi ve 214 PFGE tipi belirlenmiştir (Buller, 2010). Seçilen 168 standart PFA türünden bir dendrogram oluşturulmuş ve genetik ilişkinin %63 ile %100 arasında değiştiğini bildirmiştir. PFGE kullanılarak moleküler tiplendirme yapılan diğer bir çalışmada, Malezya'daki çiftliklerdeki enfekte koyunlardan izole edilen *D. nodosus*'un çeşitlilik gösterdiği ve 15 izolatta 12 moleküler tip görüldüğü rapor edilmiştir (Zakaria et al., 1998).

Nepal'de izole edilen *D. nodosus* suşlarını PCR-RFLP ile analiz etmek için yapılan bir tiplendirme çalışmasında, dış zar proteinlerini kodlayan *omp1* geni amplifiye edilmiş ve ürün *HpaII* ile kesilmiştir. B, C, E ve M serogruplarından toplam 66 temsili izolatu 11 farklı genotipte olduğu belirlenmiştir (Ghimire and Egerton, 1999). *ApaI*, *SfiI* ve *SmaI* kısıtlama enzimleri kullanılarak PFGE ile Malezya'daki üç çiftlikten 12 *D. nodosus* izolatu'nun genetik çeşitliliği araştırılmış ve izolatlar, *ApaI* ile üç, *SfiI* ile dört tip ve *SmaI* ile beş genomik tipe ayrılmıştır (Zakaria et al., 1998). Bu çalışmada izolatların filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla ERIC-2 primeri kullanılarak RAPD-PCR gerçekleştirildi. Oluşturulan dendrogramın değerlendirilmesi sonucunda izolatların %71-90 arasında benzerlik gösterdiği belirlendi. Dendrogramın %80 benzerlik eşik değeri ile yapılan değerlendirmesi ile 3 tekli (RA, RC, RD) ve 2 çoklu (RB, RE) genotip belirlendi. Çoklu genotiplerden RB'nin 3 ve RE'nin de 4 izolatu içerdiği saptandı. Serogrup H olarak belirlenen 2 izolat birbirlerine %90 oranında genotipik benzerlik içerirken, serogrup D'ye ait izolatların benzerlik oranı %71-88 olarak hesaplandı. Bu yöntem kullanılarak yapılan bir çalışmada reaktif konsantrasyonları ve reaksiyon koşulları, iki 10-mer primer olan HLWL74 ve HLWL85 için optimize edilmiştir (Tyler et al., 1997). Bu çalışmada elde edilen sonuca benzer olarak yöntem, güvenilir ve tekrarlanabilir olarak bildirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ayak çürüğü, anaerobik bir bakteri olan *Dichelobacter nodosus*'un neden olduğu bulaşıcı bir koyun ve keçi hastalığıdır. Hastalık koyun ve keçilerde topallık ile sonuçlanmakta ve buna bağlı olarak verim kaybı oluşmaktadır. Klinik olarak hastalık, mevcut süşün virülensine, çevresel koşullara ve koyun cinsine bağlı olarak şiddet derecesinde değişen ayak lezyonları ile kendini gösterir. Hastalığın patogenezinde rol oynayan virülens faktörleri ile ilgili mekanizmalar henüz tam olarak belirlenememiştir. *D. nodosus*'un yayılması ve footrot gelişimi, yönetimsel ve iklimsel faktörlere bağlıdır. Türkiye bu faktörlerin büyük çoğunluğuna sahip olduğundan dolayı hastalık ülkemizde sık görülmektedir.

Bu çalışmada Samsun ili ve ilçelerinde koyun ve keçilerin ayak çürüğü vakalarından *D. nodosus* izolasyonu ve genotipik karakterizasyonu amaçlandı. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda Samsun ve çevresinde serogrup D'de yer alan *D. nodosus* süşlarının baskın olduğu görüldü. Serogrup D'ye ait 52, 83 ile 84 no'lu izolatların *intA*, *aprV2/B2*, *aprV5/B5*, *bprV/B* ve *VF1* spesifik PCR analizleri sonucunda pozitif bulunması nedeniyle virüent süşler olarak değerlendirildi. Serogrup D'ye dahil olan üç izolattan 52 ve 83 no'lu izolatların %88 oranında genotipik benzerlik gösterdiği ve 84 no'lu izolat ile benzerlik oranının da % 71 olduğu belirlendi.

