

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



**TAVUK KOLERASI KÖKENLİ *Pasteurella multocida*
İZOLATLARININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK
KARAKTERİZASYONU**

Doktora Tezi

Sinan PİR

Danışman

Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Bu tez çalışması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Kurulu tarafından PYO. VET.1904.21.009 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Sinan PİR tarafından, Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ danışmanlığında hazırlanan “Tavuk Kolerası Kökenli *Pasteurella multocida* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 14.2.2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Arzu FINDIK Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Didem PEKMEZCİ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Serap SAVAŞAN Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç.Dr. Seyda CENGİZ Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora 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 ☒

02/01/2024

Sinan PİR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : TAVUK KOLERASI KÖKENLİ *Pasteurella multocida* İZOLATLARININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK KARAKTERİZASYONU

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 16.12.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 11

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

02/01/2024

Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

ÖZET

TAVUK KOLERASI KÖKENLİ *Pasteurella multocida* İZOLATLARININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK KARAKTERİZASYONU

Sinan PİR
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı
Doktora, Şubat/2024
Danışman: Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Tavuk kolerası evcil ve/veya yabani kanatlı hayvanları etkileyen, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Tez çalışmasında Tavuk Kolerası şüphesiyle Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilmiş olan tavuklara ait akciğerlerden izole edilen *Pasteurella multocida* suşlarının fenotipik ve genotipik karakterizasyonu amaçlandı.

Bu kapsamda ilgili bölgelerden gönderilen tavuklardan izole edilmiş olan *P. multocida* şüpheli 50 adet bakteri identifikasyon ve karakterizasyon için kullanıldı. Bakteriler ticari olarak temin edilen *Pasteurella* Selektif Agar'a inokulasyon ile canlandırıldı ve 24 adet bakteri *Pasteurella* selektif besi yerinde leylak renkli koloni oluşturdu. İzolatların genotipik identifikasyonları PCR ile gerçekleştirildi. PCR sonucunda 50 adet izolatın 24'ü *P. multocida* olarak identifiye edildi. 17 izolat PCR ile serogrup A olarak tanımlanırken, 7 izolat serogruplandırılmadı. *P. multocida* izolatlarının biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak CRA yöntemi ile araştırıldı. İncelenen 24 adet izolatın 14 (% 58,33)'ü CRA'da siyah koloni oluşturdu ve biyofilm oluşturma özelliği yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Antibiyotik duyarlılıkları ve çoklu antibiyotik direnci Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile 9 antibiyotik sınıfından toplam 14 antibiyotik için belirlendi. İncelenen 24 adet izolatın 16 (%66,7), 24 (%100), 8 (%33,3), 18 (%75,0), 9 (%37,5), 22 (%91,7), 19 (%79,1), 11 (%45,8), 9 (%37,5), 16 (%66,7), 3 (%12,5), 9 (%37,5), 19 (%79,2) ve 12 (%50,0)'si sırasıyla ampisilin, penisilin G, enrofloksasin, eritromisin, florfenikol, linkomisin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, neomisin, spektinomisin, sulfametoksazol/trimetoprim, sefoperazon, sefotaksim ve seftiofura dirençli bulundu. *P. multocida* izolatlarının bazı virülens genleri multipleks PCR ile belirlendi. İncelenen 24 adet izolatın 10 (% 41,67), 15 (% 62,5), 12 (% 50,0), 10 (% 41,67) ve 11 (% 45,83)'ü sırasıyla *fimA*, *fur*, *plpB*, *pmHAS* ve *sodA* yönünden pozitif bulundu. *P. multocida* izolatlarının antibiyotik direncinde rol oynayan bazı genler PCR ile araştırıldı. İncelenen 24 adet izolatın 17 (% 70,83), 13 (% 54,17), 12 (% 50,00), 16 (% 66,67) ve 10'u (% 41,67) sırasıyla *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* için pozitif sonuç verdi. *P. multocida* izolatlarının filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan RAPD-PCR ile genotiplendirme sonucunda izolatların % 22-89 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı.

Sonuç olarak; biyofilm üreten, antibiyotik dirençli ve en fazla virülens genini içeren suşlar kullanılarak aşı geliştirme çalışmaları yapılabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Karakterizasyon, *Pasteurella multocida*, Tavuk Kolerası

ABSTRACT

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Pasteurella multocida* ISOLATES FROM FOWL CHOLERA

Sinan PİR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Microbiology

Ph.D., February/2024

Supervisor: Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Fowl cholera is defined as a septicemic disease affecting domestic and/or wild poultry with high morbidity and mortality. The aim of the thesis study was the phenotypic and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates isolated from the lungs of chickens sent to the Samsun Veterinary Control Institute for the diagnosis of Fowl cholera.

In this context, 50 suspicious *P. multocida* bacteria isolated from chickens sent from the relevant regions were used for identification and characterization. Bacteria were inoculated on commercially available *Pasteurella* Selective Agar, and 24 bacteria formed a mauve-coloured bacterial colony on the *Pasteurella* selective medium. Genotypic identification of the isolates was performed by PCR. As a result of PCR, 24 of 50 isolates were identified as *P. multocida*. While 17 isolates were identified as serogroup A by PCR, 7 isolates could not be serogrouped. Biofilm formation status of isolates was investigated *in vitro* by the CRA method. 14 (58.33%) of the 24 isolates examined formed black colonies in CRA and were evaluated as positive for biofilm formation. Antibiotic susceptibilities and multiple antibiotic resistances were determined for 14 antibiotics from 9 antibiotic classes by the Kirby Bauer Disk Diffusion Method. Of the 24 isolates examined, 16 (66.7%), 24 (100%), 8 (33.3%), 18 (75.0%), 9 (37.5%), 22 (91.7%), 19 (79.1%), 11 (45.8%), 9 (37.5%), 16 (66.7%), 3 (12.5%), 9 (37.5%), 19 (79.2%) and 12 (50.0%) were resistant to ampicillin, penicillin G, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, lincomycin, oxytetracycline, tetracycline, neomycin, spectinomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, cefoperazone, cefotaxime and ceftiofur, respectively. Some virulence genes of *P. multocida* isolates were determined by multiplex PCR. Of the 24 isolates examined, 10 (41.67%), 15 (62.5%), 12 (50.0%), 10 (41.67%) and 11 (45.83%) gave positive results for *fimA*, *fur*, *plpB*, *pmHAS* and *sodA*, respectively. Some antibiotic resistance genes of *P. multocida* isolates were investigated by PCR. Of the 24 isolates examined, 17 (70.83%), 13 (54.17%), 12 (50.00%), 16 (66.67%) and 10 (41.67%) gave positive results for *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* and *dfrA*, respectively. As a result of genotyping with RAPD-PCR to determine the phylogenetic relatedness of *P. multocida* isolates, it was determined that the isolates showed 22-89% similarity.

In conclusion; it was concluded that vaccine development studies could be carried out for the strains with biofilm-producer, antibiotic resistant and contain the most virulence genes.

Keywords: Characterization, Fowl Cholera, *Pasteurella multocida*

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 desteğini esirgemeyen Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Timur GÜLHAN'a, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve destek olan Prof. Dr. Arzu FINDIK'a, Anabilim Dalı'mız öğretim üyesi Prof. Dr. Oktay GENÇ ve Doç.Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ'a, çalışmalarımdaya yardımları için Arş. Gör. Dr. Merve Gizem SEZENER, Dr. Volkan Enes ERGÜDEN ve Veteriner Hekim Şeyda YAMAN'a, laboratuvar çalışmalarımdaya yardımlarını esirgemeyen Dr.Yunus GÜR, Vet.Sağ.Tekn. Faruk DAĞLI ve Sait Özer KARTAL'a, daimi destekçilerim değerli eşim Çiğdem PİR ve sevgili kızlarım Eylül ve Bilge'ye, doktora eğitimim süresince küçük veya büyük farketmeksizin çeşitli şekillerde yardımı dokunan herkese teşekkür ederim.

Bu çalışma PYO.VET.1904.21.009 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Sinan PİR

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	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Etiyoloji	4
2.3. Virülens Faktörleri	6
2.4. Epidemiyoloji	9
2.5. Klinik Bulgular	12
2.6. Teşhis	13
2.7. Koruma ve Kontrol	16
2.8. Halk Sağlığı Etkileri	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Bakteriyolojik Örnekleme ve İdentifikasyon.....	20
3.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Antibiyotiplendirme.....	21
3.3. Biyofilm Üretiminin <i>in vitro</i> Olarak Belirlenmesi	22
3.4. <i>P. multocida</i> İzolatlarının Kapsüler Tiplendirmesi.....	22
3.5. İzolatların Virülens Genlerinin Belirlenmesi	23
3.6. İzolatların Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	23
3.7. Genotiplendirme.....	24
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	25
4.1. Bakteriyolojik Örnekleme ve İdentifikasyon.....	25
4.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Antibiyotiplendirme.....	28
4.3. Biyofilm Üretiminin <i>in vitro</i> Olarak Belirlenmesi.....	36
4.4. <i>P. multocida</i> İzolatlarının Kapsüler Tiplendirmesi.....	38
4.5. İzolatların Virülens Genlerinin Belirlenmesi.....	40
4.6. İzolatların Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	44
4.7. Genotiplendirme.....	47
4.8. Bulguların Toplu Sunumu.....	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	53
ÖZ GEÇMİŞ	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

AM	: Ampisilin
BHI	: Brain Heart Infüzyon
CEP	: Sefoperazon
CRA	: Kongo Kırmızılı Agar
CTX	: Sefotaksim
E	: Eritromisin
ENR	: Enrofloksasin
FFC	: Florfenikol
Fn	: Fibronektin
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
Fur	: Ferrik Alım Regülatörü
FUR	: Seftiofur
IFN	: İnterferon
IL	: İnterleukin
L	: Linkomisin
LPS	: Lipopolisakkarit
MHA	: Mueller Hinton Agar
N	: Neomisin
OMP	: Dış membran proteini
P	: Penisilin G
rci	: Rci Rekombinaz
SPT	: Spektinomisin
SXT	: Sulfametoksazole/trimetoprim
T	: Oksiterasiklin
TE	: Tetrasiklin
TK	: Tavuk Kolerası
TLR	: Toll-Benzeri Reseptör
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>Pasteurella</i> selektif besi yerinde <i>Pasteurella multocida</i> kolonisi	25
Şekil 4.2. <i>Pasteurella multocida</i> tür spesifik PCR sonucu	26
Şekil 4.3. İzolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları	34
Şekil 4.4. Serogrup A içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları	35
Şekil 4.5. Serogruplandırılmayan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları.	35
Şekil 4.6. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının CRA’da biyofilm oluşturma durumları..	36
Şekil 4.7. <i>Pasteurella multocida</i> kapsüler tiplendirmesi için yapılan PCR sonucu	38
Şekil 4.8. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının filogenetik benzerlik analizi	47
Şekil 4.9. Serogrup A içerisinde yer alan <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının filogenetik benzerlik analizi	48
Şekil 4.10. Serogruplandırılmayan <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının filogenetik benzerlik analizi	48

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>Pasteurella multocida</i> 'nın yakın ilişkili olduğu diğer bakterilerden ayırt edici özellikleri	15
Tablo 2.2. <i>Pasteurella multocida</i> 'nın alt türlerinin tanımlanmasında kullanılan özellikler	15
Tablo 3.1. İzolatların PCR ile identifikasyonu için kullanılan oligonükleotit primerler	21
Tablo 3.2. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının kapsül tiplendirmesi için kullanılan oligonükleotit primerler	22
Tablo 3.3. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarında araştırılan virülens genleri	23
Tablo 3.4. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarında araştırılan antibiyotik direnç genleri..	24
Tablo 4.1. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri	29
Tablo 4.2. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	31
Tablo 4.3. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profilleri	33
Tablo 4.4. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının kalitatif antibiyotiplendirmesi	34
Tablo 4.5. <i>Pasteurella multocida</i> biyofilm sonuçları	37
Tablo 4.6. <i>Pasteurella multocida</i> kapsüller tiplendirme sonuçları	39
Tablo 4.7. <i>fur</i> , <i>sodA</i> , <i>pmHAS</i> , <i>plpB</i> ve <i>fimA</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü	41
Tablo 4.8. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının <i>fimA</i> , <i>pmHAS</i> , <i>soda</i> , <i>plpB</i> ve <i>fur</i> gen profilleri	41
Tablo 4.9. <i>Pasteurella multocida</i> serogruplarının <i>fimA</i> , <i>pmHAS</i> , <i>soda</i> , <i>plpB</i> ve <i>fur</i> gen profilleri	42
Tablo 4.10. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının virulotiplendirilmesi	42
Tablo 4.11. <i>tetH</i> , <i>bla</i> , <i>aphA1</i> , <i>sul1</i> ve <i>dfrA</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü	44
Tablo 4.12. <i>Pasteurella multocida</i> izolatlarının antibiyotik direnç gen profilleri.....	45
Tablo 4.13. <i>Pasteurella multocida</i> serogruplarının antibiyotik direnç gen profilleri...	45
Tablo 4.14. <i>Pasteurella multocida</i> izolatları için çalışma kapsamında elde edilen bulguların toplu sunumu	50

1. GİRİŞ

Tavuk kolerası (TK) (avian kolera, kanatlı pastörellozu, kanatlı hemorajik septisemisi), tüm kanatlı türlerini etkileyebilen ve dünya çapında yaygın olarak görülen bulaşıcı bir bakteriyel hastalıktır. Yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak görülür, ancak çoğunlukla kronikleşme veya iyileşme ile sonuçlanır. 18. yüzyılın yarısından sonraki süreçte Avrupa’da kanatlılar arasında birçok salgın görülmüştür.

Tavuk kolerası etkeni *Pasteurellaceae* familyasının bir üyesi olan *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*'dır. *P. multocida* subsp. *multocida* Tavuk Kolerası’nın en yaygın etkeni olmakla birlikte *P. multocida* subsp. *septica* ve *P. multocida* subsp. *gallicida*’nın da kümes hayvanlarında bir dereceye kadar kolera benzeri hastalığa neden olduğu bilinmektedir.

P. multocida suşlarının patogenezi veya virulensinin kanatlı kolerası ile ilişkisi suşa, konak türüne, konak veya suştaki varyasyonlara ve ikisi arasındaki temas koşullarına bağlı olarak karmaşık ve değişkendir. *P. multocida* genellikle tavukların farenks veya üst solunum yolu mukozasından dokulara giriş yapar. Normal olarak yaz sonu, sonbahar ve kış aylarında daha yaygındır. Bu mevsimsel durum, tavukların yetişkin olduklarında daha duyarlı hale gelmeleri dışında, düşük dirençten de ziyade hastalığa zemin hazırlayan koşullardan birisidir.

Tavuk Kolerası’nın ön tanısı klinik gözlemler, nekropsi bulguları veya *P. multocida* izolasyonu ile yapılabilir. Kesin teşhis ise daha önce söz edilmiş olan hastalık bulguları ve lezyonlara göre konulmalıdır.

Antibakteriyel kemoterapi, Tavuk Kolerası’nın tedavisinde kullanılan ilaca ve tedavideki hıza bağlı olarak değişik ölçülerde başarı sağlamakla beraber halen yaygın olarak tercih edilmektedir. *P. multocida*’nın kemoterapötiklere karşı duyarlılığının değişken olması ve özellikle kullanılan ajanın uzun süre kullanımında tedaviye direnç gelişmesi nedeniyle tedavi öncesinde antibiyotik duyarlılık testleri gerekmektedir. Bununla beraber Tavuk Kolerası’nın önlenmesi *P. multocida* rezervuarlarının ortadan kaldırılmasıyla veya bunların kanatlı sürülerine temasının engellenmesiyle sağlanabilir.

Tez çalışması Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü’ne bağlı Amasya, Giresun, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Sivas, Tokat ve Trabzon illerinden Tavuk Kolerası yönünden teşhis amacıyla Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü

Müdürlüğü'ne gönderilmiş olan tavuklara ait marazi maddelerden izole edilen *Pasteurella multocida* suşlarının fenotipik ve genotipik karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirildi.



2. GENEL BİLGİLER

Tavuk Kolerası, kanatlı hayvanların en yaygın Pastörellozisi'dir. Hastalık tavukların yanı sıra hindileri, ördekleri, kazları, yırtıcı kuşları ve kanaryaları da etkilemektedir. *P. multocida*'nın primer enfeksiyon bölgesi genellikle solunum yoludur. Enfeksiyonların seyri perakut/akut enfeksiyonlardan kronik enfeksiyonlara kadar değişebilir. Perakut ve akut enfeksiyonlarda ölümden önce çok az klinik bulgu gözlenir ve genel septisemik lezyonlar hakimdir. *P. multocida* enfeksiyonlarının kronik formlarında, genellikle solunum yolu, konjunktiva ve kafa dokuları gibi geniş bir alana dağılım gösteren süpüratif lezyonlar gözlemlenir. Tavuk Kolerası, kronik veya subklinik enfeksiyonlar meydana getirirse de özellikle yetişkin hayvanlarda sıklıkla akut ölümcül septisemiye neden olmaktadır. Hastalık tipik olarak yaşlı hayvanlarda bakteriyemi ve yüksek morbidite ile mortaliteye sahip şiddetli bir hastalık olarak ortaya çıkar. Kronik enfeksiyonlarda lokalize enfeksiyonlara bağlı klinik belirtiler ve lezyonlar görülebilir. Akciğer ve kas-iskelet sistemi dokuları da sıklıkla kronik enfeksiyon merkezleridir. Tavuklarda Salmonellozis, Kolibasillozis ve Listeriozis ile hindilerde Psödotüberkülozis, Erizipel ve Klamidiyazis gibi bazı bakteriyel hastalıklar tavuk kolerasına benzer klinik belirtilerle ortaya çıkabilir.

P. multocida enfeksiyonlarının şiddeti ve insidansı, konakçı, çevre ve bakteri suşunun özelliklerine göre değişiklik gösterir. Bakteride bulunabilen kapsül, endotoksin, dış zar proteinleri, demir bağlama sistemleri, ısı şoku proteinleri, nöraminidaz üretimi ve antikor parçalayıcı enzimler muhtemel virülens faktörleri olarak belirlenmiştir.

P. multocida enfeksiyonlarının önlenmesindeki en etkili yol işletme izolasyonudur. Bununla birlikte, koruyucu önlem olarak aşılamanın da tavsiye edildiği yönetim sistemleri dünyanın birçok yerinde uygulanmaktadır.

2.1. Tarihçe

Tavuk kolerası evcil ve yabani kanatlı hayvanları etkileyen bulaşıcı bir hastalıktır. Yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak görülür ancak çoğunlukla kronikleşme veya iyileşme ile sonuçlanır.

18. yüzyılın ilk yarısından sonra Avrupa'da kanatlılar arasında birçok salgına yol açan hastalık için ilk kez Mailet tarafından Tavuk kolerası ifadesi kullanılmıştır. Huppe, 1886'da hastalığı hemorajik septisemi olarak adlandırmış ve Lignieres 1900'de hastalık için Tavuk Pastörellozisi ifadesini kullanmıştır. 1851'de Benjamin

hastalığı tanımlamıştır. 1877 ve 1878'de İtalya'dan Perroncito ve Rusya'dan Semmer, bakteriden etkilenmiş kanatlıların dokularında tek ya da çift halinde bulunan etkeni belirlemişler ve sonrasında 1879'da Toussaint bakteriyi tanımlamıştır (Gray, 1913). İlk kez 1880'de tavuk kolerasının etkeni olarak Pasteur tarafından saf kültür olarak izole edilmiştir (Pasteur, 1880).

2.2. Etiyoloji

Tavuk kolerası'nın etkeni *Pasteurella multocida*'dır. Geçmişte bakteriye birçok isim verilmiştir. İlk olarak 1883 yılında *Micrococcus gallicidus* olarak isimlendirilen bakteri, sonrasında sırasıyla *M. cholerae gallinarum* (1885), *Octopsis cholerae gallinauni* (1885), *Bacterium choleare gallinarum* (1886), *Bacillus cholerae gallinarum* (1887), *Coccobacillus avicidus* (1888), *P. avicida* (1889), *Bacterium multacidum* (1889), *P. avium* (1903), *Bacillus avicepticus* (1903), *Bacterium avisepticum* (1903), *Bacterium avisepticus* (1912) ve *P. aviseptica* (1920) olarak adlandırılmıştır (Buchanan et al., 1966). İlerleyen yıllarda etken *P. avicida* veya *P. aviseptica*, *P. muricida* veya *P. muriseptica* olarak izole edildiği hayvana göre adlandırılmışken, 1929'da tüm izolatların *P. septica* olarak isimlendirilmesi önerilmiştir (Wilson and Miles, 1964). 1939'da ise *Pasteurella multocida* olarak isimlendirilmiştir (Fajfar-Whetstone et al., 1995). Mutters vd. (1985), *Pasteurella* cinsinde yer alan bakterileri *P. multocida*, *P. septica* ve *P. gallicida* dahil olmak üzere 11 türe ayırmıştır. *Pasteurella* sensu stricto cinsi şu anda en az on bir tür içermesine karşın *P. multocida* ve onun üç alt türü, *P. gallinarum*, *P. avium*, *P. volantium*, *P. anatis*, *P. langaa* kanatlılarla ilişkilendirilmiştir (Bisgaard, 1993). Bunlardan *P. multocida* kanatlı kolerasının etkeni olarak kabul edilmektedir (Rimler and Glisson, 1997). *P. multocida*'nın üç alt türü (*P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica* ve *P. multocida* subsp. *gallicida*) bilinmektedir (Mutters et al., 1985). Yapılan araştırmalarda *Pasteurellaceae* familyasının birçok türü için konak özgünlüğünün var olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber *Pasteurella* sensu stricto cinsinin en önemli patojeni olan *P. multocida* birçok yabani ve evcil hayvan türünü içeren geniş bir konakçı spektrumuna sahiptir. *P. multocida* subsp. *gallicida* ve *P. multocida* subsp. *septica* sırasıyla kümes hayvanlarından ve evcil hayvanlardan izole edilmiştir (Mutters et al., 1985). *P. multocida* subspecies *multocida* tavuk ve hindilerden en çok izole edilen alt tür olmakla birlikte *P. multocida* subsp. *septica* da daha az oranda bildirilmiştir. *P. multocida* subsp. *gallicida* esas olarak perde ayaklı

kuşlarla ilişkili olmasına karşın domuzlarda da etken bildirimi yapılmıştır (Cameron et al., 1996). Capitini vd. (2002) tarafından kaplan ısırıkları ile ilişkili olarak fenotip ve 16S rRNA gen dizisi karşılaştırması sonucunda dördüncü alt tür olmak üzere *P. multocida* subsp. *tigris* izolatları tanımlanmıştır.

P. multocida Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, tek başına veya çiftler halinde ve bazen zincir ya da filamentler halinde bulunan çomak şekilli bir bakteridir. 0.2-0.4 x 0.6-2.5 mm boyutlarında olup, tekrarlanan subkültürlerinden sonra pleomorfik olma eğilimi göstermektedir. Yeni izole edilenler bakteride indirekt boyama metodu ile kapsül varlığı belirlenebilir ve dokularda, kanda ve yeni kültürlerde bipolar boyanma karakteristiği gözlenebilir. Bakteride pilus varlığı da bildirilmiştir (Glorioso et al., 1982, Rebers et al., 1988).

Aerobik veya anaerobik koşullarda üreyebilen *P. multocida*'nın optimal üreme sıcaklığı 37°C ve pH aralığı 7.2-7.8'dir. Sıvı besi yerinde 16-24 saatte inkübasyon sonrasında bulanıklık oluşturacak şekilde ürer ve birkaç gün içerisinde yapışkan bir tortu oluşturur. Bazı izolatlar ise flokülant bir presipitat oluşturacak şekilde ürerler. Bakterinin üremesi pepton, kazein hidrolizat veya kanatlı serumu varlığında daha iyi olmasına rağmen, at, sığır, koyun ve keçi kan veya serumu *P. multocida* üremesini inhibe eder (Ryu, 1961). %5 kanatlı serumu içeren Dekstroz Nişasta Agar *P. multocida* izolasyonu için en iyi besi yeri olarak tanımlanmıştır. İzolasyon için ticari olarak mevcut besi yerleri bulunmaktadır.