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda *D. nodosus* serogruplarının çok çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir. Ülkemizin farklı bölgelerinde de farklı *D. nodosus* serogruplarının hastalığa neden olduğu belirlenmiştir. Bu serogrup çeşitliliği dolayısı ile etkili aşı geliştirme çalışmalarının ulusal düzeyde farklı serogrupların kombinasyonları ile yapılması gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilen tüm bulguların toplu olarak değerlendirilmesi ile Samsun İli ve ilçelerinden izole edilen ve virüent olduğu belirlenen süşların, aşı geliştirme çalışmalarında aşı süşü olma potansiyellerini belirlemek amacıyla kullanılabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Abbott, K.A. and Egerton, J.R. (2003). Effect of climatic region on the clinical expression of footrot of lesser clinical severity (intermediate footrot) in sheep. *Australian Veterinary Journal*. 81. 756-762.
- Agbaje, M., Rutland, C.S., Maboni, G., Blanchard, A., Bexon, B., Stewart, C., Jones, M.A. and Töttemeyer, S. (2018). Novel inflammatory cell infiltration scoring system to investigate healthy and footrot affected ovine interdigital skin. *Peer Journal*. 6. e5097.
- Albinsson, R. (2021). Förekomst av klinisk fotröta och *Dichelobacter nodosus* hos svenska slaktlamm. Second cycle, A2E. Uppsala: SLU, Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health.
- Anderson, L.J., Bills, M.M., Egerton, J.R. and Mattick, J.S. (1984). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the structural subunit of *Bacteroides nodosus* fimbriae. *Journal of Bacteriology*. 160. 748-754.
- Arbeit, R., Arthur, M., Dunn, R., Kim, C., Selander, R. and Golstein, R. (1990). Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *The Journal of Infectious Diseases*. 161. 230-235.
- Barton, E.R. (1986). Treatment of footrot in sheep. *World Animal Reviews*. 59. 38-39.
- Belloy, L., Giacometti, M. and Boujon, P. (2007). Detection of *Dichelobacter nodosus* in wild ungulates (*Capra ibex ibex* and *Ovis aries musimon*) and domestic sheep suffering from foot rot using a two-step polymerase chain reaction. *Journal of Wildlife Diseases*. 43(1). 82-88.
- Bennett, G., Hickford, J., Zhou, H., Laporte, J. and Gibbs, J. (2009). Detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Dichelobacter nodosus* in lame cattle on dairy farms in New Zealand. *Research in Veterinary Sciences*. 87. 413-415.
- Bennett, G.N. and Hickford, J.G. (2011). Ovine footrot: new approaches to an old disease. *Veterinary Microbiology*. 148. 1-7.
- Bertrand, J.J., West, J.T. and Engel, J.N. (2010). Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 192. 994-1010.
- Best, N., Gwozdz, J., Suter, R., Rawlin, G. and Beddoe, T. (2018). Direct serogrouping of *Dichelobacter nodosus* from Victorian farms using conventional multiplex polymerase chain reaction. *BMC Research Notes*. 11. 1-6.
- Beveridge, W.I.B. (1938). Footrot in sheep: a preliminary note on the probable causal agent. *Journal of Council Science and Industrial Researches*. 11. 1-3.
- Beveridge, W.I.B. (1941). Foot-Rot in Sheep: a transmissible disease due to infection with *Fusiformis nodosus* (n. sp.). Studies on its cause, epidemiology, and control. *Council Science and Industrial Research Bulletin*. 140. 1-56.
- Beveridge, W.I.B. (1967). Disease caused by non-sporing anaerobes: ovine footrot necrobacillosis. *Bulletin of Office Internacional Des Epizootica*. 67. 1597-1601.
- Bhat, M.A., Wani, S.A., Hussain, I., Magray, S.N. and Muzafar, M. (2012). Identification of two new serotypes within serogroup B of *Dichelobacter nodosus*. *Anaerobe*. 18 (1). 91-95.
- Billington, S.J., Johnston, J.L. and Rood, J.I. (1996). Virulence regions and virulence factors of the ovine footrot pathogen, *Dichelobacter nodosus*. *FEMS Microbiology Letters*. 145. 147-156.

- Bloomfield, G.A., Whittle, G., McDonagh, M.B., Katz, M.E. and Cheetham, B.F. (1997). Analysis of sequences flanking the vap regions of *Dichelobacter nodosus*: evidence for multiple integration events, a killer system, and a new genetic element. *Microbiology*. 143. 553-562.
- Buller, N.B, Ashley, P., Palmer, M., Pitman, D., Richards, R.B. and Hampson, J. (2010). Understanding the molecular epidemiology of the footrot pathogen *Dichelobacter nodosus* to support control and eradication programs. *Journal of Clinical Microbiology*. 48. 877-882.
- Buller, N.B. and Eamens, G. (2014). Ovine Footrot - Australian and New Zealand Standard Diagnostic Procedure. Australian Government.
- Calvo-Bado, L.A., Oakley, B.B., Dowd, S.E., Green, L.E., Medley, G.F., Ul-Hassan, A., Bateman, V., Gaze, W., Wicomb, L., Grogono-Thomas, R., Kaler, J., Russell, C.L. and Wellington, E.M.H. (2011). Ovine pedomics: the first study of the ovine foot 16S rRNA-based microbiome. *ISME Journal*. 5. 1426-1437.
- Cederlöf, S.E., Hansen, T., Klass, I.C. and Angen, Ø. (2013). An evaluation of the ability of *Dichelobacter nodosus* to survive in soil. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55. 4-12.
- Cheetham, B.F., Tattersall, D.B., Bloomfield, G.A., Rood, J.I. and Katz, M.E. (1995). Identification of a bacteriophage-related integrase gene in a vap region of the *Dichelobacter nodosus* genome. *Gene*. 162(1). 53-58.
- Cheetham, B.F., Tanjung, L.R., Sutherland, M., Druitt, J., Green, G., McFarlane, J., Bailey, G.D., Seaman, J.T. and Katz, M.E. (2006). Improved diagnosis of virulent ovine footrot using the *intA* gene. *Veterinary Microbiology*. 116. 166-174.
- Cheetham, B.F., Parker, D., Bloomfield, G.A., Shaw, B.E., Sutherland, M., Hyman, J.A., Druitt, J., Kennan, R.M., Rood, J.I. and Katz, M.E. (2008). Isolation of the bacteriophage dinoHI from *Dichelobacter nodosus* and its interactions with other integrated genetic elements. *Open Microbiology*. J. 2. 1-9.
- Chetwin, D.H., Whitehead, L.C. and Thorley, S.E. (1991). Recognition and prevalence of *Bacteroides nodosus* serotype M in Australia and New Zealand. *Australian Veterinary Journal*. 68. 154-155.
- Claxton, P.D., Ribeiro, L.A and Egerton, J.R. (1983). Classification of *Bacteroides nodosus* by agglutination tests. *Australian Veterinary Journal*. 60. 331-334.
- Claxton, P.D. (1986). Elastase activities of ovine *Bacteroides nodosus* isolates, In: D.J. Stewart, J.E.P., N.M. McKern, D.L. Emery (Ed.) Footrot in Ruminants: Proceedings of a Workshop. CSIRO/Australian Wool Corporation. 99-101.
- Claxton, P.D. (1989). Antigenic classification of *Bacteroides nodosus*. In: *Footrot and Foot Abscesses of Ruminants*. (Eds. J R Egerton, W K Young and G G Riffkin). CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Clifton, R. and Green, L. (2016). Pathogenesis of ovine footrot disease: a complex Picture. *Veterinary Record*. 179. 225-227.
- Cooper, B.S. (1977). Differences in morphology of *Bacteroides nodosus* attributable to culture media. *New Zealand Veterinary Journal*. 25. 16-20.
- Cross, R.F. (1978). Influence of environmental factors on transmission of ovine contagious foot rot. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 173. 1567-1568.
- Çelebi, Ö., Otlu, S., Büyük, F., Ermutlu, C.Ş., Sağlam, A.G., Çelik, E., Akça, D. ve Şahin, M. (2016). The isolation of *Dichelobacter nodosus* and identification by PCR from ovine footrot in Kars district, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 22. 221-224.