P. multocida'nın ilk izolasyonunda koloniler çeşitli yoğunluklarda iridesan (floresan), iridesan olmayan ya da çok az iridesan olarak mavi renkte görünebilirler. İridesans özelliği kapsül varlığı ile ilişkilidir. TK'nın akut olgulardan primer izolasyonda iridesan ve S tipli koloniler sirküler (2-3 mm), düzgün, konveks, saydam, parlak, butirözdür. S tipli koloniler subkültür sonucunda R tipli koloni oluşturabilirler. Yapılan bir çalışmada TK izolatu *P. multocida*'nın koloni morfolojisinin 3 tip gösterdiği ve akut TK salgını ile ilişkili çok virulent suşların iridesan koloni özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Mavi tip koloni oluşturanların düşük virülense sahip oldukları ve bu suşların koleranın enzootik seyrettiği sürülerden izole edildiği bildirilmiştir. Orta şiddette iridesan gösteren diğer tip ise virulent olarak bildirilmiştir (Hughes, 1930).

P. multocida şeker fermentasyonu sırasında gaz üretmez fakat oksidaz, katalaz, peroksidaz özellikleri pozitif olup, besi yerinde karakteristik bir koku oluşması identifikasyonda önemlidir. Birçok Gram negatif bakterinin aksine,

penisiline duyarlıdır. *P. multocida*'nın alt türleri ve serovarları arasındaki ilişki serotiplendirme yöntemleri ile net olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Uzun yıllar boyunca pasif hemaglutinasyon testleri, spesifik kapsül antijenlerine dayalı bir serogruplandırma sisteminin temelini oluştururken (Carter, 1955; OIE, 1996), somatik antijenlerin tespitinde tüp aglütinasyon ve jel difüzyon çökeltme testleri kullanılmıştır (Namioka and Murata, 1961; OIE, 1996; Heddleston et al., 1972). Kapsüller tiplerin identifikasyonu spesifik mukopolisakkaritler ile kapsül depolimerizasyonu vasıtasıyla gerçekleştirilebildiği gibi (Rimler, 1994), konvansiyonel testlere göre daha az zahmetli ve daha spesifik olan, son derece spesifik multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile de gerçekleştirilebilmektedir (Townsend et al., 2001). Halen *P. multocida*'nın beş kapsüler (A, B, D, E ve F) ve on altı somatik (1-16) serovarı tanınmaktadır (Rimler and Rhoades, 1989). Farklı kanatlı türlerinden izole edilen *P. multocida* suşlarının büyük oranda A, B, D ve F tipine ait oldukları bildirilmiştir (Rhoades and Rimler, 1987). Kapsüler tip A, B, D ve F kanatlı konakçılarından izole edilmiştir (OIE, 1996). Bununla birlikte serovar A, en şiddetli kanatlı kolerası vakalarından en sık izole edilen serogrup olarak göze çarpmaktadır (Rhoades and Rimler, 1987; Rimler and Rhoades, 1989). B, D ve F serovarları içinde somatik serotip varyasyonunun meydana gelmesi gibi Serovar A izolatlarının on altı somatik serovarından birkaçında benzer varyasyonun olduğu bildirilmiştir (Rhoades and Rimler, 1987). Serovar A içindeki somatik serovarlar 1, 3 ile 3, 4 sırasıyla İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kanatlı kolerasından izole edilen en baskın suşlar olmasına rağmen (Curtis, 1981; Rhoades and Rimler, 1990), belirli bir serovarin diğerlerinden daha fazla veya daha az öldürücü olduğunu göstermemektedir. Lee vd. (1988a) yaygın serovar A:3,4'ün farklı izolatlarının virülens açısından büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur.

2.3. Virülens Faktörleri

TK'nın klinik bulgularını ve şiddetini belirleyen en önemli unsurlar etkenin sahip oldukları virülens faktörleri ve karakteristik özellikleridir. *P. multocida* suşlarının virülensi suşa, konak türüne, konak veya suştaki varyasyonlara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Farklı kanatlı konakçıları için farklı alt türlerin virülens özellikleri belirsizdir. Virülens yönünden gözlenen suş varyasyonları tek bir faktörle

ilişkilendirilmemiştir (Lee et al., 1988b). Hastalığa neden olan *P. multocida* izolatları ile ilişkili birçok virülens faktörü bulunmaktadır.

Kapsül, avian *P. multocida*'nın ana virülens faktörü olarak kabul edilmekle birlikte diğer faktörlerin de enfeksiyonların prognozunu etkilediği bilinmektedir. *P. multocida* patogeneğinde virülens belirleyicileri olarak kapsülün önemi açıkça ortaya konmuş, ancak bugüne kadar sırasıyla Kanatlı Kolerası ve Hemorajik Septisemi enfeksiyonlarından *P. multocida* kapsüller tip A ve B üzerine yoğunlaşmıştır (Harper et al., 2006). *P. multocida* serogruplarında kapsüle ait biyosentetik lokusların genetik organizasyonu belirlenmiş ve gözden geçirilmiştir (Harper et al., 2006). Beş kapsüler biyosentetik bölgenin karşılaştırmalı analizi, suşlar arasındaki serolojik farklılıklar için bir genetik temeli doğrulayan serogruba özgü bölgeleri tanımlamıştır. *P. multocida*'da kapsülün varlığı ve kalınlığı ile ilişkili olarak antifagositik aktivite bildirilmiştir. *P. multocida* serotipi A:3'ün hiyalüronidaz ile dekapülasyonu makrofajlar tarafından fagositozu arttırmıştır (Pruimboom et al., 1996). Ayrıca, izojenik kapsülsüz *P. multocida* serogrup A suşlarının fagositoza karşı duyarlılığı, kapsüllü yaban tip suştan önemli ölçüde fazla bulunmuştur (Boyce and Adler, 2000). *P. multocida* kapsülünün adezyondaki rolü ile ilgili hem bakteriyel suş hem de çalışmalarda kullanılan konakçı hücre tipine bağlı olabilen çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Pruimboom vd. (1996), *P. multocida*'nın makrofajlara adezyonuna kapsüler hyaluronik asitin aracılık ettiğini bildirmişlerdir. Kapsülün enzimatik depolimerizasyonu, *P. multocida* serogrup A'nın HeLa hücrelerine ve makrofajlarına adezyonunu azaltmıştır (Esslinger et al., 1994).

P. multocida OMP'si *P. multocida*'nın önde gelen virülens faktörlerinden veya immünojenik elementlerinden biridir ve birden fazla enfekte konakçıda immün tepkileri ortaya çıkarmaktan sorumludur. Bu proteinlerin tanımlanması, araştırmacıların bakteriyel enfeksiyona karşı bir aşı olarak OMP'lerin kullanımına olanak tanımaktadır (Davies and Lee, 2004). *P. multocida* OmpA, *in vivo* korunan, yüzeyde sergilenen ve eksprese edilen büyük bir immünojenik ve antijenik OMP olarak bildirilmiştir. OMP'ye karşı yüksek antikör tepkileri, virülent *P. multocida* ile mücadeleye karşı direnci ile tutarlı bir şekilde ilişkili bulunmuştur (Dabo et al., 2003).

Toksinler kanatlı kolerasının patogeneğinde rol oynayabilir. Domuzlarda atrofik rinitte gözlenen lezyonların bir kısmından, *P. multocida* ile enfekte kanatlı enfeksiyonlarında da bazı lezyonlardan sorumlu *P. multocida* toksini olası bir

virölens faktörüdür (Foged, 1992; Christensen and Bisgaard, 1997). Pasteurellaceae familyasının bazı üyelerinin patogenezinde büyük önem taşıyan RTX toksinlerinin üretimi *P. multocida*'da gözlenmemiştir. *P. multocida*'nın serum bileşenleri tarafından öldürülmeye karşı koyma yeteneği bir virölens belirteci olarak pratik değeri olabilecek birkaç faktörden biridir (Lee et al., 1988b).

Adezyon bakteriyel enfeksiyonlar için birincil ön koşuldur. Yapışmaya katılan ligandlar ise potansiyel virölens faktörleridir. Enfeksiyonun erken safhasında bakteriyel adereanse iştirak eden *P. multocida* genlerinin belirlenmesi, *P. multocida*'nın moleküler patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Kommensal ve patojenik *P. multocida* arasındaki moleküler farklılıklar tam net olmamakla beraber, mekanizmalar açık bir şekilde ikincisinin, büyük olasılıkla toll-benzeri reseptör (TLR) sinyali yoluyla enflamatuvar tepkileri indüklemeye yeteneğini içermektedir. TLR sinyali, bakteriyel tanıma, öldürme ve adaptif bağışıklığın aktivasyonu yoluyla enfeksiyona karşı ilk savunma hattını sağlayan, doğuştan gelen konak savunması için çok önemlidir. Çünkü artan sayıda bakteriyel adezinin proenflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu için TLR'ye bağlı olduğu bildirilmiştir (Inatsuka et al., 2005; Fischer et al., 2006). *P. multocida* serogrup A özellikle HeLa ve tavşan faringeal hücrelerine fimbria ile *in vivo* ve *in vitro* bağlanabilmektedir. *P. multocida* serogrup A, B, D ve B:2 suşlarının tip IV fimbriyalara sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, *P. multocida* serogruplarında tip IV fimbriyanın yapışmada rolü olmadığı bildirilmiştir (Doughty et al., 2000; Siju et al., 2007).

P. multocida 'da LPS'ler, birçok Gram-negatif bakteride bulunan R-tipi LPS'ye biyolojik ve kimyasal olarak benzer özelliklere ve yapıya sahiptir (Harper et al., 2006). Bu moleküller klasik endotoksik şok belirtilerini indüklemektedirler (Rimler and Rhoades, 1989). Safılaştırılmış *P. multocida* LPS'sinin oldukça antijenik olduğu belirlenmiştir. Yaygın vasküler değişiklikler ve ölüme neden olabilmekle birlikte immünojenitesi nispeten zayıftır. Genellikle, *P. multocida* immünojenik LPS'si proteinler veya ribozomlar ile kompleks olarak uygulandığında koruyucu olmuştur. Ryu ve Kim (2000) *P. multocida* tip A:3 LPS-protein kompleksi ile aşılınmış farelerde tam koruma görmüşlerdir; fakat ne LPS ne de protein tek başına koruma sağlamamıştır. LPS ayrıca *P. multocida* enfeksiyonuna karşı konak savunmasının uyarıcısı olarak da rol oynamaktadır (Galdiero et al., 2000). Safılaştırılmış *P. multocida* 'da LPS, enflamatuvar (IL-1a, IL-6 ve TNF-a) ve immüno-düzenleyici

sitokinler (IFN- γ ve IL-12) de dahil olmak üzere farelerde birkaç sitokin ekspresyonunu ve salınmasını uyarmıştır.

Demir, bakterilerin konakçıdan sağladığı ve üreme için gerek duyduğu bir üreme faktörüdür. Fakat toksik etkisinin fazla olması nedeniyle ortamda eser miktarda bulunması gereklidir. Bu nedenle *P. multocida* diğer bakteriler gibi demire karşı tolerans gösterebilmek için birçok mekanizmaya sahiptir (Harper et al., 2006). Demir edinimi veya alımı bakteriyel canlılık için gereklidir. Patojenik bakteriler bunun için farklı stratejiler geliştirmiştir. *P. multocida*, demir bağlayıcı konak moleküller (transferrin, hemoglobin ve hemin) için hem demir-bağlayıcı iyonoforlar hem de dış membran reseptörleri üretmektedir (Ogunnariwo et al., 1991).

P. multocida'da proteazlar ve lipazlar gibi çeşitli hücre dışı enzimlerin olası virülens faktörleri olduğu bildirilmiştir (Pratt et al., 2000). Lipazların patojenitede rolünün olduğu düşünülmüş, bununla birlikte proteazların konakçı savunmasını bozan konak IgG'ye karşı ve opsonizasyonu azaltarak patojenlere yardımcı olabildiği belirlenmiştir.

Hastalığın şiddetini ve görülme sıklığını etkileyen diğer faktörler arasında çevresel faktörler, iklim, eşzamanlı hastalık, beslenme stresi ve konağın yaşı yer alır (Collins, 1977; Simensen et al., 1980). On altı haftalıktan küçük tavukların nispeten dirençli olduğu ve yaştan enfeksiyonun sonucunu önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir. Doğal koşullar altında, yukarıda belirtilen faktörlere bağlı olarak, ölüm oranı % 1-100 arasında değişkenlik gösterir (Rimler and Glisson, 1997).

2.4. Epidemiyoloji

TK dünya çapında görülmesine ve uzun yıllardır kapsamlı bir şekilde çalışılmasına rağmen birçok yönü henüz tam olarak anlaşılamamıştır ve hastalığın epidemiyolojisi tartışmalı olmaya devam etmektedir (Rimler and Glisson, 1997). Serotipler içindeki genotipik varyasyon nedeniyle, serotiplendirme birçok durumda enfeksiyonların epidemiyolojisini belirlemek için yeterli ayrıntılı bilgi sağlamamaktadır. Yabani kuşlardan elde edilen suşlar da dahil olmak üzere farklı kökenlere sahip *P. multocida* suşlarına restriksiyon endonükleaz analizi ve ribotipleme şeklinde DNA parmak izi uygulanmış olup bu yöntemin hindilerde kolera epidemiyolojisinin çalışılmasında değerli olduğu ortaya konmuştur (Snipes et al., 1990; Carpenter et al., 1991; Christiansen et al., 1992).

TK yaz sonu, sonbahar ve kış aylarında daha yaygın olarak görülmektedir. *P. multocida*, yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar, güneş ışığı, kurutma veya ısı ile kolayca etkisiz hale gelen oldukça hassas bir organizmadır ve çalışmalarda *P. multocida*'nın çevrede (örn. su veya toprak) maksimum otuz gün hayatta kalacağı bildirilmiştir (Backstrand and Botzler, 1986; Rimler and Glisson, 1997). Henüz bilinmeyen faktörlere bağlı olarak kontamine ortamların otuz günden daha uzun süreler boyunca rezervuar olarak kaldığı düşünülmemektedir.

TK birçok kanatlı türünde görülebilmektedir. TK salgınları tavukları, hindileri, ördekleri veya kazları etkileyebilmekle birlikte, diğer kümes hayvanları, kafes kuşları ve yabani kuşları da hastalığın konakçıları arasındadır. *P. multocida* 50'den fazla yabani kuş türünden izole edilmiştir (Faddoul et al., 1967). *P. multocida* genellikle farenks veya üst solunum yolu mukozasından vücuda giriş yapmakla birlikte, konjunktiva veya derideki yaralar da bulaşma yollarındandır (Hughes and Pritchett, 1930). *P. multocida*'nın yaşam alanı, memelilerin, kanatlıların ve insanların mukozal yüzeyleri dahil olmak üzere çok geniş olduğundan birçok kaynak potansiyel rezervuar görevi görebilir (Bisgaard, 1993). Yabani kuşlar ve evcil kümes hayvanları arasında *P. multocida* subsp. *multocida* geçişinin mümkün olduğu ve yabani kuşların hastalığı yeni alanlara yayabilecek kapasitede olduğu bildirilmektedir (Christensen et al., 1998; Christensen et al., 1999; Snipes et al., 1990).

Hindiler *P. multocida* enfeksiyonuna tavuklara göre ve erişkin tavuklar da gençlere göre enfeksiyona daha duyarlıdır (Heddleston 1962). Evcil kazlar ve ördekler de hastalığa duyarlıdır (Curtice, 1902). Tavuklarda TK'dan ölüm genellikle yumurtacı sürülerde olur, çünkü bu yaştaki tavuklar daha genç tavuklardan daha duyarlıdır. Genellikle yumurta üretiminde azalma görülmektedir. Onaltı haftalıktan küçük olan tavuklar genellikle oldukça dayanıklıdır ve doğal yolla enfekte olan tavuklarda mortalite genellikle % 0-20 arasındadır (Bolin and Eveleth, 1951). TK izolatu *P. multocida*'ya karşı memeliler genellikle dirençli iken, istisna olarak enfeksiyon sonucunda tavşan ve farelerde ölüm görülmüştür (Heddleston and Watko, 1963).

Tavuk kolerası salgını olmayan sürülerdeki taşıyıcıların varlığına ilişkin sınırlı bilgiler nedeniyle birçok çalışmada hastalığı atlatan hayvanların enfeksiyon rezervuarı olarak görebileceği öne sürülmüştür. Ancak, Muhairwa vd. (2000) yaptıkları bir araştırmada sağlıklı görünen kanatlı sürülerinde (tavuklar ve ördekler dahil) *P. multocida* subsp. *multocida* ve *P. multocida* subsp. *septica*'nın yüksek

taşıyıcılık oranına sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, birçok kanatlının kloakal mukozada *P. multocida* taşıdığı saptanmıştır.

Kronik olarak enfekte tavuklar ile beraber yabani kuşların diğer kanatlılarla teması enfeksiyonun ana kaynağı olarak düşünülmektedir. Nadir de olsa yumurta yoluyla etken geçişi şekillenebilir (Iliev et al., 1963). *P. multocida*'nın yumurta yoluyla bulaşmasının bir risk teşkil etmediğine inanılmaktadır (Rimler and Glisson, 1997), ancak teorik olarak kloakadan geçiş sırasında yumurta kabuklarının kontaminasyonu meydana gelebilir. Bununla birlikte, mikroorganizmanın hassas yapısı göz önüne alındığında bu tip kontaminasyonun önemsiz olması muhtemeldir. *P. multocida*'nın sürü içerisinde yayılması primer olarak hasta tavukların ağız, burun ve konjunktiva akıntılarının çevreyi, özellikle yem ve suyu kontamine etmesiyle olmaktadır. Dışkı ile bulaşma ihtimali ise çok düşüktür (Reis, 1941). Hasta hayvanların ağız, burun ve konjunktiva salgılarının genellikle çevrenin kontaminasyonunun birincil kaynağı olduğuna inanılmakta ve aerosol yol ile bulaşmanın daha az önemli olduğu bildirilmektedir (Bierer and Derieux, 1973). Diğer potansiyel enfeksiyon kaynakları, enfeksiyondan ölen kuşların kavruları ve enfekte kuşlarla temas eden ekipman veya böceklerdir.

İnsektlerin vektör olarak TK'yı yayma olasılığı hakkındaki çalışmalar sonucunda sineklerin en yoğun olduğu zamanda örgü telle kanatlıların ayrılmış olması sonucunda enfeksiyonun yayılmadığı görülmüştür (Van Es and Olney, 1940). Bununla beraber daha önce enfekte hayvan kanı emmiş olan sineklerle hindilerin beslenmesi sonucunda deneysel olarak enfeksiyon bulaştırılmıştır (Skidmore, 1932).

P. multocida'nın enfeksiyon bölgesinin genellikle solunum yolu olduğu düşünülmektedir (Maheswaran et al., 1973; Rimler and Glisson, 1997). Bununla birlikte okülo-nazal-oral yollarla inokülasyonda tipik akciğer lezyonları ve progresif bakteriyemi oluşturulmuş (Prantner et al., 1990) ve bu da diğer mukozal membranların da giriş yolları olabileceğini göstermiştir.

P. multocida'nın gastrointestinal sistemden geçişte hayatta kalma yeteneği sınırlıdır (Rimler and Glisson, 1997), ancak taşıyıcı kuşların kloakal yüzeyinde *P. multocida*'nın varlığı, bazı suşların geçişte hayatta kaldığını göstermektedir (Muhairwa et al., 2000). Bazı *P. multocida* suşlarının oral uygulamayı takiben virulan ve immünojenik olabildiğinin gözlemlenmesi de bağırsak mukozasıyla etkileşimin bir dereceye kadar meydana geldiğini düşündürmektedir (Lee et al., 1988a; Frost et al., 1999).

P. multocida deri yoluyla dokulara girmesi sonucu sepsisemi (Rimler and Rhoades, 1989) veya lokalize deri lezyonları (Glass and Panigrahy, 1990; Frame et al., 1994) oluşabilir. Bir üst solunum yolu enfeksiyonunu takiben *P. multocida* akciğerlere yayılabilir ve kan dolaşımına girmeden önce çoğalabilir (Matsumoto et al., 1991). *P. multocida* kan dolaşımına girdikten sonra ya hızla çoğalır (Snipes et al., 1987) ya da büyük bir bakteriyemiden önce ilk çoğalmanın gerçekleştiği karaciğer ve dalakta lokalize olur (Tsuji and Matsumoto, 1989). Akut TK sonucunda *P. multocida* endotoksin ürettiğinden, ölümün endotoksinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Collins, 1977).

2.5. Klinik Bulgular

P. multocida enfeksiyonlarında, enfeksiyonun seyrine bağlı olarak çeşitli belirtiler gözlenebilir. Perakut ve akut enfeksiyonlarda çok az belirti görülür ve bu durumlarda ölüm genellikle sürüdeki tek hastalık belirtisidir. Akut TK'da enfeksiyon bulguları genellikle ölümden önceki birkaç saatte gözlenir. Bu süreçte enfekte tavuklarda semptom görülmeksizin ölüm meydana gelebilir. Semptomlar ise genellikle ateş, anoreksi, tüylerde karışıklık, ağızdan mukoz akıntı, diyare ve solunum hızında artış şeklindedir. Ölümden hemen önce en çok baş ve sakal bölgesindeki tüysüz alanlarda olmak üzere siyanoz şekillenebilir. Başlangıçta sulu-beyaz renkte, sonra ise yeşilimsi hale gelen ve mukus içeren diyare görülebilir. Akut hastalığı atlatan hayvanlarda zayıflama ve dehidratasyon görülebildiği gibi, enfeksiyon kronikleşebilir ya da iyileşme ile sonuçlanabilir.

Hastalığın perakut veya akut formlarında, ölüm sonrası nekropsi bulguları olarak karkasta pasif hiperemi ve konjesyonların yanı sıra vasküler bozukluklar gibi genel sepsisemik lezyonlar hâkimdir. Abdominal ve koroner yağ tabakasında, bağırsak mukozasında, göğüs ve karın boşluklarında, subserozal yüzeylerde peteşiyal ve ekimotik kanamalar görülebilir. Karaciğer ve dalak sıklıkla şişer ve genel ya da çok sayıda küçük fokal nekroz alanları içerebilir. Özellikle lezyonların çok karakteristik olabileceği hindilerde sıklıkla akciğer tutulumu gözlemlenir. Enfeksiyonun akut formlarında akciğerde kanamalar hakimdir ve bunu nekroz ve etkilenen bölgelerin etkilenmemiş dokudan açıkça ayrıldığı fibrinöz plöropnömoni izler. Geniş fibrin eksüdasyonu ile pleura ve akciğerlerin tek taraflı veya çift taraflı prodüktif inflamasyonu söz konusudur. Histolojik olarak lezyonlar çoğunlukla

heterofilik infiltrasyonlarla ilişkilidir (Rimler and Rhoades, 1989; Rimler and Glisson, 1997).