- Davenport, R., Heawood, C., Sessford, K., Baker, M., Baiker, K., Blacklaws, B., Kaler, J., Green, L. and Totemeyer, S. (2014). Differential expression of Toll-like receptors and inflammatory cytokines in ovine interdigital dermatitis and footrot. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 161. 90-98.
- de Albuquerque, C.A. (2019). Detection and characterization of *Dichelobacter nodosus* from sheep with different clinical manifestations of Ovine Footrot (Doctoral dissertation, Universidade de Lisboa (Portugal)).
- Deane, H.M. and Jensen, R. (1955). The pathology of contagious foot rot in sheep. *American Journal of Veterinary Research*. 16. 203-208.
- Delafond O. (1838). *Traité de la police sanitaire des animaux domestiques*. Paris: Chez Bechet Jeune. <https://books.google.ch/books?id=MyRCAAAAcAAJ&pg=PP7&dq=Chez+Bechet+jeune+Traité+de+la+police+sanitaire+des+animaux+domestiques&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwic7uHHx8XOAhXIDsAKHfmHAeIQ6AEIITAA#v=onepage&q&f=false>, Erişim tarihi: 20.12.2021
- Depiazzi, L.J. and Richards, R.B. (1985). Motility in relation to virulence of *Bacteroides nodosus*. *Veterinary Microbiology*. 10. 107-116.
- Depiazzi, L.J., Richards, R.B., Henderson, J., Rood, J.I., Palmer, M.A. and Penhale, W.J. (1991). Characterisation of virulent and benign strains of *Bacteroides nodosus*. *Veterinary Microbiology*. 26. 151-160.
- Dewhirst, F.E., Paster, B.J., La Fontaine, S. and Rood, J.I. (1990). Transfer of *Kingella indologenes* (Snell and Lapage 1976) to the genus *Suttonella* gen. nov. as *Suttonella indologenes* comb. nov.: transfer of *Bacteroides nodosus* (Beveridge 1941) to the genus *Dichelobacter nodosus* comb. nov.: and assignment of the genera *Cardiobacterium*, *Dichelobacter*, and *Suttonella* to *Cardiobacteriaceae* fam.nov. in the gamma division of proteobacteria based on 16S ribosomal ribonucleic acid sequence comparisons. *International Journal of Systemic Bacteriology*. 40. 426-433.
- Dhungyel, O.P., Whittington, R.J. and Egerton, J.R. (2002). Serogroup specific single and multiplex PCR with pre-enrichment culture and immuno-magnetic bead capture for identifying strains of *D. nodosus* in sheep with footrot prior to vaccination. *Molecular and Cellular Probes*. 16. 285-296.
- Dhungyel, O.P., Lehmann, D.R. and Whittington, R.J. (2008). Pilot trials in Australia on eradication of footrot by flock specific vaccination. *Veterinary Microbiology*. 132. 364-371.
- Dhungyel, O.P. and Whittington, R.J. (2009). Modulation of inter-vaccination interval to avoid antigenic competition in multivalent footrot (*Dichelobacter nodosus*) vaccines in sheep. *Vaccine*. 28. 470-473.
- Dhungyel, O., Hill, A.E., Dhand, N.K. and Whittington, R.J. (2013). Comparative study of the commonly used virulence tests for laboratory diagnosis of ovine footrot caused by *Dichelobacter nodosus* in Australia. *Veterinary Microbiology*. 162. 756-760.
- Dhungyel, O.P., Hunter, J. and Whittington, R.J. (2014). Footrot vaccines and vaccination. *Vaccine*. 32(26). 3139-3146.
- Duncan, J.S., Angell, J.W., Carter, S.D., Evans, N.J., Sullivan, L.E. and Grove-White, D.H. (2014). Contagious ovine digital dermatitis: an emerging disease. *Veterinary Journal*. 201. 265-268.
- Dursun, N. (2008). *Veteriner Anatomi III*. 7. Baskı, Ankara, Medisan Yayınevi. 204.
- Egerton, J.R., Roberts, D.S. and Parsonson, I.M. (1969). The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot. I. A histological study of the bacterial invasion. *Journal of Comparative Pathology*. 79. 207-216.

- Egerton, J.R. (1970). Successful vaccination of sheep against footrot. *Australian Veterinary Journal*. 46. 114-115.
- Egerton, J.R. (1973). Surface and somatic antigens of *Fusiformis nodosus*. *Journal of Comparative Pathology*. 83. 151-159.
- Egerton, J.R. (1974). Significance of *Fusiformis nodosus* serotypes in resistance of vaccinated sheep to experimental foot-rot. *Australian Veterinary Journal*. 50. 59-62.
- Egerton, J.R. and Laing, E.A. (1978). Characteristics of *Bacteroides nodosus* isolated from cattle. *Veterinary Microbiology*. 3. 269-279.
- Egerton, J.R. and Raadsma, H.W. (1991). Breeding sheep for resistance to footrot. In "Breeding for Disease Resistance in Farm Animals". Eds. J.B. Owen and R.F.E. Axford, C.A.B. International (Wallingford). pp.347-370.
- Elleman, T.C. (1988). Pilins of *Bacteroides nodosus*: molecular basis of serotypic variation and relationships to other bacterial pilins. *Microbiology Reviews*. 52. 233-247.
- Emery, D.L., Stewart, D.J. and Clark, B.L. (1984). The comparative susceptibility of five breeds of sheep to foot-rot. *Australian Veterinary Journal*. 61. 85-88.
- Escayg, A.P., Hickford, J.G. and Bullock, D.W. (1997). Association between alleles of the ovine major histocompatibility complex and resistance to footrot. *Research in Veterinary Science*. 63(3). 283-287.
- Feizabadi, M., Robertson, I., Cousins, D. and Hampson, D. (1996). Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 34. 1136-1142.
- Friedrich, C., Moors, E. and Gaulty, M., (2012). Die bedeutung der moderhinke – Eine umfrage in Deutschland, Österreich und der Schweiz. *Züchtungskunde*. 84 250-259.
- Frosth, S., Slettenaes, J.S., Jorgensen, H.J., Angen, Q. and Aspan, A. (2012). Development and comparison of a real-time PCR assay for detection of *Dichelobacter nodosus* with culturing and conventional PCR: harmonisation between three laboratories. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 24. 1-7.
- Frosth, S., König, U., Nyman, A.K., Pringle, M. and Aspán, A. (2015). Characterisation of *Dichelobacter nodosus* and detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Treponema* spp. in sheep with different clinical manifestations of footrot. *Veterinary Microbiology*. 179. 82-90.
- Frosth, S. (2016). *Dichelobacter nodosus* and footrot in Swedish sheep. Increased knowledge and improved laboratory diagnostics. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Doktora Tezi, 14-15.
- Ghimire, S.C. and Egerton, J.R. (1999). PCR-RFLP of outer membrane proteins gene of *Dichelobacter nodosus*: a new tool in the epidemiology of footrot. *Epidemiology and Infection*. 122. 521-528.
- Ghimire, S.C., Whittington, R.J., Dhungyel, O.P., Joshi, H.D. and Egerton, J.R. (2002). Diagnosis of footrot in goats: application of ELISA tests for response to antigens of *Dichelobacter nodosus*. *Veterinary Microbiology*. 87. 237-251.
- Glynn, T. (1993). Benign footrot-an epidemiological investigation into the occurrence, effects on production, response to treatment and influence of environmental factors. *Australian Veterinary Journal*. 70. 7-12.
- Gradin, J.L. and Schmitz, J.A. (1977). Selective medium for isolation of *Bacteroides nodosus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 6. 298-302.

- Graham, N.P. and Egerton, J.R. (1968). Pathogenesis of ovine foot-rot: The role of some environmental factors. *Australian Veterinary Journal*. 44. 235-40.
- Greber, D., Bearth, G., Luchinger, R., Schuepbach-Regula, G. and Steiner, A. (2016). Elimination of virulent strains (*aprV2*) of *Dichelobacter nodosus* from feet of 28 Swiss sheep flocks: A proof of concept study. *Veterinary Journal*. 216. 25-32.
- Grimont, F. and Grimont, P. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annals de l'Institute Pasteur, Microbiology*. 137. 165-175.
- Grøneng, G.M. (2015). Epidemiological investigations of footrot in the Norwegian sheep population. Department of Production Animal Clinical Sciences, Adamstuen, Doktora Tezi, 5.
- Hadimli, H.H., Erganiş, O., Alkan, F., Çiftçi, K., Sayın, Z., Uslu, A. ve Oğlakçı, E. (2018). Türkiye’de koyunlarda Piyeten (Ayak Çürüğü) vakalarından *Dichelobacter nodosus* ve *Fusobacterium necrophorum* izolasyonu, mikrobiyolojik ve moleküler identifikasyonu ve *D. nodosus*-*F. necrophorum* izolatlarından hazırlanan aşuların etkinliklerinin belirlenmesi. TÜBİTAK 115O304, Sonuç Raporu.
- Hall, J.A., Sendek, R.L., Chinn, R.M., Bailey, D.P., Thonstad, K.N., Wang, Y., Forsberg, N.E., Vorachek, W.R., Stang, B.V. and Van Saun, R.J. (2011). Higher whole-blood selenium is associated with improved immune responses in footrot-affected sheep. *Veterinary Research*. 42(1). 99.
- Han, X., Kennan, R.M., Parker, D., Davies, J.K. and Rood, J.I. (2007). Type IV fimbrial biogenesis is required for protease secretion and natural transformation in *Dichelobacter nodosus*. *Journal of Bacteriology*. 189. 5022-5033.
- Han, X., Kennan, R.M., Davies, J.K., Reddacliff, L.A., Dhungyel, O.P., Whittington, R.J., Turnbull, L., Whitchurch, C.B. and Rood, J.I. (2008). Twitching motility is essential for virulence in *Dichelobacter nodosus*. *Journal of Bacteriology*. 190. 3323-3335.
- Han, X., Kennan, R.M., Steer, D.L., Smith, A.I., Whisstock, J.C. and Rood, J.I. (2012). The *AprV5* subtilase is required for the optimal processing of all three extracellular serine proteases from *Dichelobacter nodosus*. *PLoS One*. 7(10). e47932.
- Hobbs, M., Dalrymple, B.P., Cox, P.T., Livingstone, S.P., Delaney, S.F. and Mattick, J.S. (1991). Organization of the fimbrial gene region of *Bacteroides nodosus*: class I and class II strains. *Molecular Microbiology*. 5(3). 543-560.
- Katz, M.E., Howarth, P.M., Yong, W.K., Riffkin, G.G., Depiazzi, L.J. and Rood, J.I. (1991). Identification of three gene regions associated with virulence in *Dichelobacter nodosus*, the causative agent of ovine footrot. *Journal of Genetic and Microbiology*. 137. 2117-2124.
- Katz, M.E., Strugnell, R.A. and Rood, J.I. (1992). Molecular characterization of a genomic region associated with virulence in *Dichelobacter nodosus*. *Infection and Immunity*. 60. 4586-4592.
- Katz, M.E., Wright, C.L., Gartside, T.S., Cheetham, B.F., Doidge, C.V., Moses, E.K. and Rood, J.I. (1994). Genetic organization of the duplicated vap region of the *Dichelobacter nodosus* genome. *Journal of Bacteriology*. 176. 2663-2669.
- Kennan, R.M., Dhungyel, O.P. and Whittington, R.J. (2001). The type IV fimbrial subunit gene (*fimA*) of *Dichelobacter nodosus* is essential for virulence, protease secretion, and natural competence. *Journal of Bacteriology*. 183(15). 4451-4458.