Kronik TK, hastalığın akut aşamasını atlatan kanatlılarda şekillenebileceği gibi, düşük virülense sahip mikroorganizma ile enfeksiyon sonucu da oluşabilir. Bulgular genellikle lokalize enfeksiyon şeklinde seyreder ve sakal, sinüsler, eklemler, ayak yastıkları ve sternal bursalarda genellikle şişkinlik görülür. Eksudatif konjunktival ve farengeal lezyonlar gözlenebilir ve bazen tortikollis gelişir. Trakeal tıkanma ve nefes darlığı da en çok görülen semptomlar arasındadır. Genel depresyon, tüylerde kabarıklık ve ishal görülebilir. Hindilerde ciddi dermal nekroz formları da bildirilmiştir. Nekropsi bulguları olarak kazeoz artrit, periton boşluğunun ve oviduktun yangısı kronik enfeksiyonlarda sık görülür. Hindilerde ve etlik piliçlerde sırt, karın ve göğsün kaudal kısımlarının kutis, subkutis ve alttaki kasları tutan bir fibrino-nekrotik dermatit görülebilir (Glass and Panigrahy, 1990; Frame et al., 1994).

2.6. Teşhis

TK'nın ön teşhisi klinik gözlemler, nekropsi bulguları ve kesin teşhis ise *P. multocida* izolasyonu ya da moleküler yöntemler ile yapılabilir. Hastalığın öyküsü, klinik belirtileri ve lezyonlar tanıda yardımcı olsa da hastalığın kesin tanısı için yetersiz olup kesin tanı için organizmanın izolasyonu önemlidir. Teşhis, hastalık belirtilerini gösteren hayvanlardan izole edilen *P. multocida* bakterisinin tanımlanmasına veya PCR gibi spesifik moleküler analizlerle organizmanın doğrudan tespiti ile gerçekleşir (Kasten et al., 1997). *Avibacterium gallinarum* ve *Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica*, hasta kanatlı hayvanlardan izole edilebilen ve yanlışlıkla *P. multocida* olarak tanımlanabilen yakın ilişkili bakterilerdir (Heddleston, 1975). Ayrıca, *Avibacterium gallinarum* ve *P. multocida* arasında antijenik yakınlık bulunmaktadır.

P. multocida perakut/akut kanatlı kolerasından ölen hayvanların iç organlarından ve çoğunlukla kronik vakaların süpüratif lezyonlarından ve karakteristik kazeöz eksudatından kolaylıkla izole edilebilir. Bununla beraber akut salgında hayatta kalmış olan dehidre ve zayıflamış hayvanlardan izolasyon olasılığı daha azdır (OIE, 1996). Akut tavuk kolerasında doku ya da eksudattan Wright, Giemsa veya metilen mavisi ile boyama yapılarak bipolar organizmanın görülmesiyle ve/veya immunfloresan mikroskopik inceleme ile *P. multocida* için ön tanı konulabilir (OIE, 1996; Rimler and Glisson, 1997).

Kemik iliği, kalp kanı, karaciğer, meninksler veya lokal lezyonlar kültür için tercih edilmesi gereken marazi maddelerdir. *P. multocida* izolasyonu için doku ya da eksudat kullanılabilir. Örnekler %5 tavuk serumu içeren Dekstroz Nişasta Agar'a veya selektif agarlara ekilir. İzolasyon şansı %5 ısıyla inaktive edilmiş serumun eklenmesiyle arttırılabilir. Eş zamanlı olarak MacConkey ve Kanlı Agar'a da ekim yapılabilir. Besiyerleri 37°C'de 18-24 saat aerobik koşullarda inkübe edilir.

İnkübasyon süresi sonrasında üreyen kolonilerin çapı 1 ila 3 mm arasında değişir ve ayrık, dairesel, dışbükey, yarı saydam ve bütiriktir. Hücreler kokobasil veya kısa çomaklar şeklinde ve $0,2-0,4 \times 0,6-2,5$ µm boyutunda olup, Gram negatif boyanır. Boyamalarda bakteri genellikle tek veya çift halinde görülür. Kapsüllü organizmalar genellikle kapsülsüz organizmalardan daha büyük koloniler üretir. Memeli solunum yolu izolatlarında sıklıkla gözlenen sulu mukoid koloniler, kanatlı izolatlarında çok nadir görülür.

İnkübasyon periyodu sonrasında üreyen bakterilere şeker fermentasyon testleri yapılır ve *P. multocida*'nın tanımlanması geleneksel olarak karbonhidrat fermentasyonu, enzim üretimi ve seçilen metabolit üretimini içeren biyokimyasal testlerin sonuçlarına dayanmaktadır.

Glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve sakkaroz *P. multocida* tarafından fermente edilebilen karbonhidratlar arasında yer alırken, ramnoz, selobiyoz, rafinoz, inülin, eritritol, adonitol, m-inositol ve salisin fermente olmayan karbonhidratlardır. Mannitol genellikle fermente edilirken, arabinoz, maltoz, laktoz ve dekstrin genellikle fermente edilmez. Ksiloz, trehaloz, gliserol ve sorbitol ile değişken reaksiyonlar meydana gelebilir.

P. multocida kanatlı izolatları koyun Kanlı Agar'da hemolize neden olmaz, hareketli değildir ve MacConkey agarda nadiren ürer. Organizma katalaz, oksidaz ve ornitin dekarboksilaz üretir ancak üreaz, lizin dekarboksilaz, β-galaktosidaz veya arginin dihidrolaz üretmez. Fosfataz üretimi değişkendir. Nitrat indirgenir, indol ve hidrojen sülfid üretilir, metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri negatiftir (Glisson et al., 2008; Glisson et al., 2013).

P. multocida'nın yakın ilişkili olduğu diğer bakterilerden ayırt edici özellikleri Tablo 2.1'de ve *P. multocida*'nın alt türlerinin diferansiyasyonu için kullanılan özellikler Tablo 2.2'de gösterilmiştir (Bisgaard, 1993).

Hayvan inokulasyonları, kontamine materyallerden *P. multocida* izolasyonuna yardımcı olarak kullanılabilir. Tavşanlara, hamsterlere ya da farelere 0.2 ml eksudatın

ya da parçalanmış dokunun subkutan veya intraperitoneal yolla inokule edilmesi sonrasında eğer *P. multocida* varlığı söz konusu ise hayvan genellikle 24-48 saat içerisinde ölür ve organizma kalpten, kandan veya karaciğerden saf olarak izole edilebilir (Rimler and Glisson, 1997).

Spesifik antikorların varlığına yönelik serolojik testler TK'nın teşhisi için kullanılmamasına karşın aşılanmış kümes hayvanlarında bağışıklığı test etmek için aglütinasyon, agar jel difüzyon testi veya ELISA kullanılabilir (OIE, 1996).

Tablo 2.1. *P. multocida*'nın yakın ilişkili olduğu diğer bakterilerden ayırt edici özellikleri

Karakteristik	<i>P. multocida</i>	<i>P. gallinarum</i>	<i>P. avium</i>	<i>A. paragallinarum</i>	<i>O. rhinotracheale</i>	<i>R. anatipestifer</i>
Nitrat (indirgeme)	+	+	+	+	-	-
Urease	-	-	-	-	+	D
Arginin dihidrolaz	-	-	-	-	-	(+)
Ornitin dekarboksilaz	+	-	-	-	-	-
İndol	+	-	-	-	-	-
D(+) ksiloz	+	D	D	D	-	-
D(-) mannital	+	-	-	+	-	-
D(-) sorbitol	D*	-	-	+	-	-
D(+) galaktoz	+	+	+	-	(+)	-
Maltoz	-	+	-	D	(+)	-
Trehaloz	D*	+	+	-	-	-
Dekstrin	-	+	-	-	(+)	-
a-galartosidaz	-	-	-	-	+	+
a-glukozidaz	D*	+	+	D	+	+

+ : 1-2 gün içinde suşların %90'ından fazlası pozitif; -: Suşların >%90'ı negatif; (+) : 3-14 gün içinde suşların %90'ından fazlası pozitif; D: farklı; *: *P. multocida*'nın alt türlerinin ayrılmasında kullanılan karakter

Tablo 2.2. *Pasteurella multocida*'nın alt türlerinin tanımlanmasında kullanılan özellikler

Özellikler	<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>
L(+) arabinoz	D	-	+
D(-) arabinoz	D	D	-
Dulcitol	-	-	+
D(-) sorbitol	+	-	+
R(-) frukoz	D	D	-
Trehaloz	D	+	-
alfa-glukozidaz	+	+	-

+ : 1-2 gün içinde suşların %90'ından fazlası pozitif; -: Suşların >%90'ı negatif; D: farklı

Aglütinasyon, Agar Jel İmmunodifüzyon (AGID) ve pasif hemagglütinasyon gibi serolojik testler, kanatlı konakçılardan alınan serumda *P. multocida*'ya karşı antikor göstermek için deneysel olarak kullanılmış olup hiç birinin çok hassas olmadığı tespit edilmiştir. ELISA kullanılarak antikor titrelerinin belirlenmesi, aşılanmış kümes hayvanlarında serokonversiyonun izlenmesi girişimlerinde değişen derecelerde başarı ile kullanılmış ancak teşhis için kullanılmamaktadır.

Teşhis için matris destekli adsorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi (MALDI-TOF) kütle spektrometresinin kullanımı bugüne kadar sadece iki çalışmada değerlendirilmiş olup her iki çalışma da teknolojinin test edilen tüm *P. multocida* izolatlarını doğru şekilde tanımladığını göstermektedir (Kuhnert et al., 2012; Zangenah et al., 2013). Teşhis için PCR bazlı analizler yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.7. Koruma ve Kontrol

Tavuk kolerasının önlenmesi *P. multocida* rezervuarlarının ortadan kaldırılmasıyla veya bunların kanatlı sürülerine temasının engellenmesiyle sağlanabilir. İyi yönetim uygulamaları ile sanitasyonun üzerinde önemle durulması, tavuk kolerasını önlemenin en iyi yoludur. Birçok bakteriyel hastalığın aksine, tavuk kolerası kuluçkahane hastalığı değildir.

Dünya genelinde kanatlı kolerasının kontrolü temel olarak aşılamaya bağlıdır. Kapsamlı yönetim sistemleri dünyanın birçok yerinde hakim olmasına karşın yaban hayatı rezervuarı *P. multocida* enfeksiyonlarının kontrolünü neredeyse imkansız hale getirmektedir. Hayvan refahına ilişkin kaygılar sanayileşmiş dünyada kapalı olmayan üretim çiftliklerinin kullanımını arttırmış, bu da enfeksiyonların ticari sürülere bulaşma riskinin artmasına neden olmuştur. Hastalığı önlemek amacıyla birçok canlı ve inaktif (bakterinler) kanatlı kolera aşısı geliştirilmiş ve test edilmiştir (Rimler and Glisson, 1997). Aşılama stratejileri TK'nın yaygın olduğu yerlerde düşünülmelidir. Ticari olarak inaktif bakterinler ve canlı aşılar mevcuttur. Bakterinler yağ adjuvant içerisinde emülsifiye olarak genellikle 1, 3, 4 serotiplerinden oluşurlar. Bakterin, içerisinde olmayan bir serotiple oluşturulan TK eprüvasyonuna karşı koruma sağlamayacağı için 1, 3, 4 serotipleri dışında lokal olarak izole edilen suşu içeren otojenik bir tam hücre bakterini kullanılabilir (Heddleston, 1962). Otojenik aşı için adjuvant seçimi, yağ içinde su emülsiyonu veya alüminyum hidroksit şeklinde olabilir (Bhasin and Biberstein, 1967). Otojenik bakterinlerde alüminyum hidroksitin adjuvant olarak kullanılması damızlık hindiler ve damızlık broyler sürülerinde aşılama için faydalıdır. Bu hayvanlar yattıkları için yağ-su emülsiyonunun adjuvant olarak kullanılması halinde hayvanlarda ciddi doku yanıtları oluşmaktadır. Bu yanıt yumurta üretiminde önemli ölçüde düşüşle sonuçlanabilir. Yumurta üretimindeki negatif etki, alüminyum hidroksitin adjuvant olarak kullanıldığı tavuk kolerası tüm hücre bakterinlerinde daha düşüktür. Bununla

beraber, alüminyum hidroksit bakterinlerinin yağ-su emülsiyonu bakterinler kadar immun yanıtı stimüle etmediği rapor edilmiştir (Matsumoto and Helfer, 1977). Bu nedenle, eğer alüminyum hidroksitli bakterin kullanılırsa, sürüde bağışıklığı sağlamak için yumurtlama siklusunun başlangıcında tekrar aşılama gerekebilir.

Modifiye canlı aşı suşlarının patojenik fenotipleri bağışıklığı baskılanmış hayvanlarda hastalığa neden olma eğilimleri nedeniyle ticari aşılarda çoğu bakterin tipindedir. Aşılar normalde *in vitro* olarak geliştirilmiş, bir yağ adjuvantı veya alüminyum hidroksit içinde emülsifiye edilmiş *P. multocida*'nın A:1, A:3 ve A:4 serotiplerini içerir (Homchampa, 1995). Bakterinlerin üretilmesi ucuzdur ve bir dereceye kadar koruma sağlayarak hastalığın insidansını ve şiddetini sınırlandırır (Scott et al., 1999). Bakterinlerin enjeksiyon yoluyla uygulanmasına bağlı olarak doku reaksiyonlarına yol açması (Davis, 1987) ve sadece homolog serotiplere karşı bağışıklık sağlaması önemli dezavantajları arasındadır (Rebers and Heddleston, 1977). Sonuç olarak, daha az zahmetli bir uygulama yolunun kullanılması ve çapraz bağışıklık elde edilmesine yönelik canlı aşılarda geliştirilmesi gerekmektedir. Şu anda özellikle Kuzey Amerika'da her ikisi de A:3,4 serotipine sahip olan Clemson University suşu ve M-9 suşu kullanılmaktadır. Her iki suş da kanatlı kolera salgınlarından izole edilmiş ve çeşitli girişimlerle modifiye edilmiştir. Her iki suşun da 42°C'de üreyemeyen sıcaklığa duyarlı mutantları oluşturulmuştur. Bu mutantlarla her ne kadar koruma sağlanmış olsa da yine de bir miktar ölüm gözlenmiştir (Hofacre et al., 1989). Son zamanlarda, *aro-A* genini mutasyona uğratarak *P. multocida*'nın geri dönüşümsüz oksotrofik mutantlarının yaratılmasına ve düşük üreme oranına sahip klonların seçilmesine önem verilmiştir. Bu suşlardan bazılarıyla yapılan ön aşılama denemelerinde ümit verici sonuçlar elde edilmiştir.

İngiltere'de kullanımda olan 3 canlı aşı; düşük virülensli CU suşu, çok düşük virülensli mutant bir CU suşu olan M-9 suşu ve virülensli CU ile M-9 arasında olan orta virülensli PM-I suşlarından hazırlanmıştır. Canlı *P. multocida* aşılılarıyla tavukların ve hindilerin aşılama, heterolog serotip epruvasyonuna karşı korunmayı indükler. Canlı tavuk kolerası aşılama kullanılması etkin immun yanıtı stimüle eder fakat aşılama tavuklarda potansiyel olarak mortaliteyle sonuçlanma riski vardır (Bierer and Derieux, 1972).

TK için en uygun aşılama programı düşünüldüğünde bölgedeki kolera prevalansı, bölgede en sık görülen *P. multocida* serotipi, aşılama tavukların yaşı ve değeri (damızlık hindiler, ticari hindiler veya damızlık tavuklar, grandparent

damızlık tavuklar) göz önüne alınmalıdır. Tavuk kolerasına karşı damızlık tavuklar için birçok başarılı aşı vardır. Bakterinler, canlı aşılar veya her ikisi birlikte kullanılabilir ve genellikle 2 doz şeklinde; ilk doz 8-10 haftalıkken, ikinci doz 18-20 haftalıkken uygulanır. Koruma sadece bakterinin içerdiği serotipe karşı şekillenir ve yumurtlama siklusunun başlangıcında güçlü bir bağışıklık sağlanmaz. Çok yaygın olarak kullanılan aşılama programlarının bazıları 10-12 haftalıkken kanat altından yapılan canlı aşı uygulamasını takip eden 18-20 haftalıkken kanata yapılan canlı aşı veya bakterin uygulaması şeklindedir. Canlı aşı ile aşılama birçok serotipe karşı koruma sağlar fakat aşı kronik tavuk kolerasına yol açabilir. 10-12 haftalıkken bakterin kullanılması ve 18-20 haftalıkken de canlı aşı kullanılması birçok serotipe karşı koruma sağlar ve canlı aşının indüklediği kronik tavuk kolerasını da minimize eder (Hofacre et al., 1986).

Damızlık hindiler ve ticari etçi hindiler için en başarılı aşılama programlarından biri, 6-8 hafta sonrası her 4 haftada bir içme suyuyla canlı aşı verilmesi ve sürünün ömrü boyunca uygulamaya devam edilmesi şeklindedir. Bakterinler de damızlık hindilerde kullanılabilir. Bu hayvanlara yumurta üretiminin başlamasından önce 2-5 kez aşılama yapılır ve ilk aşılama 6-8 haftalıkken başlar.

2.8. Halk Sağlığı Etkileri

İnsanlarda zoonotik bir organizma olarak kabul edilen ve ağırlıklı olarak çiftçi nüfusu arasında ortaya çıktığı gözlenen *P. multocida*'nın neden olduğu hastalık sayısı hiç de azımsanmayacak düzeydedir (Bisgaard et al., 1994). Kanatlı hayvanlardan insana ya da tam tersi şekilde doğrudan bulaştığına dair herhangi bir rapor bulunmamakta olup, bu tür bulaşmanın olasılığı da göz ardı edilmemelidir. Etken çoğunlukla köpekler, kediler (büyük kediler dahil) ve nadir de olsa domuzların neden olduğu hayvan ısırıklarını veya tırmalamalarını takiben oluşan yaygın bir enfeksiyondan sorumludur (August, 1990; Frederiksen, 1993). Osteomiyelite ve ardından septisemiye kadar ilerleyebilen ciddi bir selülit gelişebilir (Francis et al., 1975). *P. multocida*, primer veya sekonder enfeksiyöz ajan olarak solunum yolu enfeksiyonlarında da yer alabilir (Weber et al., 1984). *P. multocida*'nın özellikle karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastaların eklemlerine ve solunum yollarına yerleşerek sepsise neden olan bir bakteriyemiye sebebiyet verdiği bilinmektedir. Bu başlıca enfeksiyon türlerine ek olarak *P. multocida*, peritonit, puerperal sepsis, neonatal sepsis, beyin apseleri ve idrar yolu enfeksiyonları gibi çeşitli

enfeksiyonlardan izole edilmiştir (Bisgaard et al., 1994). Bildirilen hastalıklarla ilgili olarak *P. multocida*'nın farklı alt türlerinin önemi henüz açıklığa kavuşturulmamıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bakteriyolojik Örnekleme ve İdentifikasyon

Tez çalışması kapsamında Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne bağlı Amasya, Giresun, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Sivas, Tokat ve Trabzon illerinden Tavuk Kolerası yönünden teşhis amacıyla Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilmiş olan tavuklara ait akciğerlerden izole edilmiş olan *P. multocida* şüpheli 50 adet bakteri identifikasyon ve karakterizasyon için kullanıldı.

P. multocida şüpheli bakteriler ticari olarak temin edilen *Pasteurella* Selektif Agar'a inokulasyon ile canlandırıldı. Besi yerleri 24 saat 37°C'de inkübe edildi (Catry et al., 2006). İnkübasyon süresi sonunda agarda üreyen leylak renkli kolonilerden bir adet alınarak, Gram boyama ve oksidaz testi yapıldı. Gram negatif çomak şeklinde görülen ve oksidaz pozitif bakteriler *P. multocida* şüpheli olarak değerlendirildi. İnkübasyon sonrası üreyen ve şüpheli olarak değerlendirilen izolatların subkültürleri Brain Heart İnfüzyon (BHI) agara yapıldı. Subkültürü yapılan izolatlar çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılması amacıyla % 15 gliserol içeren TSB içerisinde -80°C'de saklandı.

P. multocida genotipik identifikasyonu için BHI agarda üretilen taze kültürlerden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Şüpheli izolatların DNA ekstraksiyonları kaynatma yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla şüpheli izolatlara ait kolonilerden 500 µl steril distile su içerisine süspansiyon hazırlanarak, 100°C'de 10 dk kaynatıldı. Süspansiyon 10 000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant hedef DNA olarak kullanılmak üzere DNaz/RNaz içermeyen tüplere alındı. DNA'lar genotipik identifikasyonda ve virülens genlerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

P. multocida izolatlarının genotipik identifikasyonları Liu vd. (2004) tarafından bildirilen protokol ile gerçekleştirildi. Bildirilen protokol doğrultusunda 5 µl hedef DNA, 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM PM1231 primerleri, 500 µM her bir dNTP, 0,5 U *Taq* polimeraz ilave edilerek toplam 25 µl PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 2 dk ön denatürasyon, 30 siklus olmak üzere 95°C'de 20 sn, 55 °C'de 20 sn, 72 °C'de 45 sn amplifikasyon ve 72 °C'de 2 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidyum bromid (2 µg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile

görüntülendi. PCR sonrasında 601 bp'lik bant görülmesi *P. multocida* için pozitif olarak kabul edildi.

Genotipik identifikasyon için kullanılan *P. multocida* spesifik oligonükleotit primerler ve beklenen ampikon boyutu Tablo 3.1'de sunuldu.

Tablo 3.1. İzolatların PCR ile identifikasyonu için kullanılan oligonükleotit primerler

Bakteri	Hedef Gen	Primer	Ampikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>P. multocida</i>	PM1231	F: 5'-AGAAAGCACATGACCAAAGG-3' R: 5'-GCAGCTACTCGCAGAAGGTT-3'	601	Liu et al. (2004)

3.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Antibiyotiplendirme

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları ve çoklu antibiyotik direnci Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla 9 antibiyotik sınıftan toplam 14 antibiyotik (Beta-Laktamlar: Ampisilin-10 µg; Penisilin G -10 µg; Florokinolon grubu: Enrofloksasin-5 µg; Makrolid grubu: Eritromisin-15 µg; Fenikol grubu: Florfenikol-30 µg; Linkosamidler: Linkomisin-2 µg; Tetrasiklin grubu: Oksitetrasiklin-30 µg; Tetrasiklin-30 µg; Aminoglikozidler: Neomisin-30 µg; Spektinomisin-100 µg; Folat yolu inhibitörleri: Sulfametoksazole/trimetoprim- 1.25–23.75µg; Sefalosporinler: Sefoperazon-30 µg; Sefotaksim-30 µg; Seftiofur-30 µg) kullanıldı.

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için taze kültürlerinden yoğunluğu 0,5 McFarland olacak şekilde Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) içerisinde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan 100 µl alınarak Mueller Hinton Agar (MHA) yüzeyine yayma ekim yapıldı. Besi yeri üzerine antibiyotik diskleri yerleştirildi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan zon çapları ölçülerek CLSI (2019)'ya göre değerlendirildi.

İzolatlardan üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına dirençli olanları çoklu antibiyotik direncine (ÇİD) sahip izolat olarak değerlendirildi.

İzolatların antibiyotik duyarlılık/dirençlilik durumlarının belirlenmesinden sonra ilgili antibiyotiklere direnç durumu göz önüne alınarak fenotipik yakınlıkları belirlendi. Oluşan paternlerin dendrogramı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile görüntü analiz programı kullanılarak çizildi. İzolatlar arasındaki ilişki % 70 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak değerlendirildi.

3.3. Biyofilm Üretiminin *in vitro* Olarak Belirlenmesi

P. multocida izolatlarının biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak Kongo Red Agar (CRA) yöntemi ile araştırıldı. CRA yöntemi için 500 mL distile su içerisinde 5 g Agar agar, 25 g glikoz, 18,5 g BHI broth, 0,4 g Kongo red boyası olacak şekilde besi yeri hazırlandı. BHI’da saf olarak üreyen kolonilerden tek koloni alınarak, CRA’ya ekimleri yapıldı. Besi yerleri 37°C’de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kolonilerde oluşan renk değişimlerine göre değerlendirilme yapıldı. Siyah-gri renk oluşumu görülen izolatlar biyofilm üretimi yönünden pozitif, pembe-kırmızı renkli koloniler ise negatif olarak değerlendirildi (Atshan et al., 2012).

3.4. *P. multocida* İzolatlarının Kapsüler Tiplendirmesi

P. multocida suşlarının kapsüler olarak multipleks PCR ile tiplendirildi (Townsend et al., 2001). PCR’da hedeflenen spesifik genler ve beklenen ampikon boyutları Tablo 3.2’de sunuldu.

P. multocida izolatlarının kapsül tiplendirmesi için literatürde bildirilen protokolün optimizasyonu gerçekleştirildi. Optimizasyon için PCR’da kullanılan reaktiflerin ve amplifikasyon protokolünün farklı oran ve siklusları denendi. Amplifikasyon ürünleri etidyum bromid (2µg/ml) içeren % 1,5’luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

Görüntüleme sonrasında Serogrup A, Serogrup B, Serogrup D, Serogrup E ve Serogrup F için sırasıyla 1044, 760, 657, 511 ve 851 bp.’lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 3.2. *P. multocida* izolatların kapsül tiplendirmesi için kullanılan oligonükleotit primerler

Gen	Serogrup	Primer	Ampikon Büyüküğü (bp)	Kaynak
<i>hyaD</i> <i>-hyaC</i>	Serogrup A	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG R: TTGCCATCATTGTCAGTG	1044	Townsend et al. (2001)
<i>bcbD</i>	Serogrup B	F: CATTATCCAAGCTCCACC R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	760	
<i>dcbF</i>	Serogrup D	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657	
<i>ecbJ</i>	Serogrup E	F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTG	511	
<i>fc bD</i>	Serogrup F	F: AATCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851	

3.5. İzolatların Virülens Genlerinin Belirlenmesi

P. multocida nedenli enfeksiyonların patogenezinde rol oynayan bazı virülens genleri PCR ile araştırıldı.

P. multocida'ya ait çalışmada araştırılan virülens genleri ve beklenen ampikon boyutları Tablo 3.3'de gösterildi.

Tablo 3.3. *P. multocida* izolatlarında araştırılan virülens genleri

Gen	Primer	Ampikon Büyükliği (bp)	Kaynak
<i>fimA</i>	F: CCATCGGATCTAAACGACCTA R: AGTATTAGTTCCTGCGGGTG	866	Tang vd. (2009)
<i>fur</i>	F: GTTTACCGTGTATTAGACCA R: CATTACTACATTGCGCATAC	244	
<i>plpB</i>	F: TTTGGTGGTGCGTATGTCTTCT R: AGTCACTTTAGATTGTGCGTAG	282	
<i>pmHAS</i>	F: TCAATGTTTGCGATAGTCCGTTAG R: TGGCGAATGATCGGTGATAGA	430	
<i>sodA</i>	F: TACCAGAATTAGGCTATGC R: GAAACGGGTTGCTGCCGCT	365	

P. multocida izolatlarının sahip oldukları virülens genlerinin belirlenmesi amacıyla 5 gen için multipleks PCR protokolü oluşturuldu. Protokol *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB* ve *fimA* (Tang et al., 2009); genleri için optimize edildi. Optimizasyon kapsamında ilgili literatürde bildirilen yöntem temel alınarak, PCR reaktiflerinin ve amplifikasyon protokolünün farklı oran ve siklusları denendi. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında *fimA*, *fur*, *plpB*, *pmHAS* ve *sodA* genleri için sırasıyla 866, 244, 282, 430 ve 365 bp'lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

3.6. İzolatların Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

P. multocida izolatlarının antibiyotik direncinde rol oynayan bazı genler PCR ile araştırıldı. *P. multocida* izolatlarının sahip oldukları *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi için multipleks PCR protokolü optimize edildi (Bedier et al., 2022). Optimizasyon kapsamında ilgili literatürde bildirilen yöntemler temel alınarak, PCR reaktiflerinin ve amplifikasyon protokolünün farklı oran ve siklusları denendi. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* genleri için sırasıyla 1076, 685, 489, 433 ve 425 bp'lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

P. multocida'ya ait çalışmada araştırılan antibiyotik direnç genleri ve beklenen ampikon boyutları Tablo 3.4'te gösterildi.

Tablo 3.4. *P. multocida* izolatlarında araştırılan antibiyotik direnç genleri

Direnç Geni	Primer	Ampikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>tetH</i>	F: 5'-ATACTGCTGATCACCGT-3' R: 5'-TCCCAATAAGCGACGCT-3'	1076	Bedier vd. (2022)
<i>bla</i>	F: 5'-AATAACCCTTGCCCAATTC-3' R: 5'-TCGCTTATCAGGTGTGCTTG-3'	685	
<i>aphA1</i>	F: 5'-TTATGCCTCTTCCGACCATC-3' R: 5'-GAGAAACTCACCGAGGCAG-3'	489	
<i>sul1</i>	F: 5'-CGGCGTGGGCTACCTGAACG-3' R: 5'-GCCGATCGCGTGAAGTTCCTG-3'	433	
<i>dfrA</i>	F: 5'-TGGTAGCTATATCGAAGAATGGAGT-3' R: 5'-TATGTTAGAGGCGAAGTCTTGGGTA-3'	425	

3.7. Genotiplendirme

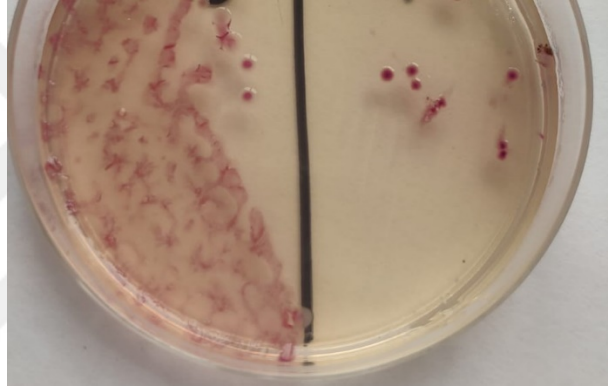
P. multocida izolatlarının RAPD-PCR paternlerinin belirlenmesi amacıyla M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') primeri kullanıldı. Amplifikasyon aşaması Versalovic et al. (1991) tarafından bildirilen metot ile gerçekleştirildi. PCR için 1X PCR Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP, 2,5 U *Taq* DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl'lik bir RAPD master karışımı oluşturuldu. Karışım 94 °C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 40 °C'de 1 dk bağlanma, 72 °C'de 3 dk uzama olmak üzere 40 siklus ve 72 °C'de 7 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidyum bromid (2 µg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Oluşan RAPD paternlerinin dendrogramları, UPGMA metodu ile dendrogram ve görüntü analiz programı kullanılarak çizildi.

P. multocida izolatlarının filogenetik yakınlıkları % 70 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak değerlendirildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

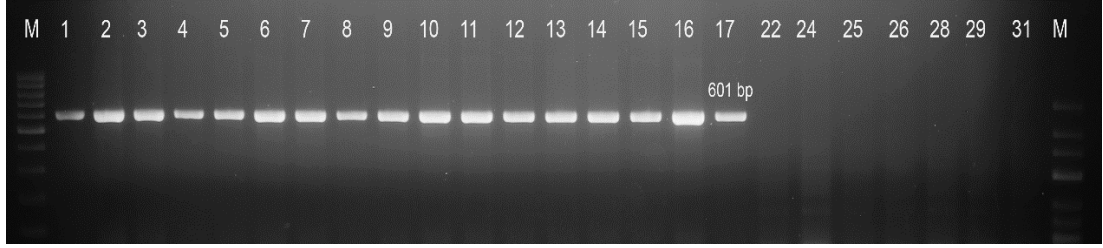
4.1. Bakteriyolojik Örnekleme ve İdentifikasyon

Tez çalışması kapsamında Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne bağlı Amasya, Giresun, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Sivas, Tokat ve Trabzon illerinden Tavuk Kolerası yönünden teşhis amacıyla Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilmiş olan tavuklara ait akciğerlerden izole edilmiş olan *P. multocida* şüpheli 50 adet bakterinin 24 adeti *Pasteurella* selektif besi yerinde leylak renkli bakteri kolonisi oluşturdu (Şekil 4.1). Gram boyama ve oksidaz testi sonucunda 24 bakterinin Gram negatif çomak şeklinde ve oksidaz pozitif olduğu belirlendi ve *P. multocida* şüpheli olarak değerlendirildi.



Şekil 4.1. *Pasteurella* selektif besi yerinde *P. multocida* kolonisi

P. multocida izolatlarının genotipik identifikasyonları Liu et al. (2004) tarafından bildirilen protokol doğrultusunda PCR gerçekleştirildi. Bildirilen protokol doğrultusunda 5 µl hedef DNA, 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM PM1231 primerleri, 500 µM her bir dNTP, 0,5 U *Taq* polimeraz ilave edilerek toplam 25 µl PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 2 dk ön denatürasyon, 30 siklus olmak üzere 95°C'de 20 sn, 55 °C'de 20 sn, 72 °C'de 45 sn amplifikasyon ve 72 °C'de 2 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. PCR protokülü sonrasında 601 bp'lik bant görülmesi *P. multocida* için pozitif olarak kabul edildi. PCR sonucunda, 50 adet izolatın 24 adeti 601 bp'lik bant oluşturdu ve *P. multocida* olarak identifiye edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *P. multocida* tür spesifik PCR sonucu. M: marker; 1-17: *P. multocida* pozitif izolatlardan; 22, 24, 25, 26, 28, 29, 31: *P. multocida* negatif izolatlardan

Mısır'da yapılan bir çalışmada tavuk, ördek, bıldırcın ve hindilerden 317 numune toplanmış ve 30 örnekte (% 9,4) *P. multocida* izole edilmiştir (El-Demerdash et al., 2023). Oniki farklı kümes hayvanı çiftliğinden (4 piliç ve 8 yumurtacı) toplam 135 hasta ve ölü tavuk (47 piliç ve 88 yumurtacı) üzerinde yapılan çalışmada 47 piliçten 2'sine (% 4,25) ve 88 yumurtacı tavuğun 11'ine (% 12,50) tavuk kolerası tanısı konulmuştur (Hasan et al., 2010). Kenya'da yapılan bir çalışmada 162 tavuk ve 54 ördekten orofaringeal ve kloakal sürüntü örnekleri alınmış ve *P. multocida* açısından taranmıştır. Örneklenen 162 tavuğun 10'undan (% 6,2) ve 54 ördeğin 14'ünden (% 25,9) olmak üzere 24 örnekten *P. multocida* izole edilmiştir. İzolasyon 17 orofarinks sürüntüsünden ve 7 kloakal örnekten gerçekleştirilmiştir (Mbuthia et al., 2011). Yukarı Mısır'ın farklı bölgelerinde 275 köy tavuğu arasında *P. multocida* suşlarının prevalansı araştırılmış ve örnekleme yapılan 275 tavuktan 21'inde (% 7,6) *P. multocida* izolatu elde edilmiştir (Mohamed et al., 2012). Ghaly vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada Temmuz 2013 - Kasım 2016 arasındaki dönemde 16 tavuk sürüsü ve 6 ördek sürüsü kümesinde tavuk kolerası varlığı açısından araştırma yapılmıştır. Toplam 81 yeni ölü kuş (51 tavuk ve 30 ördek) incelenmiştir. Bu çalışmada 22 tavuk (% 43,1) ve 16 ördekten (% 53,3) *P. multocida* izole edilmiştir. Çin'de yapılan bir çalışmada ördek ve kazlarda görülen 172 klinik solunum yolu hastalığı vakasından toplam 23 (% 13,4) *P. multocida* izolatu elde edilmiştir (Zhangcheng et al., 2018). Ağustos 2007 ile Mart 2008 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada İngiltere'nin kuzeyindeki açık hava domuz ünitesinde bulunan kargagillerdeki olası hastalık ve ölüm nedenleri araştırılmıştır. Klinik solunum yolu hastalığı belirtileri gösteren canlı yakalanmış 5 karga, solunum yolu hastalığı olmayan canlı yakalanmış 1 karga ve ölü olarak teslim edilen 12 karga incelenmiştir. Ölü ve canlı toplamda 18 kargadan alınan örneklerin 10'undaki akciğer lezyonlarından *P. multocida* izole edilmiştir (Strugnell et al., 2011).

Brezilya'da her biri 90 kuştan oluşan sekiz farklı kümes hayvanı grubu oluşturulmuş ve *P. multocida*'nın varlığını belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Bu amaçla Grup I'den IV'e kadar olan grupları tavuklar ve Grup V'den VIII'e kadar olan grupları japon bildiricınlar oluşturmuştur (Grup I: >6 haftalık ve solunum yolu hastalığı öyküsü olan tavuklar; Grup II: >6 haftalık ve solunum yolu hastalığı olmayan tavuklar; Grup III: < 6 haftalık, solunum yolu hastalığı olan tavuklar; Grup IV: < 6 haftalık olan tavuklar; Grup V: > 6 haftalık ve solunum yolu hastalığı öyküsü olan japon bildiricınları; Grup VI: > 6 haftalık ve solunum yolu hastalığı olmayan japon bildiricınları; Grup VII: < 6 haftalık, solunum yolu hastalığı olan japon bildiricınları; Grup VIII: < 6 haftalık olan japon bildiricınları). Gruplardan *P. multocida* izolasyon oranları Grup I: 56/90 (% 62,3), Grup II: 18 /90 (% 20,0), Grup III: 12/90 (% 13,3), Grup IV: 3/90 (% 3,33), Grup V: 8/90 (% 8,88), Grup VI: 2/90 (% 2,22), Grup VII: 2/ 90 (% 2,22) ve Grup VIII: 1/90 (% 1,11) olarak tespit edilmiştir. Bu izolasyon oranları, kuş türü grupları arasında önemli ölçüde farklılık göstermemiştir fakat genel tavuk izolasyon oranı bildiricın izolasyon oranından önemli ölçüde daha yüksek tespit edilmiştir (Rigobelo et al., 2013).

Mısır'da yaşları 2-20 hafta arasında değişen ve solunum belirtileri geçmişi olan toplam 112 yeni ölü ördek, *Pasteurellaceae* familyası üyelerinin varlığı açısından araştırılmıştır. Geleneksel bakteriyolojik izolasyon ve biyokimyasal karakterizasyon ile incelenen kuşların 16/112'sinde enfeksiyonun % 14,3 prevalans oranıyla ortaya çıktığı tespit edilmiştir. İzole edilen bakterilerin 2/16'sının (% 12,5) *P. multocida* olduğu bildirilmiştir (Eid et al., 2019). Özdemir ve Erer (2008) tarafından yapılan çalışmada 33 kümeden toplam 192 hayvanın burun, infraorbital sinuslar, larinks, trake, akciğer ve hava keseleri mikroskopik olarak incelenmiştir. Yapılan klinik, makroskopik, mikroskopik, immunoperoksidaz testi ve mikrobiyolojik incelemeler sonucunda 33 kümesin 3'ünde (% 9.1) tavuk kolerası tespit edilmiştir. Çin'de Ocak 2016'dan Ağustos 2017'ye kadar olan dönemde farklı çiftliklerden hastalıklı ördek, kaz ve tavuğa ait 283 akciğer örneği alınmıştır. Kanatlı hayvanlarda klinik hastalıklarla ilişkilendirilen 45 *P. multocida* (% 15,9) izolatu biyokimyasal ve moleküler-biyolojik yöntemlerle karakterize edilmiştir (Li et al., 2018a). Bangladeş'te Ağustos-Kasım 2017 tarihleri arasında 6 ticari yumurtacı çiftlikten 36 canlı ve 21 ölü yumurta tavuğu dâhil olmak üzere ani ölüm, saz ve ibiklerin şişmesi, topallık, solunum ralleri ve ishal gibi klinik belirti ve semptomlarının görüldüğü toplam 57 hayvandan örnekleme yapılmıştır. İzolasyon ve *kmt1*genini hedef alanı

PCR ile 22 izolatın (% 38,6) *P. multocida* olduğu tespit edilmiştir (Saha et al., 2021). Mısır'da farklı çiftliklerden yaşları 3 ile 14 hafta arasında değişen toplam 220 kanatlı hayvan toplanmış ve tavuk kolerası açısından araştırılmıştır. Tavuklardan (15/145, % 10,3) ve ördeklerden (5/75, % 6,7) 20 *P. multocida* izole edilmiş ve enfeksiyonun yaş ve cins ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shalaby et al., 2021). Elalamy vd. (2020)'nin yaptığı çalışmada, görünüşte sağlıklı ve hastalıklı tavuklarda *P. multocida*'nın prevalansı belirlenmiştir. *P. multocida* 'nın izolasyonu için 10 yumurtacı tavuk ve ticari piliç sürülerinden 200 hastalıklı ve 100 görünüşte sağlıklı tavuktan akciğer, trakea, kemik iliği ve dalak örnekleri toplanmıştır. Fenotipik karakterizasyona dayanarak incelenen tavuklardan 24 *P. multocida* izolatı (% 8) tanımlanmıştır. İzolatların 20'si hastalıklı tavuklardan (12'si yumurtacılar ve 8'i piliçlerden) %10'luk bir prevalans oranıyla elde edilmiştir. Sağlıklı görünen tavuklardan 4 izolat (%5,7) tespit edilirken, sağlıklı görünen piliçlerden hiçbir izolat elde edilmemiştir.

İncelenen literatür bulgularına göre *P. multocida* prevalansı %4,25-43,1 arasında değişkenlik göstermekte olup, prevalans ortalaması %14,86 olarak hesaplanmıştır. Tez çalışması kapsamında Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne bağlı Amasya, Giresun, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Sivas, Tokat ve Trabzon illerinden Tavuk Kolerası yönünden teşhis amacıyla Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilmiş olan tavuklara ait akciğerlerden izole edilmiş olan *P. multocida* şüpheli 50 adet bakteri identifikasyon ve karakterizasyon için kullanıldı. Tez çalışmasında prevalans belirlenme hedefi bulunmamakla beraber *P. multocida* şüpheli 50 bakteriden 24 adeti *P. multocida* olarak belirlenmiştir.

4.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Antibiyotiplendirme

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları ve çoklu antibiyotik direnci Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile 9 antibiyotik sınıfından 14 antibiyotik için belirlendi. İncelenen 24 adet izolatın 16 (%66,7), 24 (%100), 8 (%33,3), 18 (%75,0), 9 (%37,5), 22 (%91,7), 19 (%79,1), 11 (%45,8), 9 (%37,5), 16 (%66,7), 3 (%12,5), 9 (%37,5), 19 (%79,2) ve 12 (%50,0)'si sırasıyla ampicilin, penisilin G, enrofloksasin, eritromisin, florfenikol, linkomisin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, neomisin, spektinomisin, sulfametoksazol/trimetoprim, sefoperazon, sefotaksim ve seftiofura dirençli bulundu.

Serogrup A içerisinde tiplendirilen izolatlar ile beraber tiplendirilemeyen izolatların antibiyotik direnç profili Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de sunuldu.

Tablo 4.1. *P. multocida* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri

İzolat No.	Antibiyotik														
	AM	P	ENR	E	FFC	L	T	TE	N	SPT	SXT	CEP	CTX	FUR	
1	S	R	S	R	R	R	I	S	R	S	S	I	R	S	
2	I	R	I	R	I	R	R	S	S	S	S	I	I	R	
3	I	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	
4	R	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	I	R	I	
5	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	I	R	S	
6	S	R	S	S	R	R	R	R	I	R	S	I	S	S	
7	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
8	R	R	S	R	S	R	R	S	S	I	I	I	I	I	
9	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	
10	R	R	R	R	S	R	I	S	I	R	I	R	R	R	
11	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	
12	I	R	I	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	
13	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	
14	R	R	S	I	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	
15	R	R	S	R	I	R	R	S	I	R	I	I	R	I	
16	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	
17	R	R	S	R	I	R	R	R	I	S	S	I	R	R	
18	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	I	I	R	I	
19	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	
20	I	R	S	S	S	S	I	S	I	R	S	S	R	S	
21	R	R	R	I	S	R	R	S	I	I	S	I	R	R	
23	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	
27	I	R	R	R	I	R	I	S	S	S	S	R	R	R	
30	I	R	S	R	R	R	R	S	I	R	S	S	R	S	

AM: ampisilin, P: penisilin G, ENR: enrofloksasin, E: eritromisin, FFC: florfenikol, L: linkomisin, T: oksitetrasiklin, TE: tetrasiklin, N: neomisin, SPT: spektinomisin, SXT: sulfametoksazole/trimetoprim, CEP: sefoperazon, CTX: sefotaksim, FUR: seftiofur

Bakteriyel enfeksiyonlarda antibiyotik kullanımı, mortalite ve morbiteyi azaltmasından dolayı vazgeçilmez hale gelmiştir. Bununla birlikte antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı tedaviye karşı dirençli mikroorganizma sayısında bir artışa yol açmıştır (Liu and Pop, 2009). Veteriner sahada yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanların çoğuna dirençli *P. multocida* izolatlarının sayısı da giderek artmaktadır (Ujvári et al., 2018). Bu bakterilerde gerçekleşen mutasyonların veya direnç genlerinin birikmesi sonucunda genellikle çoklu ilaç direnci (ÇİD) şekillenmektedir. Günümüzde diğer birçok patojen bakterilerle beraber, *P. multocida* suşlarında da karşılaşılan ÇİD nedeniyle antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması daha da önemli hale gelmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testi için sıklıkla kullanılan yöntemler sıvı besi yeri mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleridir. *P. multocida* için yapılan çalışmalarda, sıvı besi yeri mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testi sonuçlarıyla E-test ve disk difüzyon testi sonuçlarının uyumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Bu testlerde dikkat edilmesi gereken husus, kalite kontrol standartları

ve duyarlı/dirençli sınır değerlerinin saptanması için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve/veya Antimikrobiyal Duyarlılık Testine Yönelik Avrupa Komitesi (EUCAST) gibi iki en sık kullanılan kılavuzdaki prosedürlere ve kriterlere uyulmasıdır. Yapılan çalışmalar, çoklu ilaç direncinin direnç kazanım belirleyicilerini içeren birkaç plazmide bağlı olarak veya integrasyon veya konjugasyon elemanlarından ötürü meydana gelebileceğini bildirmektedir. Bu plazmidlerden bağımsız ancak plazmid benzeri yapılar kromozomal DNA'ya entegre olmuş gen kasetleri ve insersiyon sekansları gibidir ve direnç kazanımında rol oynamaktadırlar. *P. multocida* suşlarında çoklu ilaç direncinin ortaya çıkışında da benzer ekstrakromozomal ve/veya kromozoma entegre genetik elementler rol oynayabilir. Bu şekilde ortaya çıkan direnç durumuna örnek olarak gentamisine, tetrasikline, kloramfenikol/florfenikole, tilmikosin/klindamisine ve tilmikosin/tulatromisine karşı gelişen direnç verilebilir (Michael et al., 2012). Bu çalışmada antibiyotik duyarlılık testleri CLSI kriterlerine göre gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular EUCAST ve CLSI'de bildirilen zon çaplarının yanı sıra bu kriterlerde yer almayan antibiyotikleri için ise ilgili literatürler ve üretici firmaların bildirdiği zon çapları dikkate alınarak değerlendirildi (Cusack et al., 2019).