- Kennan, R.M., Wong, W., Dhungyel, O.P., Han, X., Wong, D., Parker, D., Rosado, C.J., Law, R.H.P., McGowan, S., Reeve, S.B., Levina, V., Powers, G.A., Pike, R.N., Bottomley, S.P., Smith, A.I., Marsh, I., Whittington, R.J., Whisstock, J.C., Porter, C.J. and Rood, J.I. (2010). The subtilisin-like protease AprV2 is required for virulence and uses a novel disulphide-tethered exosite to bind substrates. *PLoS Pathogen*. 6. e1001210.
- Kennan, R.M., Han, X., Porter, C.J. and Rood, J.I. (2011). The pathogenesis of ovine footrot. *Veterinary Microbiology*. 153. 59-66.
- Kennan, R.M., Gilhuus, M., Frosth, S., Seemann, T., Dhungyel, O.P., Whittington, R.J. and Rood, J.I. (2014). Genomic evidence for a globally distributed, bimodal population in the ovine footrot pathogen *Dichelobacter nodosus*. *Molecular Biology*. 5(5), e01821-14.
- Keogh, J. (1976). Footrot vaccine trials. New South Wale. *Veterinary Proceedings*. 12. 35-37.
- Koç, B. ve Alkan, Z. (1994). At Ortopedisi. 18. Baskı, Ankara, Medisan Yayınevi. 2.
- Konig, U., Neyman, A.K.S. and Verder, K. (2001). Prevalence of footrot in Swedish slaughter lambs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 53. 1-5.
- Konig, H.E. and Liebich, H.G. (2007). *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals Textbook and Colour Atlas*. 3. Baskı, (Stuttgart) Germany, Schattauer, 637. 642.
- Kortt, A.A. and Stewart, D.J. (1994). Properties of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*: Stability and specificity of peptide bond cleavage. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 34. 1167-1176.
- Kumar, A., Anderson, D., Amachawadi, R.G., Nagaraja, T.G. and Narayanan, S.K. (2013). Characterization of *Fusobacterium necrophorum* isolated from llama and alpaca. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*. 25. 502-507.
- Kumar, N.V., Karthik, A. and Sreenivasulu, D. (2016). Detection of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* from footrot of sheep and goats in Andhra Pradesh. *Indian Veterinary Journal*. 93. 39-41.
- La Fontaine, S.L., Egerton, J.R. and Rood, J.I. (1993). Detection of *Dichelobacter nodosus* using species-specific oligonucleotides as PCR primers. *Veterinary Microbiology*. 35 (1-2). 101-117.
- La Fontaine, S. and Rood, J.I. (1996). Organization of ribosomal RNA genes from the footrot pathogen *Dichelobacter nodosus*. *Microbiology* 142. 889-899.
- Lambell, R.G. (1986). A field trial with a commercial vaccine against footrot in sheep. *Australian Veterinary Journal*. 63. 415-418.
- Langworth, B.F. (1977). *Fusobacterium necrophorum*: its characteristics and role as an animal pathogen. *Bacteriological Reviews*. 41. 373-390.
- Liardet, D.M., Chetwin, D.H., McNerney, D.M. and Hindmarsh, F.H. (1989). Reduction of the prevalence of footrot on New Zealand farms by vaccination. *New Zealand Veterinary Journal*. 37. 129-130.
- Lilley, G.G., Stewart, D.J. and Kortt, A.A. (1992). Amino acid and DNA sequences of an extracellular basic protease of *Dichelobacter nodosus* show that it is a member of the subtilisin family of proteases. *European Journal of Biochemistry*. 15. 13-21.
- Lin, J.J., Kuo, J. and Ma, J. (1996). PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Research*. 24. 3649-3650.
- Links, I.J., Stewart, D.J., Edwards, R.D. and Vaughan, J.A. (1995). Protease tests on *Dichelobacter nodosus* from ovine footrot-comparison of protease ELISA and gelatin gel tests. In: Cox, J. (Ed.), AVA conference proceedings, Melbourne, Aust. Sheep Vet. Soc. 21-26 May 1995.

- Links, I.J. and Morris, S. (1996). Assessment of gelatin gel and elastase tests for detection of protease activity of *Dichelobacter nodosus* isolates from ovine footrot. *Veterinary Microbiology*. 51. 305-318.
- Liu, D. and Yong, W.K. (1993). Use of elastase test, gelatin gel test and electrophoretic zymogram to determine virulence of *Dichelobacter nodosus* isolated from ovine footrot. *Research In Veterinary Science*. 55(1). 124-129.
- Liu, D., Roycroft, C., Samuel, J. and Webber, J. (1994). A retrospective study of clinical and laboratory characteristics of ovine footrot. *Veterinary Microbiology*. 42. 373-381.
- Liu, D. and Webber, J. (1995). A polymerase chain reaction assay for improved determination of virulence of *Dichelobacter nodosus*, the specific causative pathogen for ovine footrot. *Veterinary Microbiology*. 43. 197-207.
- Liu, D. and Yong, W.K. (1997). Improved laboratory diagnosis of ovine footrot: An update. *Veterinary Journal*. 153. 99-105.
- Locher, I., Greber, D., Holdener, K., Luchinger, R., Haerdi-Landerer, C., Schupbach-Regula, G., Frey, J. and Steiner, A. (2015). Longitudinal *Dichelobacter nodosus* status in 9 sheep flocks free from clinical footrot. *Small Ruminant Research*. 132. 128-132.
- Maboni, G., Blanchard, A., Frosth, S., Stewart, C., Emes, R. and Totemeyer, S. (2017a). A distinct bacterial dysbiosis associated skin inflammation in ovine footrot. *Scientific Reports*. 7. 45220.
- Maboni, G., Davenport, R., Sessford, K., Baiker, K., Jensen, T.K., Blanchard, A.M., Wattedgedera, S., Entrican, G. and Totemeyer, S. (2017b). A novel 3D skin explant model to study anaerobic bacterial infection. *Frontiers Cellular and Infectious Biology*. 7. 1-12.
- Mattick, J.S., Anderson, B.J., Mott, M.R. and Egerton, J.R. (1984). Isolation and characterization of *Bacteroides nodosus* fimbriae: structural subunit and basal protein antigens. *Journal of Bacteriology*. 160(2). 740-747.
- Mattick, J.S., Bills, M.M., Anderson, B.J., Dalrymple, B., Mott, M.R. and Egerton, J.R. (1987). Morphogenetic expression of *Bacteroides nodosus* fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 169. 33-41.
- Mattick, J.S., Anderson, B.J., Cox, P.T., Bills, M.M., Dalrymple, B. and Egerton, J.R. (1991). Gene sequences and comparison of the fimbrial subunits representative of *Bacteroides nodosus* serogroups A to I: class I and class II strains. *Molecular Microbiology*. 5. 561-573.
- Mazurek, G.H., Reddy, V., Marston, B.J., Haas, W.H. and Crawford, J.T. (1996). DNA Fingerprinting by Infrequent-Restriction-Site Amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 34. 2386-2390.
- McKern, N.M., Elleman, T.C. and Hoyne, P.A. (1989). Molecular basis of antigenic variation in pili(fimbriae) of *Bacteroides nodosus* —application to footrot vaccines. In *Footrot and Foot Abscess in Ruminants*, y R. Egerton, W. K.Wong and G. G. Riffkin (eds). CRC Press Inc. Florida, pp. 167-189.
- McPherson, A.S., Dhungel, O.P. and Whittington, R.J. (2017). Evaluation of genotypic and phenotypic protease virulence tests for *Dichelobacter nodosus* infection in sheep. *Journal of Clinical Microbiology*. 55. 1313-1326.
- McPherson, A.S. (2018). Aspects of the aetiopathogenesis and diagnosis of ovine footrot. University of Sydney Faculty of Science Sydney School of Veterinary Science, Sidney, Doktora Tezi. 25-26.