El-Demerdash vd. (2023) yapmış oldukları çalışmada antimikrobiyal duyarlılık testinde *P. multocida* izolatların tamamının (n=30) florfenikol ve enrofloksasine duyarlı olduğunu, bununla beraber izolatların % 73,3'ünün eritromisine direnç gösterdiğini belirlemişlerdir. Mohamed vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada ise 21 adet izolatın tamamının florfenikol, sülfametoksazol ile trimetoprim'e duyarlı olduğu bildirilmiştir. Zhangcheng vd. (2018)'nin yaptığı çalışmada antimikrobiyal duyarlılık testi ile tetrasiklin, enrofloksasin ve aminoglikozidlerin *P. multocida*'ya karşı en etkili antibiyotikler olduğu ortaya konulmuştur. Kanatlı suşlarının % 78,3'ünün penisiline ve % 52,2'sinin sülfizoksazole dirençli olduğu tespit edilmiştir. Brezilya'nın güneyindeki klinik vakalardan izole edilen 96 *P. multocida* suşu ile yapılan retrospektif bir çalışmada suşların gentamisin ve amoksisilin duyarlılığı % 97'den yüksek bulunmuş ve en etkili ilaç olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber kanatlı orijinli suşların % 76,79'unun sülfonamidlere karşı dirençli olduğu görülmüştür (Furian et al., 2016). Hindistan'ın farklı bölgelerinden ve farklı kuş türlerinden (tavuk, ördek, hindi, bıldırcın ve kaz) izole edilen toplam 123 *P. multocida* suşu 20 farklı antibiyotik kullanılarak antibiyotik duyarlılık testlerine tabi tutulmuştur. Sülfadiazine karşı mutlak direnç tespit edilmiştir. Suşların en çok

kloramfenikole (% 73,98) duyarlı olduğu tespit edilirken, enrofloksasin (% 71,54) ve linkomisine de (% 64,23) duyarlılık yüksek bulunmuştur (Shivachandra et al., 2004). Rigobelo vd. (2013)'nin yaptığı çalışmada tüm izolatlar antimikrobiyal ajana duyarlılık açısından incelendiğinde en yüksek direnç seviyesi sefalotine (% 5,1) ve ardından amikasine (% 3,4) karşı olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.2. *P. multocida* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

Antibiyotik		Serogrup A (n=17)			Serogrup negatif (n=7)			Toplam (n=24)		
		R	I	S	R	I	S	R	I	S
AM	n	11	4	2	5	2	0	16	6	2
	%	64,7	23,5	11,8	71,4	28,6	0	66,7	25	8,3
P	n	17	0	0	7	0	0	24	0	0
	%	100	0	0	100	0	0	100	0	0
ENR	n	5	2	10	3	0	4	8	2	14
	%	29,4	11,8	58,8	42,9	0	57,1	33,3	8,3	58,3
E	n	14	1	2	4	1	2	18	2	4
	%	82,3	5,9	11,8	57,1	14,3	28,6	75	8,3	16,7
FFC	n	6	4	7	3	1	3	9	5	10
	%	35,3	23,5	41,2	42,9	14,3	42,9	37,5	20,8	41,7
L	n	17	0	0	5	0	2	22	0	2
	%	100	0	0	71,4	0	28,6	91,7	0	8,3
T	n	13	3	1	6	1	0	19	4	1
	%	76,5	17,6	5,9	85,7	14,3	0	79,1	16,7	4,2
TE	n	9	1	7	2	0	5	11	1	12
	%	52,9	5,9	41,2	28,6	0	71,4	45,8	4,2	50
N	n	8	5	4	1	4	2	9	9	6
	%	47,1	29,4	23,5	14,3	57,1	28,6	37,5	37,5	25
SPT	n	11	1	5	5	1	1	16	2	6
	%	64,7	5,9	29,4	71,4	14,3	14,3	66,7	8,3	25
SXT	n	3	5	9	0	1	6	3	6	15
	%	17,7	29,4	52,9	0	14,3	85,7	12,5	25	62,5
CEP	n	9	7	1	0	3	4	9	10	5
	%	52,9	41,2	5,9	0	42,9	57,1	37,5	41,7	20,8
CTX	n	13	2	2	6	0	1	19	2	3
	%	76,4	11,8	11,8	85,7	0	14,3	79,2	8,3	12,5
FUR	n	10	3	4	2	1	4	12	4	8
	%	58,9	17,6	23,5	28,6	14,3	57,1	50	16,7	33,3

AM: ampisilin, P: penisilin G, ENR: enrofloksasin, E: eritromisin, FFC: florfenikol, L: linkomisin, T: oksitetrasiklin, TE: tetrasiklin, N: neomisin, SPT: spektinomisin, SXT: sulfametoksazole/trimetoprim, CEP: sefoperazon, CTX: sefotaksim, FUR: seftiofur

2001-2003 yılları arasındaki dönemde ABD'deki hayvan hastalığı teşhis laboratuvarlarına gönderilmiş olan klinik olarak hasta kanatlı hayvanlardan izole edilen *P. multocida* izolatlarının tetrasiklin (% 6,25) hariç test edilen tüm antimikrobiyallere (amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, seftiofur, sefalotin, difloksasin, enrofloksasin, florfenikol, gentamisin, orbifloksasin, spektinomisin, tilmikisin, trimetoprim/sulfadiazin) karşı direnç oranı % 5'ten az bulunmuştur (Huang et al., 2009). Eid vd. (2019)'nin yapmış olduğu çalışmada *P. multocida* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık profili sekiz antimikrobiyal gruba ait ve sahada

en çok kullanılan antimikrobiyal ajanlardan 11'ine karşı test edilmiştir. İzolatların 16/16'sının (% 100) neomisine karşı fenotipik direnç gösterdiği, izolatların hiçbirinin nitrofurantoina direnç göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların 14/16'sı (% 87,5) spektinomisin ve penisilin G'ye fenotipik direnç gösterirken, izolatların 13/16'sı (% 81,3) oksitetrasikline direnç göstermiştir. Ayrıca sefotaksim, trimetoprim, ampisilin ve kloramfenikol dirençliliği sırasıyla 7/16 (% 43,8), 6/16 (% 37,5), 4/16 (% 25) ve 2/16 (% 12,5) olarak belirlenmiştir. Saha vd. (2021) *P. multocida* suşlarının EUCAST sınır değerlerine göre ampisilin (% 90,91), tetrasiklin (% 90,91)'e direnç gösterdiğini ve ayrıca suşların % 68,18'inin test edilen üç antibiyotik sınıfının (örn. oksasilin, sefoksitin ve trimetoprim) her birine karşı dirençli olduğunu belirlemiştir. Diğer bir çalışmada tavuklardan (15/145, % 10) ve ördeklerden (5/75, % 6) elde edilen 20 *P. multocida* izolatının amikasin, doksisisiklin, kloramfenikol ve neomisine karşı mutlak duyarlılık ve izolatların %50'sinden fazlasının sülfametoksazol-trimetoprim ve eritromisine karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca incelenen izolatların %25'inde (5/20) ÇİD gözlenmiştir (Shalaby et al., 2021). Elalamy vd. (2020)'nin yaptığı çalışmada, görünüşte sağlıklı ve hastalıklı tavuklarda *P. multocida* 'nın prevalansı ve antimikrobiyal direnç paternleri belirlenmiştir. İzole edilen 24 izolatın ofloksasin (%12,5) ve neomisin (%41,67)'e karşı düşük direnç gösterdiği saptanmıştır. Türkiye'de infraorbital sünusları şişmiş olan hindiden izole ve identifiye edilen *P.multocida* suşunun tetrasiklin, eritromisin, trimetoprim ve ampisiline duyarlı, penisilin, neomisine ise dirençli olduğu rapor edilmiştir (Aydın,1988).

Tez çalışması kapsamında incelenen 24 adet izolatın ampisilin, penisilin G, enrofloksasin, eritromisin, florfenikol, linkomisin, oksiterasiklin, tetrasiklin, neomisin, spektinomisin, sulfametoksazole/trimetoprim, sefoperazon, sefotaksim ve seftiofura direnç oranları sırasıyla %66,7, %100, %33,3, %75,0, %37,5, %91,7, %79,1, %45,8, %37,5, %66,7, %12,5, %37,5, %79,2 ve %50,0 olarak bulundu. İncelenen literatür bulgularında ise ampisilin, penisilin G, enrofloksasin, eritromisin, florfenikol, linkomisin, oksiterasiklin, tetrasiklin, neomisin, spektinomisin, sulfametoksazol/trimetoprim, sefotaksim ve seftiofura dirençlilik ortalamaları sırasıyla % 30,23, % 88,6, % 11,15, % 49,15, % 13,43, % 35,77, % 81,3, % 37,62, % 47,22, % 46,25, % 22,95, % 43,8 ve >% 5 olarak bildirilmiştir. Bulgular neomisin, oksiterasiklin ve sulfametoksazole/trimetoprim antibiyotiklerine karşı direncin dünya ortalamasının altında, diğer antibiyotiklere karşı direncin ise çok daha fazla olduğunu

göstermektedir. Bu durum, ülkemizde kanatlı hayvanlarda bilinçsiz antibiyotik kullanımı olduğuna işaret etmektedir.

İzolatlardan üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına dirençli olanları ÇİD'e sahip izolat olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda izolatların tamamının (% 100) üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına dirençli olduğu yani ÇİD profili sergilediği belirlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. *P. multocida* izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profilleri

		Direnç saptanan antibiyotik sınıfı sayısı						Çoklu direnç
		3	4	5	6	7	8	
Serogrup A	n	1	4	7	4	1	0	17
	%	5,9	23,5	41,2	23,5	5,9	0	% 100
Negatif	n	0	1	4	7	4	1	7
	%	0	5,9	23,5	41,2	23,5	5,9	% 100
Toplam	n	1	2	6	7	6	2	24
	%	4,2	8,3	25	29,2	25	8,3	% 100

Eid vd. (2019)'nin yapmış olduğu çalışmada *P. multocida* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık profili sekiz antimikrobiyal gruba ait ve sahada en çok kullanılan antimikrobiyal ajanlardan 11'ine karşı test edilmiştir. Sonuçlar izolatların 16/16'sının (% 100) üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoriye ait olan antimikrobiyal ajanlara karşı çoklu ilaç direnci (ÇİD) fenotipleri gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Ek olarak izolatların 8/16'sının (% 50), 3/16'sının (% 18,8) ve 2/16'sının (% 33,3) sırasıyla 5, 4 ve 6 antimikrobiyal gruba ait antimikrobiyal ajanlara karşı ÇİD gösterdiğini ortaya koymuştur. Tavuklardan (15/145, % 10) ve ördeklerden (5/75, % 6) elde edilen 20 *P. multocida* izolatının %25'inde (5/20) ÇİD gözlenmiştir (Shalaby et al., 2021). Bulguların karşılıklı olarak değerlendirilmesi sonucunda ÇİD izolatlarının oranları çok değişkenlik göstermekle beraber elde ettiğimiz %100 oranı da ülkemizde kanatlı hayvanlarda bilinçsiz antibiyotik kullanımı olduğunun diğer bir kanıtı olarak görülmektedir.

İzolatların antibiyotik direnç profilleri kalitatif olarak değerlendirildi ve direnç fenotipleri oluşturuldu. Çalışma kapsamında kullanılan antibiyotiklere karşı direnç profilleri Tablo 4.4'te sunuldu.

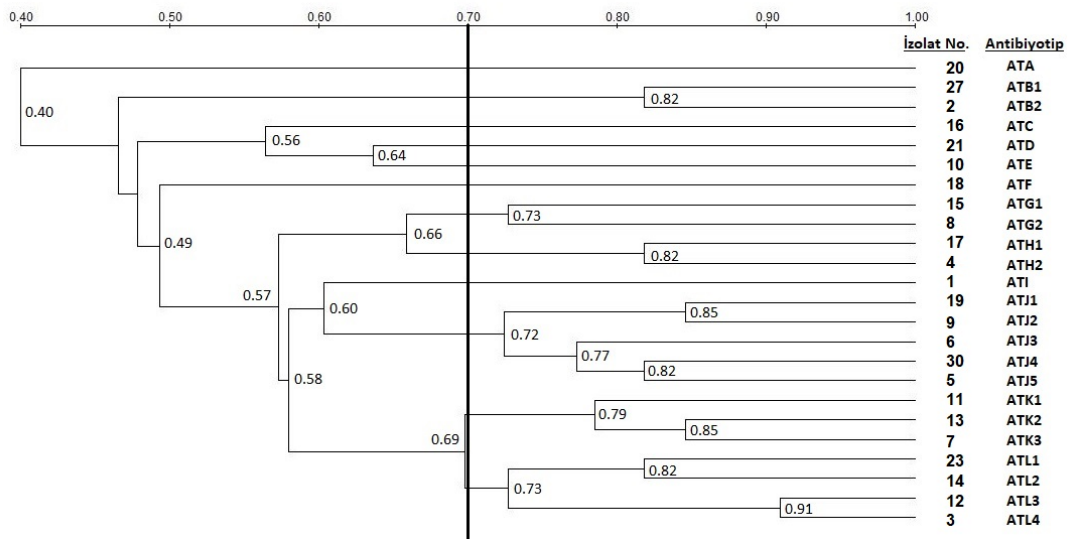
İzolatların çalışma kapsamında kullanılan antibiyotiklere direnç durumu göz önüne alınarak fenotipik yakınlıkları kantitatif da olarak belirlendi. Bu şekilde farklı serogruplara ait *P. multocida* izolatları arasındaki baskın özellik taşıyan antibiyotik duyarlılık profilinin ortaya konulması amaçlandı. *P. multocida* izolatlarının fenotipik

yakınlıklarının hesaplanması sonucunda izolatların % 40-91 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı (Şekil 4.3).

Tablo 4.4. *P. multocida* izolatlarının kalitatif antibiyotiplendirmesi

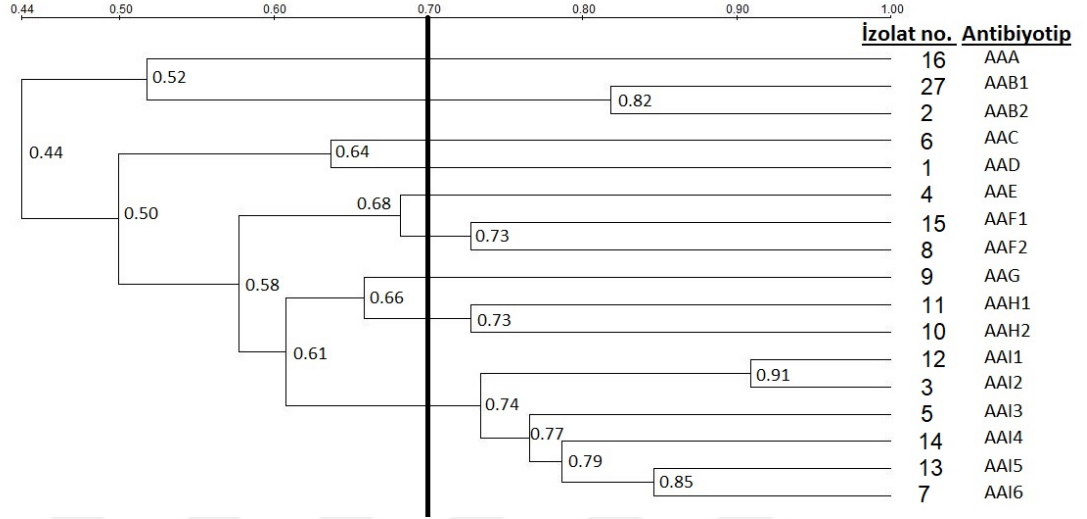
Antibiyotik direnç profili	İzolat no	İzolat sayısı	Dirençli antibiyotik sınıfı sayısı	Dirençli antibiyotik sınıfı
A1	9	1	8	BL,FL,MA,FE,LI,TE,AG,FYİ
A2	19	1	8	BL,FL,MA,FE,LI,TE,AG,SE
A3	18	1	7	BL,FL,MA,FE,TE,AG,SE
A4	11	1	7	BL,FL,MA,LI,TE,AG,SE
A5	10	1	6	BL,FL,MA,LI,AG,SE
A6	27	1	5	BL,FL,MA,LI,SE
A7	16	1	6	BL,FL,LI,TE,FYİ,SE
A8	21	1	5	BL,FL,LI,TE,SE
A9	1	1	6	BL,MA,FE,LI,AG,SE
A10	4	1	6	BL,MA,FE,LI,TE,SE
A11	5,13,30	3	7	BL,MA,FE,LI,TE,AG,SE
A12	3,12,15	3	6	BL, MA,LI,TE,AG,SE
A13	7	1	7	BL, MA,LI,TE,AG,FYİ,SE
A14	8	1	4	BL, MA, LI,TE
A15	2,17	2	5	BL, MA,LI,TE,SE
A16	6	1	5	BL,FE,LI,TE,AG
A17	14	1	5	BL,LI,TE,AG,SE
A18	23	1	4	BL,LI,TE,AG
A19	20	1	3	BL,AG,SE

BL: Beta-Laktamlar, FL: Florokinolon grubu, MA: Makrolid grubu, FE: Fenikol grubu, LI: Linkosamidler, TE: Tetrasiklin grubu, AG: Aminoglikozidler, FYİ: Folat yolu inhibitörleri, SE: Sefalosporinler.

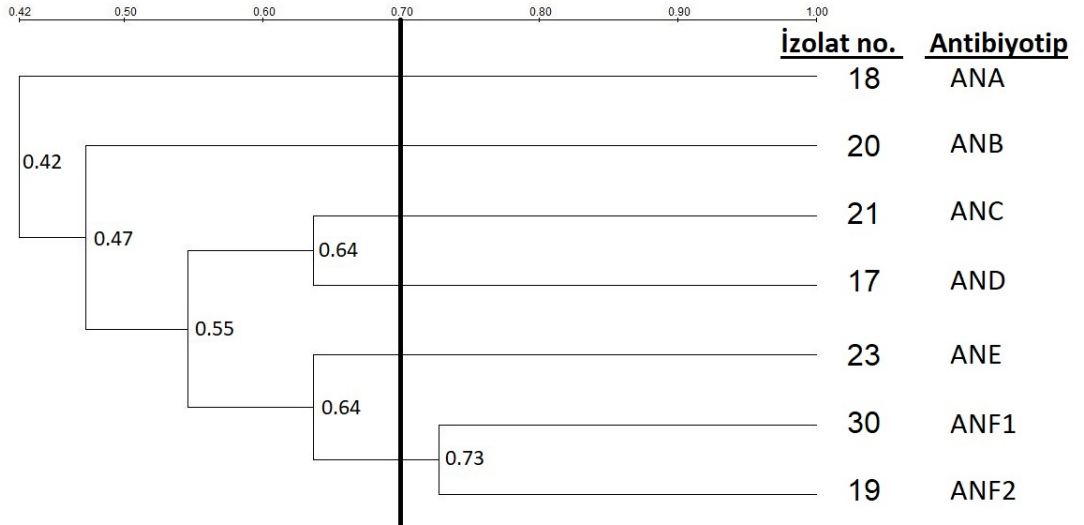


Şekil 4.3. İzolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları

Serogrup A'ya dahil olan 17 izolatın % 44-91 oranında (Şekil 4.4) ve serogruplandırılmayan 7 adet izolatın da % 42-73 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Serogrup A içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları



Şekil 4.5. Serogruplandırılmayan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları

İzolatlar arasındaki antibiyotik duyarlılık fenotipi yönünden ilişki % 70 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda *P. multocida* izolatlarının 6 tekli antibiyotip (ATA, ATC, ATD, ATE, ATF, ATI) ile beraber 6 çoklu antibiyotipe (ATB, ATG, ATH, ATJ, ATK, ATL) sahip olduğu belirlendi. ATB çoklu antibiyotipinde yer alan 2 adet izolatın % 82, ATG çoklu antibiyotipinde yer alan 2 adet izolatın % 73, ATH çoklu antibiyotipinde yer alan 2 adet izolatın % 82, ATJ çoklu antibiyotipinde yer alan 5 adet izolatın % 72, ATK

çoklu antibiyotipinde yer alan 3 adet izolatın % 79 ve ATL çoklu antibiyotipinde yer alan 4 adet izolatın da % 83 oranlarında benzerlik gösterdiği görüldü.

Serogrup A'ya dâhil olan izolatların 5 tekli antibiyotip (AAA, AAC, AAD, AAE, AAG) ile beraber 4 çoklu antibiyotipe (AAB, AAF, AAH, AAI) sahip olduğu belirlendi. AAB çoklu antibiyotipinde yer alan 2 adet izolatın % 82, AAF çoklu antibiyotipinde yer alan 2 adet izolatın % 73, AAH çoklu antibiyotipinde yer alan 2 adet izolatın % 73 ve AAI çoklu antibiyotipinde yer alan 6 adet izolatın da % 74 oranlarında benzerlik gösterdiği belirlendi. Serogruplandırılamayan 7 adet izolatın da 5 tekli antibiyotip (ANA, ANB, ANC, AND, ANE) ile beraber 1 çoklu antibiyotipe (ANF) sahip olduğu belirlendi. ANF çoklu antibiyotipinde yer alan 2 adet izolatın % 73 oranında benzerlik gösterdiği saptandı.

4.3. Biyofilm Üretiminin *in vitro* Olarak Belirlenmesi

P. multocida izolatlarının biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak CRA yöntemi ile araştırıldı. İncelenen 24 adet izolatın 14 (% 58,33)'ü CRA'da siyah koloni oluşturdu ve biyofilm oluşturma özelliği yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4.6). Serogrup A'ya dâhil olan 17 izolatın 10 (%58,82)'u ve serogruplandırılamayan 7 adet izolatın da 4 (%57,14)'ü biyofilm üretimi yönünden pozitif olarak bulundu (Tablo 4.5).



Şekil 4.6. *P. multocida* izolatlarının CRA'da biyofilm oluşturma durumları. Biyofilm pozitif: siyah koloniler; Biyofilm negatif: renksiz koloniler

Tablo 4.5. *P. multocida* biyofilm sonuçları

İzolat no.	Serogrup	Biyofilm
1	A	+
2	A	+
3	A	-
4	A	+
5	A	-
6	A	+
7	A	-
8	A	+
9	A	+
10	A	+
11	A	-
12	A	-
13	A	-
14	A	-
15	A	+
16	A	+
17	-	-
18	-	+
19	-	+
20	-	-
21	-	-
23	-	+
27	A	+
30	-	+

İnfeksiyöz hastalıkların patogeneğinde mikroorganizmaların vejetatif/planktonik formlarının yanı sıra biyofilm yapıları da önemli rol oynamaktadır. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarının görülme sıklığında görülen artışlar, biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik araştırmalara ilgiyi arttırmıştır. Biyofilm oluşumunun engellenmesi ve antibakteriyel direnç mekanizmalarının anlaşılması için biyofilm oluşumunun belirlenmesi önemlidir. Günümüzde gelişen teknolojinin yardımıyla biyofilm oluşumunu saptamada çok sayıda farklı *in vitro* yöntemden ve deney hayvanlarında biyofilm enfeksiyonu oluşturulmasına dayalı *in vivo* yöntemlerden faydalanılmaktadır. CRA, tüp aderens, Christensen ve mikropalak yöntemleri biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Biyofilmin konakçıda *P. multocida*'nın hayatta kalabilmesi açısından önemli bir virülens faktörü olduğu düşünülmektedir (Rajagopal et al., 2013). Bununla birlikte *P. multocida*'nın biyofilm üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar sayıca azdır ve biyofilm oluşturma kabiliyeti ile bakterinin patojenitesi veya virülensi hakkında kıyaslama yapılmamıştır. Saha vd. (2021)'nin yaptığı çalışmada kanatlı hayvanlardan izole edilen 22 adet *P. multocida* suşunun % 81,82'sinin biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Emery vd. (2017) tavuk kolerası vakalarından ve domuz akciğerlerinden izole edilen 94 *P. multocida* suşunun biyofilm oluşturma kapasitesini araştırmışlardır. Her iki hayvan kökenli suşların

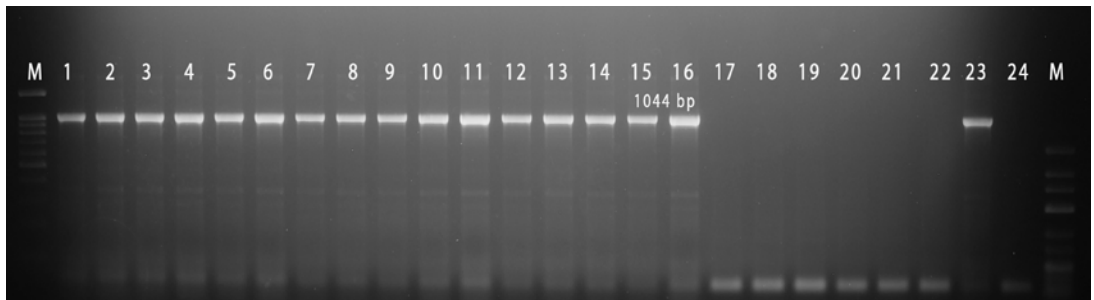
%59,58'inin biyofilm pozitif olduğu belirlenirken, suşların %40,42'sinin biyofilm üretmediği rapor edilmiştir. Tez çalışmasında *P. multocida* izolatlarının biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak CRA yöntemi ile incelendi ve bu izolatların % 58,33'ü CRA yöntemi ile biyofilm oluşturma özelliği yönünden pozitif bulundu. Bu tez çalışmasında tespit edilen biyofilm oluşturma oranı, literatürde bildirilen oranların ortalamalarında yer almaktadır. Bu durum biyofilm oluşumunun çeşitli faktörler tarafından etkilendiğini düşündürmektedir.