- Moore, L.J., Wassink, G.J., Green, L.E. and Grogono-Thomas, R. (2005). The detection and characterisation of *Dichelobacter nodosus* from cases of ovine footrot in England and Wales. *Veterinary Microbiology*. 108. 57-67.
- Moses, E.K., Good, R.T., Sinistaj, M., Billington, S.J., Langford, C.J. and Rood, J.I. (1995). A multiple site-specific DNA-inversion model for the control of Omp1 phase and antigenic variation in *Dichelobacter nodosus*. *Molecular Microbiology*. 17. 183-196.
- Mulvaney, C.A. (2013). Guide to Management of Footrot in Sheep. 2nd ed. New Zealand Merino, Christchurch, New Zealand.
- Murray, N.E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (alegacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64. 412-434.
- Myers, G.S.A., Parker, D., Al-Hasani, K., Kennan, R.M., Seemann, T., Ren, Q., Bagder, J.H., Selengut, J.D., DeBoy, R.T., Tettelin, H., Boyce, J.D., McCarl, V.P., Han, X., Nelson, W.C., Madupu, R., Mohamoud, Y., Holley, T., Fedorova, N., Khouri, H., Bottomley, S.P., Whittington, R.J., Adler, B., Songer, J.G., Rood, J.I. and Paulsen, I.T. (2007). Genome sequence and identification of candidate vaccine antigens from the animal pathogen *Dichelobacter nodosus*. *Nature Biotechnology*. 25. 569-575.
- Nazik, H., Ongen, B., Erturan, Z. ve Salcioglu, M. (2007). Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 60. 82-86.
- Olive, D.M. and Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNAbased typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37. 1661-1669.
- Özgen, E.K., Cengiz, S., Ulucan, M., Okumuş, Z., Kortel, A., Erdem, H. ve Saraç, H.G. (2015). Isolation and identification of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* using the polymerase chain reaction method in sheep with footrot. *Acta Veterinaria Brno*. 84. 97-104.
- Palanisamy, A., Kumar, S., Cheetham, B. and Katz, M. (2007).Molecular analysis of the role of polynucleotide phosphorylase in the virulence of *Dichelobacter nodosus*. Doctorate thesis. pp:67-75.
- Palmer, M.A. (1993). A gelatin test to detect activity and stability of proteases produced by *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus*. *Veterinary Microbiology*. 36(1-2). 113-122.
- Parker, D., Kennan, R.M., Myers, G.S., Paulsen, I.T., Songer, J.G. and Rood, J.I. (2006). Regulation of type IV fimbrial biogenesis in *Dichelobacter nodosus*. *Journal of Bacteriology*. 188. 4801-4811.
- Petrov, K.K. and Dicks, L.M.T. (2013). Footrot in clawed and hoofed animals: Symptoms, Causes and treatments. *Biotechnology and Biotechnological Equipments*. 27. 3470-3477.
- Pitman, D.R, Palmer, M.A. and Depiazzi, L.J. (1994). The laboratory culture of *Dichelobacter nodosus* in a footrot eradication program. *Australian Veterinary Journal*. 71(4). 109-112.
- Plant, J., Seaman, J. and Marilyn, E. (2017). Footrot in Sheep and Goats. Primefact 1533 fourth edition Animal Biosecurity and Welfare, NSW Department of Primary Industries. 1533. 3.
- Prosser, N.S., Monaghan, E.M., Green, L.E. and Purdy, K.J. (2020). Serogroups of *Dichelobacter nodosus*, the cause of footrot in sheep, are randomly distributed across England. *Scientific Reports*. 10. 16823.