4.4. *P. multocida* İzolatlarının Kapsüler Tiplendirmesi

Kapsüler tiplendirme amacıyla Townsend et al. (2001) tarafından bildirilen multipleks PCR protokolünün optimizasyonu gerçekleştirildi. Optimizasyon sonrasında 5 µl hedef DNA, 1X PCR tamponu, 2,7 mM MgCl₂, 3,2 µM hyaD-hyaC, ecbJ, fcbD, 1 µM bcbD ve 1,2 µM dcbF primerleri, 280 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz ilave edilerek toplam 50 µl PCR karışımının optimum sonuç verdiği belirlendi. Amplifikasyon koşulları 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 30 siklus olmak üzere 95°C'de 45 sn, 56 °C'de 45 sn, 72 °C'de 1 dk amplifikasyon ve 72 °C'de 5 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı.

Görüntüleme sonrasında Serogrup A, Serogrup B, Serogrup D, Serogrup E ve Serogrup F için sırasıyla 1044, 760, 657, 511 ve 851 bp'lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4.7).

Değerlendirme sonucunda 17 izolat (% 70,83) Serogrup A olarak belirlenirken izolatlardan 7'si (% 29,17) ise PCR'da sonuç vermedi ve tiplendirilemedi (Tablo 4.6).



Şekil 4.7. *P. multocida* kapsüler tiplendirmesi için yapılan PCR sonucu. M: marker; 1,3: serogruplandırılamayan izolatlar; 2: serogrup A; 29: serogrup B; 12: serogrup D; 8: serogrup E; 69: serogrup F

Tablo 4.6. *P. multocida* kapsüler tiplendirme sonuçları

İzolat No	Serogrup
1	A
2	A
3	A
4	A
5	A
6	A
7	A
8	A
9	A
10	A
11	A
12	A
13	A
14	A
15	A
16	A
17	-
18	-
19	-
20	-
21	-
23	-
27	A
30	-

Birçok farklı türden sağlıklı hayvanın üst solunum yolu epiteline bulunan Gram negatif özellikte bir bakteri olan *P. multocida*, A, B, D, E ve F olmak üzere 5 serogrup altında kategorize edilmektedir (Dagleish et al., 2010). Mohamed vd. (2012) yapmış olduğu çalışmada kanatlı hayvan izolatu 21 *P. multocida* suşunun serotiplendirilmesi sonucunda 12 izolatu serotip A:1 (% 57,14) ve 4 izolatu serotip A:3 (% 19,05) olarak sınıflandırılmış ve 5'inin (% 23,8) ise tiplendirilemediğini bildirmiştir. Çin'de yapılan bir çalışmada ördek ve kazlardan izole edilen 23 (% 13,4) *P. multocida* suşunun 22'sinin (% 95,7) serogrup A ve 1'inin (% 4,3) serogrup F olduğu belirlenmiştir (Zhangcheng et al., 2018). Hindistan'ın farklı coğrafi bölgelerinden tavuklardan, ördeklerden, bıldırcınlardan, hindilerden ve kazlardan izole edilen 123 *P. multocida* suşunun kapsüler serogruplarının prevalansı araştırılmıştır. Tüm suşlar benzer kültürel ve morfolojik özellikler sergilemiştir. İzolatların 97'sinin (% 78) en yaygın serogrup olan A olduğu tespit edilirken, 4 izolatu serogrup D ve 2 izolatu serogrup F olduğu belirlenmiştir. Yirmi izolatu ise serogruplandırılamamıştır (Shivachandra et al., 2006). Diğer bir çalışmada tavuklardan (15/145, % 10) ve ördeklerden (5/75, % 6) elde edilen 20 *P. multocida* izolatu'nun multiplex PCR kullanılarak yapılan kapsüler tiplendirmesinde, tüm suşların A tipi (%100) olduğu rapor edilmiştir (Shalaby et al., 2021). Elalamy vd. (2020)'nin yaptığı çalışmada da görünüşte sağlıklı ve hastalıklı tavuklarda *P.*

multocida'nın kapsüler tiplendirilmesi sonucunda tüm izolatların (24 izolat) serogrup A olduğu bildirilmiştir. Furian vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada *P. multocida* suşlarının kapsüler serogrup A, B ve D genleri de dâhil olmak üzere virülensle ilişkili 22 geni PCR ile tespit edilmiştir. Kuş ve domuz orijinli suşların sırasıyla % 91 ve % 92'si serogrup A olarak bildirilmiştir. Li vd. (2018a) tarafından yapılan çalışmada ördek ve kazlarda görülen 172 klinik solunum yolu hastalığı vakasından izole edilen 23 *P. multocida* izolatının 22'si (% 95,7) Serogrup ve 1'i (% 4,3) de serogrup F olarak tiplendirilmiştir. Türkiye'de infraorbital sünusları şişmiş olan hindiden izole ve identifiye edilen *P. multocida* suşunun A serogrubunda olduğu saptanmıştır (Aydın, 1988).

Tez çalışmasında 24 adet *P. multocida* izolatının değerlendirilmesi sonucunda 17 izolat (% 70,83) Serogrup A olarak belirlenirken, izolatlardan 7'si (% 29,17) ise PCR'da sonuç vermemiş ve herhangi bir serogruba dâhil edilememiştir. Literatür incelemesinde ise Serogrup A ortalama olarak % 90,15 ile en fazla belirlenen serogrup olarak bildirilmektedir. Diğer serogruplardan D'nin ortalama görülme oranı % 3,25 ve serogrup F'nin ise % 5,92 olarak rapor edilmiştir. İzolatların ortalama % 16,35'i de serogruplandırılamamıştır. Değerlendirme sonucunda görüldüğü üzere tüm Dünya'da en fazla rastlanan grup, bizim de bulgularımıza paralel olarak, serogrup A'dır. Bunu takiben de serogruplandırılamayan izolatların yüksek bir oranda olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum da hali hazırda kullanılmakta olan primerlerin serogrupları ayırmada yeterince başarılı olmadığı veya Türkiye'de yeni bir veya birden fazla yeni serogrup olabileceği ihtimali düşünülebilir. Serogruplandırılamayan izolatlarda primerlerinin bağlandığı bölgelerde mutasyonel değişimlerin meydana gelmiş olma olasılığı da serogruplandırma sonuçlarını etkilemiş olabilir. Bu nedenlerden dolayı tüm genom sekanslama çalışmaları yapılarak bu coğrafya üzerindeki izolatların evrimsel bir değişim geçirip geçirmediği, geçirdiyse nasıl bir değişim geçirdiği ve dünya çapında geçerli serogrup sınıflandırmasında yer alan izolatlara hangi oranda genetik yakınlık teşkil ettiği araştırılmalıdır.

4.5. İzolatların Virülens Genlerinin Belirlenmesi

P. multocida izolatlarının bazı virülens genlerinin belirlenmesi için oluşturulan multipleks PCR protokolü optimize edildi. Multipleks PCR için optimize edilen protokol Tablo 4.7'de gösterildi. Görüntüleme sonrasında *fimA*, *fur*, *plpB*, *pmHAS* ve

sodA için sırasıyla 866, 244, 282, 430 ve 365 bp’lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 4.7. *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB* ve *fimA* genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü

Reaktif	Konsantrasyon					
10xPCR buffer	1X					
MgCl ₂	2,5 mM					
dNTP	0,2 mM					
Primer	<i>fimA</i>	0,025 µm	Ön denaturasyon	94°C	5 dk	1 siklus
		0,025 µm	Denaturasyon	94°C	30 sn	
	<i>fur</i>	0,025 µM	Annealing	45°C	30 sn	30 siklus
		0,025 µm	Uzama	72°C	30 sn	
	<i>plpB</i>	0,025 µm	Son uzama	72°C	5 dk	1 siklus
		0,025 µm				
	<i>pmHAS</i>	0,025 µm				
		0,025 µm				
	<i>sodA</i>	0,025 µm				
		0,025 µm				
Taq polimeraz	1 U					
Template DNA	5 µl					
Toplam hacim	25 µl					

İncelenen 24 adet izolatın 10 (% 41,67), 15 (% 62,5), 12 (% 50,0), 10 (% 41,67) ve 11 (% 45,83)’ü sırasıyla *fimA*, *fur*, *plpB*, *pmHAS* ve *sodA* için pozitif sonuç verdi. İzolatların virülens gen profilleri Tablo 4.8’de sunuldu.

Tablo 4.8. *P. multocida* izolatlarının *fimA*, *pmHAS*, *sodA*, *plpB* ve *fur* gen profilleri

İzolat no.	Virülens geni				
	<i>fimA</i>	<i>pmHAS</i>	<i>sodA</i>	<i>plpB</i>	<i>fur</i>
1	-	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	-	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	-	+
6	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	-	+	-	-	+
10	-	-	-	-	-
11	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-
13	+	+	+	-	+
14	-	-	-	+	-
15	-	-	-	+	+
16	-	-	-	-	-
17	+	+	-	+	-
18	+	+	-	-	-
19	-	+	-	+	+
20	-	+	+	-	-
21	-	+	-	-	-
23	-	-	+	-	-
27	+	+	+	-	-
30	-	-	-	-	-

Serogrup A içerisinde tiplendirilen izolatlar ile beraber tiplendirilemeyen izolatların virülens genlerini içerme sayı ve oranları Tablo 4.9’da sunuldu.

Tablo 4.9. *P. multocida* serogruplarının *fimA*, *pmHAS*, *sodA*, *plpB* ve *fur* gen profilleri

Serogrup		<i>fimA</i>	<i>pmHAS</i>	<i>sodA</i>	<i>plpB</i>	<i>fur</i>
A (n=17)	n	8	10	10	8	10
	%	47,06	58,82	58,82	47,06	58,82
Serotiplendirilemeyen (n=7)	n	2	5	2	2	1
	%	28,57	71,43	28,57	28,57	14,29
Toplam (n=24)	n	10	15	12	10	11
	%	41,67	62,5	50,0	41,67	45,83

Tez çalışması kapsamında incelenen 24 adet *P. multocida* izolatının incelenen 5 geni (*fimA*, *pmHAS*, *sodA*, *plpB* ve *fur*) içerme durumlarına göre virulotiplendirilmesi yapıldı. Virulotiplendirme sonucu Tablo 4.10’da gösterildi.

Tablo 4.10. *P. multocida* izolatlarının virulotiplendirilmesi

Virulotip	İzolat no	Serogrup	İzolat sayısı	Virülens genleri	Virülens geni sayısı
V1	2	A	4	<i>pmHAS</i> , <i>fimA</i> , <i>sodA</i> , <i>plpB</i> , <i>fur</i>	5
	4	A			
	7	A			
	8	A			
V2	3	A	3	<i>pmHAS</i> , <i>fimA</i> , <i>sodA</i> , <i>fur</i>	4
	5	A			
	13	A			
V3	27	A	1	<i>pmHAS</i> , <i>fimA</i> , <i>sodA</i>	3
V4	17	-	1	<i>pmHAS</i> , <i>fimA</i> , <i>plpB</i>	3
V5	18	-	1	<i>pmHAS</i> , <i>fimA</i>	2
V6	1	A	1	<i>pmHAS</i> , <i>sodA</i> , <i>plpB</i>	3
V7	9	A	1	<i>pmHAS</i> , <i>fur</i>	2
V8	19	-	1	<i>pmHAS</i> , <i>plpB</i> , <i>fur</i>	3
V9	20	-	1	<i>pmHAS</i> , <i>sodA</i>	2
V10	21	-	1	<i>pmHAS</i>	1
V11	11	A	1	<i>sodA</i> , <i>plpB</i> , <i>fur</i>	3
V12	14	A	1	<i>plpB</i>	1
V13	15	A	1	<i>plpB</i> , <i>fur</i>	2
V14	23	-	1	<i>sodA</i>	1
V15	6	A	5	-	-
	10	A			
	12	A			
	16	A			
	30	-			

Zhangcheng vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada 23 *P. multocida* izolatının 18 virülens gen bölgesi araştırılmıştır. İlgili genlerden prevalansı en az olan *toxA* (%) iken *tonB* geni ise %100 olarak belirlenmiştir. Demir edinme faktörleri (*tonB*, *fur*, *hgbA* ve *hgbB*), adezinleri kodlayan (*ptfA* ve *fimA*), süperoksit dismutazlar (*sodA* ve *sodC*), porin ve dış zar proteinleri (*plpB* ve *ompH*), nöraminidaz (*nanB* ve *nanH*) ve

hiyalüronan sentaz (pmHAS) genleri de izolatların %82,6'sından fazlasında tespit edilmiştir. *tox*A, *tad*D, *hsf*-1, *pfh*A ve *omp*A genleri izolatlarda % 0-73,9 arasında belirlenmiştir. Furian vd. (2016) kapsüler serogrup A, B ve D genleri de dâhil olmak üzere virülensle ilişkili 22 gen PCR ile tespit etmişler ve kümes hayvanları ve domuzlardan elde edilen *P. multocida* suşlarının antimikrobiyal duyarlılığı değerlendirmişlerdir. Her iki konakçıdan elde edilen suşlarının %90'ından fazlasında *omp*H, *oma*87, *plp*B, *psl*, *exb*D-tonB, *fur*, *hgb*A, *nan*B, *sod*A, *sod*C, *ptf*A genleri tespit edilmiştir. Li vd. (2018a) tarafından yapılan çalışmada ördek ve kazlarda görülen 172 klinik solunum yolu hastalığı vakasından izole edilen 23 *P. multocida* izolatı 15 antibiyotiğe duyarlılıkları ve virülens faktörleri için 18 genin varlığı açısından analiz edildi. PCR sonuçları kanatlı orijinli *P. multocida* suşlarının çoğunda *ptf*A, *fim*A, *ton*B, *fur*, *hgb*A, *hgb*B, *sod*A, *sod*C, *pm*HAS, *nan*H, *nan*B, *plp*B ve *omp*H genlerinin bulunduğunu gösterdi. *tox*A, *tad*D, *hsf*-1, *pfh*A ve *omp*A virülens genlerinin her biri suşların ortalama % 73,9'unda mevcut olarak saptanmıştır. *ton*B geninin de 23 klinik *P. multocida* suşunun tamamında bulunduğu rapor edilmiştir. Mısır'ın Sharkia Valiliği'nde tavuklar, ördekler, bıldırcınlar ve hindilerden elde edilen 30 *P. multocida* izolatı ile yapılan çalışmada *Oma*87, *sod*A ve *ptf*A virülens genleri bulunma oranları % 100 olarak bildirilmiştir (El-Demerdash et al., 2023). Shirzad-Aski ve Tabatabaei (2016) tarafından yapılan çalışmada da kümes hayvanlarından izole edilen 15 *P. multocida* suşunun *fim*A, *pm*HAS, *sod*A ve *plp*B genlerinin bulunma oranlarını sırasıyla % 93,33, % 73,33, % 100 ve % 100 olarak saptanmıştır.

Ghadimpour vd. (2017) tarafından İran'da yapılan çalışmada tavuk, hindi, kaz ve ördeklerden alınan 701 trakeal sürüntüsünden izole edilen 14 adet *P. multocida* izolatının % 57,1'inde *sod*A geni bulunduğu bildirilmiştir. Haghnazari vd. (2016) İran'daki kümes hayvanlarından elde edilmiş olan 30 *P. multocida* izolatında *omp*H, *ptf*A, *pfh*A, *hsf*-1 ve *fim*A genlerinin % 100, *tad*D geninin % 50 ve *tox*A geninin % 70 oranında bulunduğunu rapor etmişlerdir. Varga vd. (2013) kazlardan elde edilen 42 adet *P. multocida* izolatının fenotipik ve genotipik özellikleri araştırmışlar ve izolatların tümünün *pm*HAS ve *fim*A genleri açısından pozitif olarak belirlemişlerdir. Karthik vd. (2021) tarafından Haziran 2017-Ocak 2021 tarihleri arasında farklı kuş türlerini içeren ve Pasteurellosis şüphesi olan toplam 45 vakadan izole edilen *P. multocida* üzerinde yapılan çalışmada *fim*A, *pfh*A, *hsf*-2 ve *pm*HAS genleri suşların %100'ünde tespit edilmiştir. *Omp*H, *omp*87, *omp*A, *plp*B, *sod*A, *sod*C, *ptf*A, *hsf*-1, *exb*B, *fur*, *hgb*A, *hgb*B gen varlıkları da % 90 olarak bildirilmiştir. Çin'in

güneybatısındaki Rongchang, Yongchuan, Dazu, Neijiang ve Longchang'dan Ocak 2016'dan Ağustos 2017'ye kadar farklı çiftliklerden hastalıklı ördek, kaz ve tavuğa ait 283 karaciğer örneğinden 45 adet *P. multocida* izolatu biyokimyasal ve moleküler-biyolojik yöntemlerle karakterize edilmiştir. *P. multocida* izolatlarında *toxA* ve *tbpA* genleri tespit edilememiştir. *tonB* geni suşların tamamında bulunurken, *fur* geni % 97,8, *hgbA* geni % 97,8, *ompH* geni % 95,6, *sodA* geni % 93,3, *sodC* geni % 93,3 ve *ptfA* geni % 91,1 oranında rapor edilmiştir (Li et al., 2018b).

Literatürde yer alan çalışmalarda *fimA*, *fur*, *plpB*, *pmHAS* ve *sodA* genleri suşların ortalama olarak % 98,33, % 90,1, % 90,65, % 88,98 ve % 87,57'sinde rapor edilmiştir. Tez çalışması kapsamında incelenen 24 adet *P. multocida* izolatının *fimA*, *fur*, *plpB*, *pmHAS* ve *sodA* genlerini sırasıyla % 41,67, % 62,5, % 50,0, % 41,67 ve % 45,83 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu bulgular ilgili genlerin dünya genelinde bildirilen çalışmalardan oransal olarak daha düşük olduğu gösterse de, virülens genlerinin kümes hayvanlarından elde edilen *P. multocida* izolatları arasında oldukça yaygın olduğunu göstermektedir.

4.6. İzolatların Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

P. multocida izolatlarının antibiyotik direncinde rol oynayan bazı genler PCR ile araştırıldı. *P. multocida* izolatlarının sahip oldukları *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi için multipleks PCR protokolü optimize edildi (Bedier et al., 2022).

Multipleks PCR için optimize edilen protokol Tablo 4.11'de gösterildi. Görüntüleme sonrasında *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* genleri için sırasıyla 1076, 685, 489, 433 ve 425 bp'lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 4.11. *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü

Reaktif	Konsantrasyon					
10xPCR buffer	1X					
MgCl ₂	2,5 mM					
dNTP	0,2 mM					
Primer	<i>tetH</i>	0,125 µm	Ön denaturasyon	94°C	5 dk	1 siklus
		0,125 µm	Denaturasyon	94°C	30 sn	
	<i>bla</i>	0,125 µm	Annealing	57°C	45 sn	35 siklus
		0,125 µm	Uzama	72°C	45 sn	
	<i>aphA1</i>	0,125 µm	Son uzama	72°C	5 dk	1 siklus
		0,125 µm				
	<i>sul1</i>	0,125 µm				
		0,125 µm				
	<i>dfrA</i>	0,125 µm				
		0,125 µm				
	<i>Taq</i> polimeraz	0,5 U				
	Template DNA	2,5 µl				
	Toplam hacim	25 µl				

P. multocida izolatlarının antibiyotik direnç genlerini içermeye durumları Tablo 4.12’de sunuldu. İncelenen 24 adet izolatın 17 (% 70,83), 13 (% 54,17), 12 (% 50,00), 16 (% 66,67) ve 10’u (% 41,67) sırasıyla *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* için pozitif sonuç verdi.

Tablo 4.12. *P. multocida* izolatlarının antibiyotik direnç gen profilleri

İzolat no	<i>tetH</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrA</i>	<i>aphA1</i>	<i>bla</i>
1	+	+	-	+	-
2	+	+	-	+	-
3	+	+	-	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	-
6	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-
8	+	+	-	+	+
9	+	+	+	+	-
10	-	+	+	+	-
11	-	+	-	+	+
12	+	+	-	-	-
13	-	+	-	+	+
14	+	+	+	-	-
15	+	-	+	+	+
16	-	-	-	-	-
17	+	-	+	-	-
18	-	-	+	+	+
19	+	-	+	+	+
20	+	-	+	-	-
21	+	-	+	-	-
23	-	-	-	-	+
27	+	-	+	+	-
30	-	-	+	-	-

Serogrup A içerisinde tiplendirilen izolatlar ile beraber tiplendirilemeyen izolatların antibiyotik direnç genlerini içermeye sayısı ve oranları Tablo 4.13’de gösterildi.

Tablo 4.13. *P. multocida* serogruplarının *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* antibiyotik direnç gen profilleri

Serogrup		<i>tetH</i>	<i>bla</i>	<i>aphA1</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrA</i>
A (n=17)	n	13	13	6	14	7
	%	76,47	76,47	35,29	82,35	41,18
Serotiplendirilemeyen (n=7)	n	4	0	6	2	3
	%	57,14	0	85,71	28,57	42,86
Toplam (n=24)	n	17	13	12	16	10
	%	70,83	54,17	50	66,67	41,67

Mısır’ın Sharkia Valiliği’nde tavuklar, ördekler, bıldırcınlar ve hindiler arasında yapılan bir çalışmada elde edilen 30 *P. multocida* izolatı ile yapılan çalışmada antibiyotik direnç genleri olarak *ErmX* (eritromisin), *blaROB-1* (β -laktam) ve *mcr-1* (kolistin) direnç genleri izolatların sırasıyla % 60, % 46,6 ve % 40’ında tespit

edilmiştir (El-Demerdash et al., 2023). Haziran 2018 ile Aralık 2019 arasındaki dönemde *P. multocida* izolasyonu için Mısır'ın El-Gharbia ve Kafr El-Sheikh valiliklerindeki yumurtacı ve piliç sürülerinden 250 hastalıklı tavuktan akciğer, karaciğer ve dalak örnekleri toplanmıştır. Antimikrobiyal direnç genleri PCR kullanılarak tespit edilmiş ve tüm izolatların β -laktam direnç geni olan *bla-ROB-1* (%100) barındırdığı bildirilmiştir. Suşların % 50'sinde sülfonamid direnç geni olan *sul1*, % 33,3'ünde tetrasiklin direnç geni olan *tetH* ve %16,6'sında *dfrA* direnç geni bildirilmiştir (Bedier et al., 2022). Çin'in güneybatısındaki Rongchang, Yongchuan, Dazu, Neijiang ve Longchang vilayetlerinde bulunan farklı çiftliklerden hastalıklı ördek, kaz ve tavuğa ait 283 karaciğer örneğinden 45 adet *P. multocida* izolatu biyokimyasal ve moleküler-biyolojik yöntemlerle karakterize edilmiştir. *P. multocida* izolatlarının amoksisilin, sülfametazin, tetrasiklin, doksisiklin, florfenikol ve streptomisin antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla % 82,2, % 71,1, % 53,3, % 48,9, % 46,7 ve % 44,4 olarak bildirilmiştir. Tetrasikline dirençli 24 *P. multocida* izolatından 18'inin *tetB*'yi, 3'ü ise *tetH*'yi içerdiği saptanmıştır. Diğer 3 izolat ise bu 2 gen bakımından negatif bulunmuştur. Amoksisiline dirençli 37 izolatın 11'inde *TEM* geni bulunurken, florfenikole direnç gösteren tüm izolatlar *floR* geni açısından pozitif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca streptomisine dirençli tüm izolatların *strA* geni açısından pozitif olduğu ve sülfametazin dirençli 32 izolatın 30'unun *sul2* genini içerdiği rapor edilmiştir (Li et al., 2018b). Elalamy vd. (2020) tavuklardan izole ettikleri 24 *P. multocida* izolatında tetrasiklin direnci (*tetH*), ampisilin ve penisilin direnci (*BlaROB1*), tilmikosin (*ermX*) ve neomisin (*aph1*) direnci ile ilişkili antimikrobiyal direnç genlerinin varlığı belirlenmiştir. Tüm izolatlarda *tetH* geni (%100) bulunurken, *aph1* geni %70,83 ve *BlaROB1* geni %8,3 oranında rapor edilmiştir. İzolatlarda *ermX* geni tespit edilememiştir.