- Raadsma, H.W., O'Meara, T.J., Egerton, J.R., Lehrbach, P.R. and Schwartzkoff, C.L. (1994). Protective antibody titres and antigenic competition in multivalent *Dichelobacter nodosus* fimbrial vaccines using characterised rDNA antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 40(3). 253-274.
- Raadsma, H.W. and Dhungyel, O.P. (2013). A review of footrot in sheep: New approaches for control of virulent footrot. *Livestock Science*. 156 (1-3). 115-125.
- Raadsma, H.W. and Egerton, J.R. (2013). A review of footrot in sheep: aetiology, risk factors and control methods. *Livestock Science*. 156. 106-114.
- Rather, M.A., Wani, S.A., Hussain, I., Bhat, M.A., Kabli, Z.A. and Magray, S.N. (2011). Determination of prevalence and economic impact of ovine footrot in central Kashmir India with isolation and molecular characterization of *Dichelobacter nodosus*. *Anaerobes*. 17. 73-77.
- Reed, G.A., Shepherd, G.E., Astill, K.J. and Liardet, D.M. (1981). The field evaluation of an experimental *B. nodosus* vaccine. In: Beveridge WI, Egerton JR, editors. Ovine footrot. Sydney: The University of Sydney; pp. 113-118.
- Riffkin, M.C., Focareta, A., Edwards, R., Stewart, D.J. and Kortt, A.A. (1993). Cloning, sequencing and expression of the gene (*aprV5*) encoding extracellular serine acidic protease V5 from *Dichelobacter nodosus*. *Gene*. 137. 259-264.
- Riffkin, M.C., Wang, L.F., Kortt, A.A. and Stewart, D.J. (1995). A single amino acid change between the antigenically different extracellular serine proteases V2 and B2 from *Dichelobacter nodosus*. *Gene*. 167(1-2). 279-283.
- Rivera, I., Chowdhury, M., Huq, A., Jacobs, D., Martins, M. and Colwell, R. (1995). Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 61. 2898-2904.
- Roberts, D.S. and Egerton, J.R. (1969). The aetiology and pathogenesis of ovine footrot. II. The pathogenic association of *F. nodosus* and *F. necrophorus*. *Journal of Comparative Pathology*. 79. 217-227.
- Rood, J.I., Howarth, P.A., Haring, V., Billington, S.J., Yong, W.K., Liu, D. and Vaughan, J.A. (1996). Comparison of gene probe and conventional methods for the differentiation of ovine footrot isolates of *Dichelobacter nodosus*. *Veterinary Microbiology*. 52(1-2). 127-141.
- Rood, J.I. (2002). Genomic islands of *Dichelobacter nodosus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 264. 47-60.
- Schwartzkoff, C.L., Egerton, J.R. and Stewart, D.J. (1993). The effects of antigenic competition on the efficacy of multivalent footrot vaccines. *Australian Veterinary Journal*. 70(4). 123-126.
- Seaman, J. (2007). Diagnosis of footrot. Biosecurity, compliance & Mine Safety Division, Procedure 2006/024. NSW Department of Primary Industries. http://www.dpi.nsw.gov.au/data/assets/pdf_file/0003/180795/footrot-diagnosis-proc-2006-024.pdf,. Erişim tarihi: 25.12.2021.
- Siezen, R.J. and Leunissen, J.A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisinlike serine proteases. *Protein Science*. 6. 501-523.
- Skerman, T.M., Erasmuson, S.K. and Every, D. (1981). Differentiation of *Bacteroides nodosus* biotypes and colony variants in relation to their virulence and immunoprotective properties in sheep. *Infection and Immunity*. 32(2). 788-795.

- Smith, E.M., Gilbert, A., Russell, C.L., Purdy, K.J., Medley, G.F., Muzafar, M., Grogono-Thomas, R. and Green, L.E. (2017). Within-flock population dynamics of *Dichelobacter nodosus*. *Frontiers in Veterinary Science*. 4. 1-6.
- Stäuble, A., Steiner, A., Frey, J. and Kuhnert, P. (2014). Simultaneous detection and discrimination of virulent and benign *Dichelobacter nodosus* in sheep of flocks affected by foot rot and in clinically healthy flocks by competitive real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(4). 1228-1231.
- Stephen, J.B., Johnston, J.L. and Rood, J.I. (1996). Virulence regions and virulence factors of the ovine footrot pathogen, *Dichelobacter nodosus*. *FEMS Microbiology Letters*. 145. 147-156.
- Stewart, D. J. (1973). An electron microscopic study of *Fusiformis nodosus*. *Research In Veterinary Science*. 14(1). 132-136.
- Stewart, D.J. (1979). The role of elastase in the differentiation of *Bacteroides nodosus* infections in sheep and cattle. *Research in Veterinary Science*. 27. 99-105.
- Stewart, D.J., Peterson, J.E., Vaughan, J.A., Clark, B.L., Emery, D.L., Caldwell, J.B. and Kortt, A.A. (1986). The pathogenicity and cultural characteristics of virulent, intermediate and benign strains of *Bacteroides nodosus* causing ovine foot-rot. *Australian Veterinary Journal*. 63. 317-326.
- Stewart, D.J. (1989). Footrot in sheep. In: Egerton JR, Yong WK, Riffkin GG, editors. Footrot and foot abscesses of ruminants. CRC Press, Boca Raton, Florida. 5-45.
- Stewart, D.J., Kortt, A.A. and Lilley, G.G. (1990). New approaches to footrot vaccination and diagnosis utilising the proteases of *Bacteroides nodosus*. *Proceedings in 1st World Congress of Veterinary Dermatology and Advances Veterinary Dermatology*. 359-369.
- Stewart, D.J. and Claxton, P.D. (1993). Ovine footrot: clinical diagnosis and bacteriology. In: Corner LA and Bagust TJ, editors. Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases. CSIRO for the Standing Committee on Agriculture and Resource Management, East Melbourne, Australia, 1-27.
- Strom, M.S. and Lory, S. (1993). Structure function and biogenesis of the type IV pilli. *Annual Reviews of Microbiology*. 47. 565-596.
- Tanjung, L.R. (2004). Molecular analysis of virulence in *Dichelobacter nodosus*: Testing of a proposed model for virulence and characterisation of the *IntD* mobile genetic element (Doctoral dissertation, University of New England).
- Tanyolaç, A. (1993). Özel Histoloji. Ankara, Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd Şti. 178-180.
- Taşbaş, M. (1996). Veteriner Anesthesiologia. 2. Baskı, Ankara, Tamer Yayınları. 102-128.
- Thomas, J.H. (1958). A simple media for the isolation and cultivation of *Fusiformis nodosus*. *Australian Veterinary Journal*. 34. 411.
- Thomas, J.H. (1962). The differential diagnosis of footrot in sheep. *Australian Veterinary Journal*. 38. 159-163.
- Tyler, K., Wang, G., Tyler, S. and Johnson, W. (1997). Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 35. 339-346.
- Valsangiacomo, C., Baggi, F., Gaia, V., Balmelli, T., Peduzzi, R. and Piffaretti, J.C. (1995). Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology*. 33. 1716-1719.

- van Belkum, A., Sluijter, M., de Groot, R., Verbrugh, H. and Hermans, P. (1996). Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 34. 1176-1179.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Researches*. 19(24). 6823-6831.
- Vijayalakshmi, S. (2017). Molecular characterization of *Dichelobacter nodosus* isolates and development of recombinant vaccine (Doctoral dissertation, PVNR TVU).
- Wani, S. A. and Samanta, I. (2006). Current understanding of the aetiology and laboratory diagnosis of footrot. *The Veterinary Journal*. 171(3). 421-428.
- Wani, S.A., Samanta, I. and Kawoosa, S. (2007). Isolation and characterization of *Dichelobacter nodosus* from ovine and caprine footrot in Kashmir, India. *Research in Veterinary Science*. 83. 141-144.
- Wani, A.H., Werma, S., Sharma, M. and Wani, S.A. (2015). Infectious lameness among migratory sheep and goats in north-west India, with particular focus on anaerobes. *Revue Scientifique et Technique of Office International Epizootica*. 34. 855-867.
- Wani, S.A., Farooq, S., Kashoo, Z.A., Hussain, I., Bhat, M.A., Rather, M.A. and Aalamgeer, S. (2019). Determination of prevalence, serological diversity, and virulence of *Dichelobacter nodosus* in ovine footrot with identification of its predominant serotype as a potential vaccine candidate in J&K, India. *Tropical Animal Health and Production*. 51. 1089-1095.
- Wassink, G.J., King, E.M., Grogono-Thomas, R., Brown, J.C., Moore, L.J. and Green, L.E. (2010). A within farm clinical trial to compare two treatments (parenteral antibiotics and hoof trimming) for sheep lame with footrot. *Preventive Veterinary Medicine*. 96(1-2). 93-103.
- Webb, W.J. and Kluver, P. (2014). Footrot Manual for Contractors. <http://www.lbn.org.au/wp-content/uploads/2015/12/Footrot-manual-for-footrot-contractors.pdf>, 2014. Erişim tarihi: 20.12.2021.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18. 7213-7218.
- Wendy, W. (2016). The horse. Harper Collins Publishers. ISBN 13: 9781443417860. pp.145.
- Whittier, W. and Steven, H.U. (2009). Control, Treatment, and Elimination of Foot Rot from Sheep. *Virginia Cooperative Extensions*. 410-428.
- Whittington, R.J. and Nicholls, P.J. (1995). Effects of the severity and duration of lesions on the primary and anamnestic humoral responses of sheep to *Dichelobacter nodosus* and observations of natural resistance to footrot. *Research in Veterinary Science*. 59(2). 128-135.
- Whittle, G., Bloomfield, G.A., Katz, M.E. and Cheetham, B.F. (1999). The site-specific integration of genetic elements may modulate thermostable protease production, a virulence factor in *Dichelobacter nodosus*, the causative agent of ovine footrot. *Microbiology*. 145. 2845-2855.
- Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. and Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18. 6531-6535.
- Winter, A.C. (2004). Lameness in sheep: Treatment and control in practice. *Small Ruminant Research*. 26. 130-139.
- Winter, A.C. (2008). Lameness in sheep. *Small Ruminant Research*. 76. 149-153.

- Winter, J.R., Kaler, J., Ferguson, E., Kilbride, A.L. and Green, L.E. (2015). Changes in prevalence and risk factors for lameness in random samples of English sheep flocks: 2004-2013. *Preventive Veterinary Medicine*. 122. 121-128.
- Witcomb, I.A., Green, I.E., Calvo-Bado, L.A., Russell, C.L., Smith, E.M., Grogono-Thomas, R. and Wellington, E.M. (2015). First study of pathogen load and localisation of ovine footrot using fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Veterinary Microbiology*. 176. 321-327.
- Zakaria, Z., Radu, S., Sheik-Omar, A.R., Mutalib, A.R., Joseph, P.G. and Rusul, G. (1998) Molecular analysis of *Dichelobacter nodosus* isolated from footrot in sheep in Malaysia. *Veterinary Microbiology*. 62. 243-250.
- Zhou, H. and Hickford, J.G.H. (2000). Extensive diversity in New Zealand *Dichelobacter nodosus* strains from infected sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. 71. 113-123.
- Zhou, H., Lottner, S., Ganter, M. and Hickford, J.G.H. (2010) Identification of two new *Dichelobacter nodosus* strains in Germany. *Veterinary Journal*. 184. 115-117.



ÖZ GEÇMİŞ

İlhan ŞAHİN, Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi'ni bitirdikten sonra Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2001 yılında mezun oldu. 2017 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. Tarım ve Orman Bakanlığı Samsun Limanı Veteriner Sınır Kontrol Noktası Müdürlüğü'nde görev yapan İlhan ŞAHİN, orta derecede İngilizce bilmektedir.

Temel ilgi alanları: Sosyal Medya, Bilişim Teknolojileri

İletişim Bilgileri

Öğrenci no : 17220318

ORCID ID : 0000-0002-3066-775x

Yayımlar:

1. Şahin, İ., Sezener, M.G., Ergüden, V.E., Yaman, Ş. ve Çiftci A. (2021). The characterisation of *Dichelobacter nodosus* isolates from footrot cases of sheep. 6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences (ICVAS 2021), 2-4 Eylül 2021, pp.:204.

2. Şahin, İ., Sezener, M.G., Ergüden, V.E., Yaman, Ş. ve Çiftci A. (2021). The isolation of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* from footrot in Samsun province. 6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences (ICVAS 2021), 2-4 Eylül 2021, pp.:205.

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. En iyi poster sunumu 2.liği (6. Uluslararası Veteriner ve Hayvan Bilimleri Kongresi). Şahin, İ., Sezener, M.G., Ergüden, V.E., Yaman, Ş. ve Çiftci A. (2021). The characterisation of *Dichelobacter nodosus* isolates from footrot cases of sheep. 6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences (ICVAS 2021), 2-4 Eylül 2021, pp.:204.