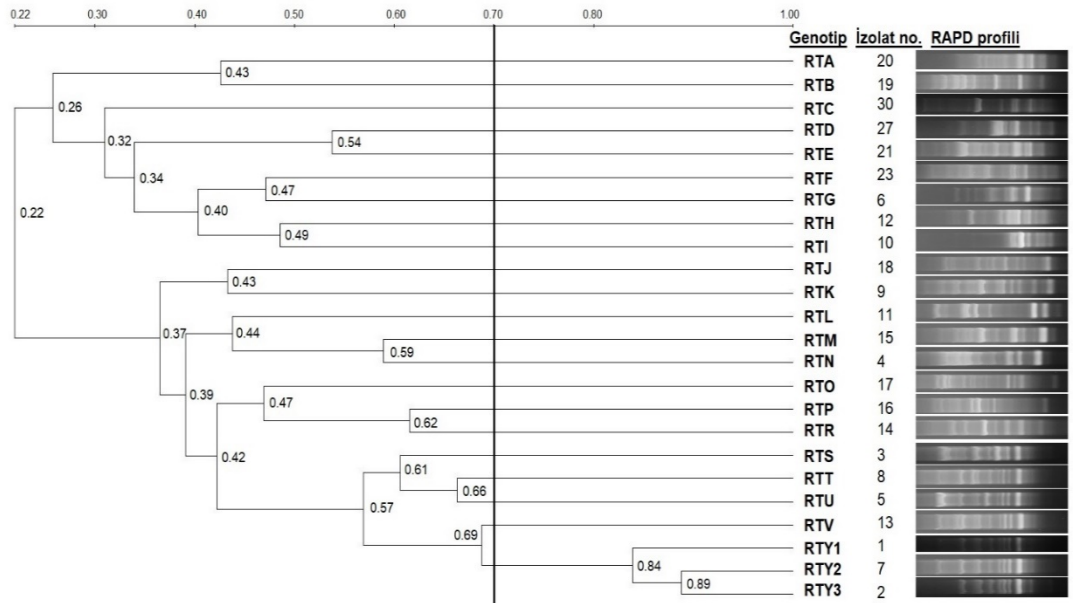
Tez çalışması kapsamında incelenen 24 adet *P. multocida* izolatının *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* genlerini sırasıyla % 70,83, % 54,17, % 50,00, % 66,67 ve % 41,67 oranlarında içerdikleri görüldü. İncelenen sınırlı sayıda literatür bulgularında ise *tetH*, *bla*, *aphA1*, *sul1* ve *dfrA* genlerinin belirlenme ortalamaları sırasıyla % 46,67, % 51,63, % 70,83, % 50 ve % 16,6 olarak bildirilmiştir. Bulguların değerlendirilmesi ile her ne kadar antibiyotik direnç fenotiplerinden elde edilen bulgular ortalamaların üzerinde yer alsa da, antibiyotik direnç gen varlıkları benzer olarak görülmüştür. Bu durum da ilgili gen-fenotip ilişkilerinden farklı bazı

değişkenlerin antibiyotik dirençliliğinde rol oynadığını ve tek başına antibiyotik direnç gen varlıklarının değerlendirilmesinin yeterli olmadığını göstermiştir.

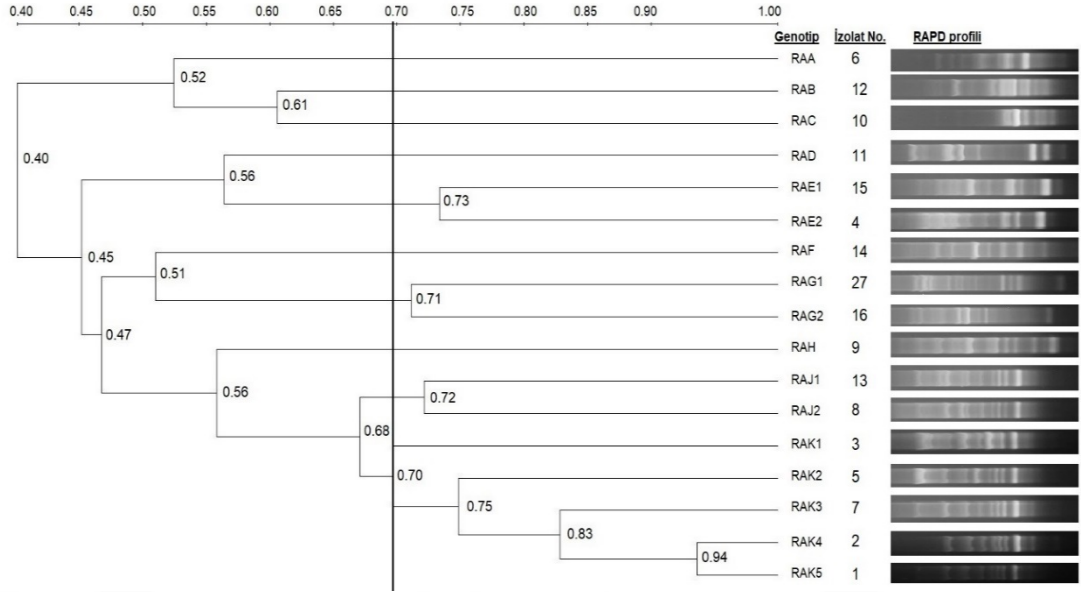
4.7. Genotiplendirme

P. multocida izolatlarının filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan RAPD-PCR ile genotiplendirme sonucunda izolatların % 22-89 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı (Şekil 4.8). Serogrup A'ya dâhil olan izolatların % 40-94 ve serogruplandırılmayan 7 adet izolatın da % 25-55 oranında benzerlik gösterdiği saptandı (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

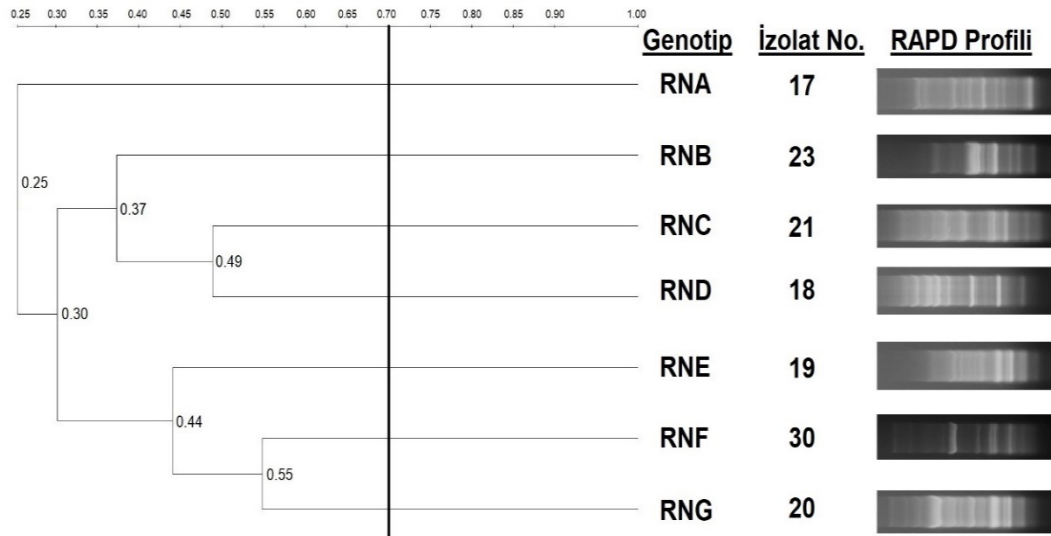
Suşlar arasındaki genetik ilişki % 70 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda *P. multocida* izolatlarının 21 tekli genotip (RTA-RTU) ve 1 çoklu genotipe (RTY) sahip olduğu belirlendi. RTY çoklu genotipinde yer alan 3 adet izolatın % 84-89 oranlarında benzerlik gösterdiği saptandı. Serogrup A'ya dâhil olan izolatların 6 tekli genotip (RAA, RAB, RAC, RAD, RAE, RAF) ile beraber 4 çoklu genotipe (RAE, RAG, RAJ, RAK) sahip olduğu belirlendi. RAE çoklu genotipinde yer alan 2 adet izolatın % 73, RAG çoklu genotipinde yer alan 2 adet izolatın % 71, RAJ çoklu genotipinde yer alan 2 adet izolatın % 72 ve RAK çoklu genotipinde yer alan 5 adet izolatın % 70 -94 oranlarında benzerlik gösterdiği görüldü. Serogruplandırılmayan izolatların ise 7 tekli genotipe sahip olduğu saptandı.



Şekil 4.8. *P. multocida* izolatlarının filogenetik benzerlik analizi



Şekil 4.9. Serogrup A içerisinde yer alan *P. multocida* izolatlarının filogenetik benzerlik analizi



Şekil 4.10. Serogruplandırılmayan *P. multocida* izolatlarının filogenetik benzerlik analizi

Enfeksiyonlardan korunma için etkili kontrol stratejilerinin oluşturulması için patojenlerin dağılımı ve yakınlıkları ile beraber bakteriyel enfeksiyonların epidemiyolojisinin belirlenmesi temel bir hedef olarak gösterilmektedir (Nazik et al., 2007). Bakterilerin tiplendirilmesinde antibiyotiplendirme, serotiplendirme, faj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme ve biyotiplendirme gibi fenotipik metotlar çevresel faktörlerden daha çok etkilendiği için, son yıllarda moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Moleküler analizler fenotipik yöntemler ile kıyaslandığında, *P.*

multocida'nın epidemiyolojisini anlamak açısından daha aydınlatıcıdır. Polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu (RAPD) tekniği, tekli veya çoklu ampliconlar oluşturmak için gelişigüzel kısa primerler (8-12 nükleotit) ile amplifiye edilebilen polimorfik DNA'nın agaroz jel üzerinde fragmanlarının profilleri nin karşılaştırması prensibine dayanmaktadır. Çeşitli türlerden hayvanları kapsayan, İran'da yapılan bir çalışmada 131 *P. multocida* izolatı RAPD-PCR ile karakterize edilmiştir. Yapılan RAPD-PCR analizi sonucunda 63 genotip ve 9 tiplendirilemeyen izolat olduğu tespit edilmiştir. Aynı hayvandan veya coğrafyadan köken alan *P. multocida* izolatlarında dahi dikkate değer bir seviyede genetik çeşitlilik olduğu görülmüştür. İzolatların bölge ve konak spesifik bir profile seyretnmediği tespit edilmiştir (Shirzad-Aski and Tabatabaei, 2016). Ülkemizde Elazığ'da 30 sığır, 15 koyun ve 1 keçiden izole edilen *P. multocida* izolatı ile yapılan RAPD-PCR analizi sonucunda sığırlardan 2, koyunlardan 3 farklı ayırt edici profil tespit edildiği ve bunun sonucunda izolatlar içerisinde çok az miktarda heterojenite olduğu bildirilmiştir (Özbey vd., 2004).

4.8. Bulguların Toplu Sunumu

Elde edilen bulgular doğrultusunda (Tablo 4.14), Samsun ve çevre illerde A serogrupuna ait *P. multocida* suşlarının baskın (% 70,83) olduğu görüldü.

Serogrup A'ya ait 4 ve 8 no'lu izolatlar antibiyogram, biyofilm varlığı, virülens genleri, antibiyotik direnç genleri içermeleri yönünden virülensi yüksek olarak değerlendirildi. İzolat 4 biyofilm pozitif olması, 5'er virülens ve antibiyotik direnç geni içermesi ve 6 sınıf antibiyotiğe dirençli olması; izolat 8 ise biyofilm pozitif olması, 5 virülens geni ve 4 antibiyotik direnç geni içermesi ve 4 sınıf antibiyotiğe dirençli olması yönleri ile aşı geliştirme çalışmalarında kullanılabilir olarak değerlendirildi. İzolat 4 ve 8 in filogenotipik olarak % 45 ve filofenotipik olarak da %68 oranında benzerlik gösterdikleri belirlendi. Aynı zamanda serogruplandırılmayan 19 numaralı izolat da biyofilm pozitif, 3 virülens - 4 antibiyotik direnç geni içermesi ve 8 sınıf antibiyotiğe dirençli olma yönleri ile kombine aşı çalışmalarında yer alabilir olarak değerlendirildi.

Tablo 4.14. *P. multocida* izolatları için çalışma kapsamında elde edilen bulguların toplu sunumu

İzolat No.	Serogrup A	Biyofilm	Antibiyotik Direnç Genleri					Virülens Genleri					Antibiyotik Direnç Durumları													
			<i>tetH</i>	<i>sulI</i>	<i>dfrA</i>	<i>aphA1</i>	<i>bla</i>	<i>fimA</i>	<i>pmHAS</i>	<i>sodA</i>	<i>plpB</i>	<i>fur</i>	AM	ENR	E	FFC	L	N	T	P	FUR	SPT	SXT	CEP	CTX	TE
1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	S	S	R	R	R	R	I	R	S	S	S	I	R	S
2	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	I	I	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	I	S
3	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R	S	R	R	R	I	R	R	I	S	S	I	R	R
5	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	I
6	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S	S	S	R	R	I	R	R	S	R	S	I	S	R
7	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	R	S	R	S	R	S	R	R	I	I	I	I	I	S
9	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	S	S	R
10	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	R	R	R	S	R	I	I	R	R	R	I	R	R	S
11	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
12	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
13	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
14	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	R	S	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
15	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	R	S	R	I	R	I	R	R	I	R	I	I	R	S
16	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R
17	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	R	S	R	I	R	I	R	R	R	S	S	I	R	R
18	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	I	I	R	S
19	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R
20	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	I	S	S	S	S	I	I	R	S	R	S	S	R	S
21	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	R	R	I	S	R	I	R	R	R	I	S	I	R	S
23	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
27	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	I	R	R	I	R	S	I	R	R	S	S	R	R	S
30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	I	S	R	R	R	I	R	R	S	R	S	S	R	S

AM: ampisilin, P: penisilin G, ENR: enrofloxasin, E: eritromisin, FFC: florfenikol, L: linkomisin, T: oksitetrasiklin, TE: tetrasiklin, N: neomisin, SPT: spektinomisin, SXT: sulfametoksazole/trimetoprim, CEP: sefoperazon, CTX: sefotaksim, FUR: seftiofur, S:duyarlı, I: orta derecede dirençli, R:dirençli

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tavuk kolerası, tüm kanatlı türlerini etkileyebilen ve dünya çapında yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Tavuk kolerası salgınları, kronik veya subklinik enfeksiyonlar meydana getirirse de özellikle yetişkin kuşlarda sıklıkla akut ölümcül sepsisemi olarak kendini gösterir. Tüm kanatlı türlerini etkileyebilen, genellikle ölümcül olan ve yaygın olarak görülen kanatlı kolerası, özellikle perakut formda kümes hayvanlarının en öldürücü ve bulaşıcı hastalıklarından biridir. Teşhis, hastalık belirtilerini gösteren hayvanlardan izole edilen *P. multocida* bakterisinin tanımlanmasına veya spesifik moleküler analizlerle organizmanın doğrudan tespitine bağlıdır. Olası tanı, tipik belirtilerin ve lezyonların gözlenmesinin yanında kan, karaciğer veya dalak gibi doku yaymalarında bipolar boyanan bakterilerin mikroskopik olarak gösterilmesine dayanabilir. Tavuk kolerasından elde edilen *P. multocida* suşlarının zoonotik potansiyele sahip olduğu düşünülmemektedir.

Aşılama, kümes hayvanlarının sağlık ve refahını iyileştirmede ve hayvanlardan insanlara bulaşmayı önlemede önemli bir rol oynar ve böylece önemli bir halk sağlığı stratejisi de oluşturur. Ülkemizde ticari olarak Tavuk kolerası için *P. multocida* suşlarını içeren aşılar bulunmamaktadır. Etkili bir aşı geliştirmek için de ulusal düzeyde elde edilen izolatların ayrıntılı karakterizasyonunu da içeren aşı geliştirme ve validasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Tez çalışması sonucunda Tavuk kolerası izolatı *P. multocida* suşları biyofilm üretme durumları, filogenotip ve antibiyotip yakınlıkları, antibiyotik direnç durumları ve virülens genleri açısından fenotipik ve genotipik olarak karakterize edildi. Elde edilen bulgular Samsun ve çevre illerde A serogrubuna ait *P. multocida* suşlarının baskın olduğunu gösterdi. Serogrup A'ya ait 4 ve 8 no'lu izolatlar antibiyogram, biyofilm varlığı, virülens genleri, antibiyotik direnç genleri içermeleri yönünden virülensi yüksek olarak değerlendirildi. İzolat 4 biyofilm pozitif olması, 5'er virülens ve antibiyotik direnç geni içermesi ve 6 sınıf antibiyotiğe dirençli olması; izolat 8 ise biyofilm pozitif olması, 5 virülens - 4 antibiyotik direnç geni içermesi ve 4 sınıf antibiyotiğe dirençli olması yönleri ile aşı geliştirme çalışmalarında kullanılabilir olarak değerlendirildi. Aynı zamanda serogruplandırılamayan 19 numaralı izolat da biyofilm pozitif, 3 virülens - 4 antibiyotik direnç geni içermesi ve 8 sınıf antibiyotiğe dirençli olma yönleri ile kombine aşı çalışmalarında yer alabilir olarak değerlendirildi. Tez çalışması sonucunda elde edilen bulguların Karadeniz Bölgesi'nde Tavuk Kolerası

için bölgesel ve ulusal düzeyde etkili koruma ve kontrol önlemlerinin alınması konusunda yardımcı olabileceği ve çalışma kapsamında karakterize edilen suşların yerli/milli aşı geliştirme çalışmalarının yapılabilmesine olanak sağlayabileceği kanaatine varıldı.



KAYNAKLAR

- Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Lung, L.T., Sekawi, Z., Ghaznavi-Rad, E., and Pei, C.P. (2012). Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 417-427.
- August, J.R. (1990). Dog and cat bites. In: *Zoonosis updates from the Journal of the American Veterinary Medical Association*, American Veterinary Association, Schaumburg, 58-62.
- Aydın, N. (1988). Bir hindide saptanan Pastörellozis olgusu üzerinde etiyolojik incelemeler. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(3), 109-116.
- Backstrand, J.M. and Botzler, R.G. (1986). Survival of *Pasteurella multocida* in soil and water in an area where avian cholera is enzootic. *Journal of Wildlife Diseases*, 22, 257-259.
- Bedier, E., Labib, S. and Ahmed, A. (2022). Characterization of antimicrobial resistance genes of *Pasteurella multocida* isolated from diseased chickens in Egypt. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 73(2), 4165-4172.
- Bhasin, J.L. and Biberstein, E.L. (1967). Fowl cholera in turkeys-the efficacy of adjuvant bacterins. *Avian Diseases*, 11, 159-168.
- Bierer, B.W. and Derieux, W.T. (1972). Immunologic response of turkeys to an avirulent *Pasteurella multocida* vaccine in the drinking water. *Poultry Science*, 51, 408-416.
- Bierer, B.W. and Derieux, W.T. (1973). Efforts to transmit and to enhance the virulence of an avirulent strain of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Poultry Science*, 52, 1510-1516.
- Bisgaard, M. (1993). Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene*, 279, 7-26.
- Bisgaard, M., Frederiksen, W., Mannheim, W. and Mutters, R. (1994). Zoonoses caused by organisms classified with Pasteurellaceae. In: *Handbook of zoonoses*, 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, 203-208.
- Bolin, F.M. and Eveleth, D.F. (1951). The use of biological products in experimental fowl cholera. *Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 88, 110-112.
- Boyce, J.D. and Adler, B. (2000). The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infection and Immunity*, 68, 3463-3468.
- Buchanan, R.E., Holt, J.G. and Lessel, E.F. (1966). *Index Bergeyana*. Williams and Wilkins, Baltimore, 786-792.
- Cameron, R.D.A., Boyle, D.O., Frost, A.J., Gordon, A.N. and Fegan, N. (1996). An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp. *gallicida* in a large pig herd. *Australian Veterinary Journal*, 73, 27-29.
- Capitini, C.M., Herrero, I.A., Patel, R., Ishitani, M.B. and Boyce, T.G. (2002). Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clinical Infectious Diseases*, 34, E74-E76.
- Carpenter, T.E., Snipes, K.P., Kasten, R.W., Hird, D.W. and Hirsh, D.C. (1991). Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in turkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 1345-1349.
- Carter, G.R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*: A haemagglutination test for the identification of serological types. *American Journal of Veterinary Research*, 16, 481-484.

- Catry, B., Decostere, A., Schwarz, S., Kehrenberg, C., de Kruif, A., and Haesebrouck, F. (2006). Detection of tetracycline-resistant and susceptible pasteurellaceae in the nasopharynx of loose group-housed calves. *Veterinary Research and Community*, 30, 707-715.
- Christensen, J.P. and Bisgaard, M. (1997). Avian pasteurellosis: taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. *Avian Pathology*, 26, 461-483.
- Christensen, J.P., Dietz, H.H. and Bisgaard, M. (1998). Phenotypic and genotypic characters of isolates of *Pasteurella multocida* obtained from backyard poultry and two outbreaks of avian cholera in the avifauna in Denmark. *Avian Pathology* 27, 373-381.
- Christensen, J.P., Petersen, K.D., Hansen, H.C. and Bisgaard M. (1999). Occurrence of fowl cholera in Danish wild birds, and poultry production. *Dansk Veterinærtidsskrift*, 82, 342-346.
- Christiansen, K.H., Carpenter, T.E., Snipes, K.P. and Hird, D.W. (1992). Transmission of *Pasteurella multocida* on Californian turkey premises in 1988-1989. *Avian Diseases*, 36, 262-271.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2019). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*. 4th ed. CLSI supplement VET08, Wayne, Pennsylvania.
- Collins, F.M. (1977). Mechanisms of acquired resistance to *Pasteurella multocida* infections: A review. *Cornell Veterinarius*, 67, 103-138.
- Curtice, C. (1902). Goose septicemia. *Cornell University Agricultural Experiment Station*, 86, 191-203.
- Curtis, P.E. (1981). Immunity to pasteurellosis. In: Avian immunology (M.E. Rose, L.N. Payne & B.H. Freeman, eds). British Poultry Science Ltd, Edinburgh, 349-358.
- Cusack, T.P., Ashley, E.A., Ling, C.L., Rattanavong, S., Roberts, T., Turner, P., Wangrangsimakul, T. and Dance, D.A.B. (2019). Impact of CLSI and EUCAST breakpoint discrepancies on reporting of antimicrobial susceptibility and AMR surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 910-911.
- Dabo, S.M., Confer, A.W. and Quijano-Blas, R.A. (2003). Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathogenesis*, 35, 147-157.
- Dagleish, M.P., Finlayson, J., Bayne, C., MacDonald, S., Sales, J. and Hodgson, J.C. (2010). Characterization and time course of pulmonary lesions in calves after intratracheal infection with *Pasteurella multocida* A:3. *Journal of Comparative Pathology*, 142(2), 157-169.
- Davies, R.L. and Lee, I. (2004). Sequence diversity and molecular evolution of the heat-modifiable outer membrane protein gene (OmpA) of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *Journal of Bacteriology*, 186, 5741-5752.
- Davis, R.B. (1987). Cholera and broiler breeders. *Poultry Science*, 20, 430-434.
- Doughty, S.W., Ruffolo, C.G. and Adler, B. (2000). The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 72, 79-90.
- Eid, H.M., Algammal, A.M., Elfeil, W.K., Youssef, F.M., Harb, S.M. and Abd-Allah, E.M. (2019). Prevalence, molecular typing, and antimicrobial resistance of bacterial pathogens isolated from ducks. *Veterinary World*, 12(5), 677-683.

- Elalamy, R.A., Tartor, Y.H., Ammar, A.M., Eldesouky, I.E. and Esawy, A.E.I. (2020). Molecular characterization of extensively drug-resistant *Pasteurella multocida* isolated from apparently healthy and diseased chickens in Egypt. *Pakistan Veterinary Journal*, 40(3), 319-324.
- El-Demerdash, A.S., Mowafy, R.E., Fahmy, H.A., Matter, A.A. and Samir, M. (2023). Pathognomonic features of *Pasteurella multocida* isolates among various avian species in Sharkia Governorate, Egypt. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 39(12), 335.
- Emery, B.D., Furian, T.Q., Pilatti, R.M., Chitolina, G.Z., Borges, K.A., Salle, C.T., and Moraes, H.L. (2017). Evaluation of the biofilm formation capacity of *Pasteurella multocida* strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 37, 1041-1048.
- Esslinger, J., Seleim, R.S., Herrmann, G. and Blobel, H. (1994). Adhesion of *Pasteurella multocida* to HeLa cells and to macrophages of different animal species. *Revue de Medicine Veterinaire*, 145, 49-53.
- Faddoul, G.P., Fellows, G.W. and Baird, J. (1967). Pasteurellosis in wild birds in Massachusetts. *Avian Diseases*, 11, 413-418.
- Fajfar-Whetstone, C.J., Coleman, L., Biggs, D.R. and Fox, B.C. (1995). *Pasteurella multocida* septicemia and subsequent *Pasteurella dagmatis* septicemia in a diabetic patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 202-204.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B. and Svanborg, C. (2006). Mechanism of pathogen specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *European Journal of Immunology*, 36, 267-277.
- Foged, N.T. (1992). *Pasteurella multocida* toxin: the characterization of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs (DSc Thesis). *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 100, 56.
- Frame, D.D., Clark, F.D. and Smart, R.A. (1994). Recurrent outbreaks of a cutaneous form of *Pasteurella multocida* infection in turkeys. *Avian Diseases*, 38, 390-392.
- Francis, D.P., Holmes, M.A. and Brandon, G. (1975). Infections after domestic animal bites and scratches. *Journal of American Medicine Associations*, 233, 42-45.
- Frederiksen, W. (1993). Ecology and significance of Pasteurellaceae in man - an update. *International Journal of Medical Microbiology*, 279, 27-34.
- Frost, A., O'Boyle, D., Wilkie, I. and Townsend K. (1999). Live metabolic drift vaccines for pasteurellosis in chickens and ducks. In: Proc. Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella (HAP) Conference, 13-17 September, Mabula, South Africa. University of the Orange Free State, Bloemfontein, 42.
- Furian, T.Q., Borges, K.A., Laviniki, V., Rocha, S.L., de Almeida, C.N., do Nascimento, V.P., Salle, C.T.P. and Moraes, H.L. (2016). Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 210-216.
- Galdiero, M., Folgore, A., Nuzzo, I. and Galdiero, E. (2000). Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells *in vitro* by protein H and LPS of *Pasteurella multocida*. *Immunobiology*, 202, 226-238.
- Ghadimpour, R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Mayahi, M. and Jabbari, A.R. (2017). Pheno- and genotypic characteristics of *Pasteurella multocida* avian isolates in selected provinces of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences*, 11(1), 3-13.

- Ghaly, S., Awadin, W. and Elsawak, A. (2017). Pathological and immunohistochemical study of *P. multocida* capsular type A in tissues of chickens and ducks infected with fowl cholera. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 63, 1-18.
- Glass, S.E. and Panigrahy, B. (1990). Dermal necrosis caused by *Pasteurella multocida* infection in turkeys. *Avian Diseases*, 34, 491-494.
- Glisson, J.R., Hofacre, C.L. and Christensen, J.P. (2013). Chapter 19: Pasteurellosis and other respiratory bacterial infections. In: Diseases of Poultry; Thirteenth Edition, Swayne D.E., Editor in Chief, Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V., Associate Editors. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA and Oxford, UK, pp: 807-823.
- Glisson, J.R., Sandhu, T.S. and Hofacre, C.L. (2008). Pasteurellosis, Avibacteriosis, Gallibacteriosis, Riemerellosis, and Pseudotuberculosis. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification, and Characterization of Avian Pathogens, Fifth Edition, Dufour-Zavala L., Swayne D.E., Glisson J.R., Pearson J.E., Reed W.M., Jackwood M.W. & Woolcock P.R., eds. American Association of Avian Pathologists, Athens, Georgia, USA, 12-14.
- Glorioso, J.C., Jones, G.W., Rush, H.G., Pentler, L.J., Darif, C.A. and Coward, J.E. (1982). Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infection. *Infection and Immunity*, 35:1103-1109.
- Gray, H. (1913). Some diseases of birds. In: *A System of Veterinary Medicine*, vol. 1. E.W. Hoare, ed. Alexander Eger, Chicago, pp. 420-432.
- Haghnazari, S., Jabbari, A.R. and Tadayon, K. (2016). Molecular Study of virulence factors of *Pasteurella multocida* isolates from poultry in Iran. *Journal of Veterinary Microbiology*, 12(32), 101-112.
- Harper, M., Boyce, J.D. and Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*, 265, 1-10.
- Hasan, R.A.K.M., Ali, M.H., Siddique, M.P., Rahman, M.M. and Islam, M.A. (2010). Clinical and laboratory diagnoses of common bacterial diseases of broiler and layer chickens. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 8, 107-115.
- Heddlestone, K.L. (1962). Studies on pasteurellosis: Two immunogenic types of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. *Avian Diseases*, 6, 315-321.
- Heddlestone, K.L. (1975). Pasteurellosis. In: *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. S.B. Hitchner, C.H. Domermuth, H.G. Purchase ve J.E. Williams, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, pp. 38-51.
- Heddlestone, K.L. and Watko, L.P. (1963). Fowl cholera: Susceptibility of various animals and their potential as disseminators of disease. *Proceedings of Annual Meeting US Livestock Sanitization Association*, 67, 247-251.
- Heddlestone, K.L., Gallagher, J.E. and Rebers, P.A. (1972). Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Diseases*, 16, 925-936.
- Hofacre, C.L., Glisson, J.R. and Kleven, S.H. (1986). Comparison of vaccination protocols of broiler breeder hens for *Pasteurella multocida* utilizing enzyme-linked immunosorbent assay and virulent challenge. *Avian Diseases*, 31, 260-263.
- Hofacre, C.L., Glisson, J.R., Kleven, S.H., Brown, J. and Rowland, G.N. (1989). Evaluation of *Pasteurella multocida* mutants of low virulence: Development and pathogenicity. *Avian Diseases*, 33, 270-274.

- Homchampa, P. (1995). Construction and vaccine potential of AROA biosynthetic mutants of *Pasteurella*. PhD Thesis, Monash University, Melbourne, 171 pp.
- Huang, T.M., Lin, T.L., and Wu, C.C. (2009). Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* isolates. *Avian Diseases*, 53(1), 89-93.
- Hughes, T.P. (1930). The epidemiology of fowl cholera. II. Biological properties of *P. avicida*. *Journal of Experimental Medicine*, 51, 225-238.
- Hughes, T.P. and Pritchett, I.W. (1930). The epidemiology of fowl cholera. III. Portal of entry of *P. avicida*; reaction of the host. *Journal of Experimental Medicine*, 51, 239-248.
- Iliev, T., Arsov, R., Iovcev, E. and Girginov, G. (1963). Role of swine in the epidemiology of fowl cholera. *Nauchni Veterinary Medicine Institute of Sofia*, 11, 289-293.
- Inatsuka, C.S., Julio, S.M. and Cotter, P.A. (2005). *Bordetella filamentous* hemagglutinin plays a critical role in immuno modulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 18578-18583.
- Karthik K, Rajan Prasanna Devi, Murugesan Ananda Chitra, Govindan Kalaiselvi, Ramasamy Bharathi, and Ramaswamy Sridhar, 2021 Virulence genes and enterobacterial repetitive intergenic consensus region (ERIC) profiling reveals highly diverse genetic population among avian strains of *Pasteurella multocida*. *Microbial Pathogenesis*, 161, 105303.
- Kasten, R.W., Carpenter, T.E., Snipes, K.P. and Hirsh, D.C. (1997). Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by the use of the polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 41, 676-682.
- Kuhnert, P., Bisgaard, M., Korczak, B.M., Schwendener, S., Christensen, H. and Frey, J. (2012). Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 89, 1-7.
- Lee, M.D., Wooley, R.E., Glisson, J.R. and Brown, J. (1988). Comparison of *Pasteurella multocida* serotype 3,4 isolates from turkeys with fowl cholera. *Avian Diseases*, 32, 501-508.
- Lee, M.D., Wooley, R.E., Glisson, J.R. and Brown, J. (1988). The relationship of pathogenicity to the growth of *Pasteurella multocida* serotype 3,4 isolates in normal turkey plasma. *Avian Diseases*, 32, 509-512.
- Li, Z., Cheng, F., Lan, S., Guo, J., Liu, W., Li, X., Luo, Z., Zhang, M., Wu, J. and Shi, Y. (2018a). Investigation of genetic diversity and epidemiological characteristics of *Pasteurella multocida* isolates from poultry in southwest China by population structure, multi-locus sequence typing and virulence-associated gene profile analysis. *Journal of Veterinary Medicine and Science*, 80(6), 921-929.
- Li, Z., Cheng, F., Lan, S., Zhou, Z., He, Y., Chen, S., Jiang, M. and Sun, Y. (2018b). Molecular characteristics of *Pasteurella multocida* strains isolated from poultry in China and genetic analysis of strains in terms of the *tonB* gene. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(1), 91-98.
- Liu, B. and Pop, M. (2009). ARDB—Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Research*, 37, D443-D447.
- Liu, D., Lawrence, M.L. and Austin, F.W. (2004). Specific PCR identification of *Pasteurella multocida* based on putative transcriptional regulator genes. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 263-267.

- Maheswaran, S.K., McDowell, J.R. and Pomeroy, B.S. (1973). Studies on *Pasteurella multocida*: Efficacy of an avirulent mutant as live vaccine in turkeys. *Avian Diseases*, 17, 382-393.
- Matsumoto, M. and Helfer, D.H. (1977). A bacterin against fowl cholera in turkeys: Protective quality of various preparations originated from broth cultures. *Avian Diseases*, 21, 382-393.
- Matsumoto, M., Strain, J.G. and Engel, H.N. (1991). The fate of *Pasteurella multocida* after intratracheal inoculation into turkeys. *Poultry Science*, 70, 2259-2266.
- Mbuthia, P.G., Njagi, L.W., Nyaga, P.N., Bebora, L.C., Minga, U., Christensen, J.P. and Olsen, J.E. (2011). Time-course investigation of infection with a low virulent *Pasteurella multocida* strain in normal and immune-suppressed 12-week-old free-range chickens. *Avian Pathology*, 40, 629-637.
- Michael, G.B., Kadlec, K., Sweeney, M.T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., Murray, R.W., Watts, J.L. and Schwarz, S. (2012). *ICEPmu1*, an integrative conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: analysis of the regions that comprise 12 antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(1), 84-90.
- Mohamed, M.A., Mohamed, M.W.A., Ahmed, A.I., Ibrahim, A.A. and Ahmed, M.S. (2012). *Pasteurella multocida* in backyard chickens in Upper Egypt: incidence with polymerase chain reaction analysis for capsule type, virulence in chicken embryos and antimicrobial resistance. *Veterinaria Italiana*, 48, 77-86.
- Muhairwa, A.P., Christensen, J.P. and Bisgaard, M. (2000). Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. *Avian Pathology*, 29, 133-142.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W. and Mannheim, W. (1985). Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposal of new species, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *International Journal of Systemic Bacteriology*, 35, 309-312.
- Namioka, S. and Murata, M. (1961). - Serological studies on *Pasteurella multocida*. II. Characteristics of somatic (O) antigen of the organism. *Cornell Veterinarius*, 51, 507-521.
- 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.
- Office International des Epizooties (1996). Fowl cholera (avian pasteurellosis), chapter 3.6.11. In Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 3rd Ed. OIE, Paris, 572-577.
- Ogunnariwo, J.A., Alcantara, J. and Schryvers, A.B. (1991). Evidence for non siderophoremediated acquisition of transferrin bound iron by *Pasteurella multocida*. *Microbial Pathogenesis*, 11, 47-56.
- Özbey, G., Kilic, A., B Ertas, H. ve Muz, A. (2004). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* and *Manheimia haemolytica* strains isolated from cattle, sheep and goats. *Veterinárni Medicina*, 49(3), 65-69.
- Özdemir, Ö. ve Erer., H. (2008). Yumurtacı tavuklarda solunum sistemi lezyonları üzerine patolojik ve mikrobiyolojik incelemeler. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 24, 12-20.

- Öztürk, D. ve Çorlu, M. (2006). Pnömonili koyun akciğerlerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 22(1-2), 59-63.
- Pancier, R.J., Corstvet, R.E., Confer, A.W. and Gresham, C.N. (1984). Bovine pneumonic pasteurellosis: effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 2538-2542.
- Pasteur, L. (1880). Sur les maladies virulents et en particulier sur la maladie appelee vulgairement cholera des poules. *CR Academia Science*, 90, 239-248.
- Potron, A., Poirel, L., Croizé, J., Chantepredrix, V. and Nordmann, P. (2009). Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type beta-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (7), 3010-3016.
- Prantner, M.M., Harmon, B.G., Glisson, J.R. and Mahaffey, E.A. (1990). Septicemia in vaccinated and nonvaccinated turkeys inoculated with *Pasteurella multocida* serotype A:3,4. *Veterinary Pathology*, 27, 254-260.
- Pratt, J., Cooley, J.D., Purdy, C.W. and Straus, D.C. (2000). Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. *Current Microbiology*, 40, 306-309.
- Pruimboom, I.M., Rimler, R.B., Ackermann, M.R. and Brogden, K.A. (1996). Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. *Avian Diseases*, 40, 887-893.
- Rajagopal, R., Nair, G.K., Mini, M., Joseph, L., Saseendranath, M.R. and John, K. (2013). Biofilm formation of *Pasteurella multocida* on bentonite clay. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(2), 120-125.
- Rebers, P.A. and Heddleston K.L. (1977). Fowl cholera: induction of cross-protection in turkeys with bacterins prepared from host-passaged *Pasteurella multocida*. *Avian Dis.*, 21, 50-56.
- Rebers, P.A., Jensen, A.E. and Laird, G.A. (1988). Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases*, 32, 313-318.
- Reis, J. (1941). On the presence of *Pasteurella avicida* in feces of infected birds. *Arquivos do Instituto Biologico*, 12, 307-309.
- Rhoades, K.R. and Rimler, R.B. (1987). Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Diseases*, 31, 895-898.
- Rhoades, K.R. and Rimler, R.B. (1990). Somatic serotypes of *Pasteurella multocida* strains isolated from avian hosts (1976-1988). *Avian Diseases*, 34, 193-195.
- Rigobelo, E.C., Blackall, P.J., Maluta, R.P., and de Ávila, F.A. (2013). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* isolated from chickens and japanese quails in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 161-164.
- Rimler, R.B. (1994). Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D ve F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharidases. *Veterinary Record*, 134, 191-192.
- Rimler, R.B. and Glisson J.R. (1997). Fowl cholera. In Diseases of poultry, 10th Ed. (B.W. Calnek with H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald & Y.M. Saif, eds). Iowa State University Press, Ames, 143-161.
- Rimler, R.B. and Rhoades, K.R. (1989). *Pasteurella multocida*. In: Adlam C and Rutter JM (eds) *Pasteurella and Pasteurellosis*. London: Academic Press, pp. 37-73.
- Ryu, E. (1961). Studies on *Pasteurella multocida*. VI. The relation- ship between inhibitory action of blood and susceptibility of animals to *P. multocida*. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 23, 357-361.

- Ryu, H.I. and Kim, C.J. (2000). Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. *Journal of Veterinary Science*, 1, 87-95.
- Saha, O., Islam, M.R., Rahman, M.S., Hoque, M.N., Hossain, M.A. and Sultana, M. (2021). First report from Bangladesh on genetic diversity of multidrug-resistant *Pasteurella multocida* type B:2 in fowl cholera. *Veterinary World*, 2527-2542.
- Scott, P.C., Markham, J.F. and Whithear, K.G. (1999). *Pasteurella multocida* aro-A mutant vaccine in chickens. In Proc. Haemophilus, Acfinobacillus and Pasteurella (HAP) Conference, 13-17 September, Mabula, South Africa. University of the Orange Free State, Bloemfontein, 43.
- Shalaby, A.G., Bakry, N.R. and El-Demerdash, A.S. (2021). Virulence attitude estimation of *Pasteurella multocida* isolates in embryonated chicken eggs. *Archives of Microbiology*, 203(10), 6153-6162.
- Shirzad-Aski, H. and Tabatabaei, M. (2016). Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates obtained from poultry, ruminant, cats and dogs using RAPD and REP-PCR analysis. *Molecular Biology Research Communications*, 5(3), 123-132.
- Shivachandra, S., Kumar, A., Biswas, A., Ramakrishnan, M.A., Singh, V.P. and Srivastava, S.K. (2004). Antibiotic sensitivity patterns among Indian strains of avian *Pasteurella multocida*. *Tropical Animal Health and Production*, 36, 743-750.
- Shivachandra, S.B., Kumar A.A., Gautam R., Singh, V.P., Saxena, M.K. and Srivastava, S.K. (2006). Identification of avian strains of *Pasteurella multocida* in India by conventional and PCR assays. *The Veterinary Journal*, 172, 561-564.
- Siju, J., Kumar, A.A., Shivachandra, S.B., Chaudhuri, P., Srivastava, S.K. and Singh, V.P. (2007). Cloning and characterization of type 4 fimbrial gene (ptfA) of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 (strain P52). *Veterinary Research Communications*, 31, 397-404.
- Simensen, L., Olsen, D. and Hahn, G.L. (1980). Effects of high and low environmental temperatures on clinical course of fowl cholera in turkeys. *Avian Diseases*, 24, 1007-1010.
- Skidmore, L.V. (1932). The transmission of fowl cholera to turkeys by the common house fly (*Musca domestica* Linn) with brief notes on the viability of fowl cholera microorganisms. *Cornell Veterinarius*, 22, 281-285.
- Snipes, K.P., Ghazikhanian, G.Y. and Hirsh, D.C. (1987). Fate of *Pasteurella multocida* in the blood vascular system of turkeys following intravenous inoculation: comparison of an encapsulated, virulent strain with its avirulent, acapsular variant. *Avian Diseases*, 31, 254-259.
- Snipes, K.P., Hirsh, D.C., Kasten, R.W., Carpenter, T.E., Hird, D.W. and Mccapes, R.H.. (1990). Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California. *Avian Diseases*, 34, 315-320.
- Strugnell, B.W., Dagleish, M.P., Bayne, C.W., Brown, M., Ainsworth, H.L., Nicholas, R.A., Wood, A. and Hodgson, J.C. (2011). Investigations into an outbreak of corvid respiratory disease associated with *Pasteurella multocida*. *Avian Pathology*, 40(3), 329-336.
- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q. and Chen, H. (2009). Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 951-958.

- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J. and Adler, B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Microbiology*, 39, 924-929.
- Tsuji, M. and Matsumoto, M. (1989). Pathogenesis of fowl cholera: influence of encapsulation on the fate of *Pasteurella multocida* after intravenous inoculation into turkeys. *Avian Diseases*, 33, 238-247.
- Ujvári, B., Makrai, L. and Magyar, T. (2018). Characterisation of a multiresistant *Pasteurella multocida* strain isolated from cattle. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(1), 12-19.
- Van, Es, L. and Olney, J.F. (1940). An inquiry into the influence of environment on the incidence of poultry diseases. *University of Nebraska Agricultural Experimental Research Bulletin*, 118, 17-21.
- Varga, Z., Dmitriy, V.V., Stipkovits, L., Thuma, Á., Sellyei, B. and Magyar, T. (2013). Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from geese. *Veterinary Microbiology*, 163, 149-156.
- Versalovic, J., Thearith, K. and Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19 (24), 6823-6831.
- Weber, D.J., Wolfson, J.S., Swartz, M.N. and Hooper, D.C. (1984). *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine*, 63, 133-154.
- Wilson, G.S. and Miles, A.A. (1964). *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*. Williams and Wilkins, Baltimore, 932-953.
- Zangenah, S., Güleriyüz, G., Boräng, S., Ullberg, M., Bergman, P. and Özenci, V. (2013). Identification of clinical *Pasteurella* isolates by MALDI-TOF-a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 77, 96-98.
- Zhangcheng, L.I., Cheng, F., Lan, S., Zhou, Z., He, Y., Chen, S., Jiang, M., and Sun, Y. (2018). Molecular characteristics of *Pasteurella multocida* strains isolated from poultry in china and genetic analysis of strains in terms of the *tonB* gene. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24, 91-98.

ÖZ GEÇMİŞ

Sinan PİR, ilkokul, ortaokul ve lise eğitimini aynı ilçede tamamladıktan sonra Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2004 yılında mezun oldu. 2006 yılında Tarım ve Orman Bakanlığı'na Veteriner Hekim olarak atandı ve sırasıyla Rize/Çayeli İlçe Tarım Müdürlüğü, Samsun Tarım İl Müdürlüğü'nde ki görevlerinin ardından Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında Veteriner Hekim olarak görevine devam etmektedir. 2016 yılında OMÜ LEE Veteriner Viroloji Yüksek Lisans programından mezun olduktan sonra 2018 yılında OMÜ LEE Veterinerlik Mikrobiyolojisi Doktora programına girdi. Evli ve 2 kız babasıdır.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-6238-8413

Yayınlar:

1. Pir, S., Özcan, Ü., Ergüden, V.E., Çetiner, H., Yaman, Ş., Çiftci, A. (2023). Sığır Solunum Yolu Hastalığı'ndan Mycoplasma bovis İzolasyonu ve Karakterizasyonu 14. Ulusal/3. Uluslararası Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, 30.11-03.12.2023, Marmaris, pp.:146-147.
2. Pir, S., Kadı, H., Ozan, E., Gür, Y., Acartürk, A.K., Doğan, F. (2023). Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne bağlı illerde NDV prevalansının retrospektif değerlendirmesi 5. Uluslararası Beyaz Et Kongresi, 24-28.04.2019, Antalya, pp.:318