

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM YÖRESİNDE SIĞIR VE KOYUN PNÖMONİLİ  
AKCİĞERLERİNDEN *PASTEURELLA MULTOCIDA* VE  
*MANNHEİMIA HAEMOLYTICA* ETKENLERİNİN  
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, ANTİBİYOTİK  
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ VE OLASI DİRENÇ  
GENLERİNİN ANALİZİ

Vet. Hek. Elif KARADENİZ PÜTÜR

(DOKTORA TEZİ)

Danışman

Prof. Dr. Fatih BÜYÜK

2023-KARS

**TEZ ONAY SAYFASI**



## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programında yapılmıştır. Çalışmada “Erzurum Yöresinde Sığır ve Koyun Pnömonili Akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* Etkenlerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu, Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Olası Direnç Genlerinin Analizi” gerçekleştirilmiştir.

Sığır ve koyun pnömonilerinde etiyolojik etken olarak *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın yaygınlığı, antibiyotik duyarlılıklarının ve mevcut dirençliliklerine ait genetik mekanizmaların belirlenmesi gibi lokal davranışlarının yanı sıra evrensel suş koleksiyonundaki filogenetik yerlerinin belirlenmesi gibi küresel davranışlarının da belirlendiği bu çalışmaya ait verilerin, *Pasteurella* spp. kaynaklı pnömoni olgularının eradikasyonunda fayda sağlayacağı umulmaktadır.

Tez konumun belirlenmesinde fikir, destek ve onay veren, doktora eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübelerini aktaran, bilimsel ve akademik konularda çalışmamın her aşamasını titizlikle takip eden ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Fatih BÜYÜK'e teşekkürleri bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımnda fikir ve tecrübelerine başvurduğum Uzm. Biyolog Murat ÖZMEN, Doç. Dr. Seyda CENGİZ ve Doç. Dr. Mehmet Cemal ADIGÜZEL'e en samimi duygularımla teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya verdikleri her türlü katkı için Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürümüz Dr. Ediz Kağan ÖZGEN'e ve Müdür Yardımcımız Dr. Yasemin ERDOĞAN'a teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışmanın yapılmasına onay veren Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Bu süreçte desteğini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda bulunan eşim Ersan PÜTÜR'e ve kızım Serra PÜTÜR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

### ERZURUM YÖRESİNDE SIĞIR VE KOYUN PNÖMONİLİ AKCİĞERLERİNDEN *PASTEURELLA MULTOCIDA* VE *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ETKENLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ VE OLASI DİRENÇ GENLERİNİN ANALİZİ

Heterojen bir yapı sergileyen *Pasteurellaceae* familyasının patojen üyeleri genellikle *Pasteurella* ve *Mannheimia* cinsi içerisinde yer almaktadır. Bunlar arasında *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica*, sığır ve koyunlarda hemorajik septisemi, enzootik pnömoni ve mastitis gibi enfeksiyonlara yol açarak hayvan ölümleri, verim kayıpları ve tedavi-koruma-kontrol giderleri gibi önemli ekonomik kayıplar oluşturmaktadır. Bu çalışmada, Erzurum yöresi mezbahanelerinden alınan 100 sığır ve 100 koyun pnömonili akciğer örnekleri *Pasteurella* ve *Mannheimia* etkenlerinin varlığı yönünden araştırıldı. İzolatların identifikasyonu konvansiyonel yöntemler, VITEK 2 Compact identifikasyon sistemi, tür spesifik PZR ile gerçekleştirildi. Ayrıca, izolatların antibiyotik duyarlılıkları fenotipik olarak (VITEK 2 Compact sistemi) belirlendi ve direnç genleri araştırılması moleküler yöntemle (PZR) belirlendi. İzolatların 16S rRNA sekans analizi ile identifikasyonları teyit edildi ve filogenetik analizleri gerçekleştirildi. *Pasteurella* spp. kültür pozitifliği %8 saptandı. Tür dağılımı 7 adet *Pasteurella multocida* ve 9 adet *Mannheimia haemolytica* olarak belirlendi. Sığırlarda *P. multocida* pozitifliği %4 ve *M. haemolytica* pozitifliği %5 iken, koyunlarda *P. multocida* pozitifliği %3 ve *M. haemolytica* pozitifliği %4 olarak tespit edildi. *Pasteurella* türlerinin identifikasyonunda VITEK 2 Compact identifikasyon sistemi ile PZR'nin tanısal uyumu %100 olarak saptandı. *P. multocida* izolatlarının tamamı ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametaksazole dirençli iken, seftiofur (%100) ve doksisisiklin (%85,71) duyarlılıkları yüksek bulundu. *P. multocida* izolatlarının en az %71,43'ünde çoklu antibiyotik direncine rastlanıldı. *M. haemolytica* izolatlarının tamamı ampisilin ve trimetoprim-sulfametaksazole dirençli iken, izolatların amoksisilin-klavulonik asit (%100), doksisisiklin (%100) ve seftiofur (%88,89) duyarlılığı yüksek bulundu. *M. haemolytica*

izolatlarının en az %44,44'ünde çoklu antibiyotik direncine rastlanıldı. Fenotipik olarak saptanan yaygın antibiyotik direncine paralel olarak ilgili antibiyotiklere dirençten sorumlu olan gen pozitiflikleri de yüksek belirlendi. *P. multocida* izolatları arasında %71,43 *AaDA25*, %42 *AaDB*, %42,86 *Tet H*, %85,71 *Sul 2*, %100 *blaOXA58* ve %100 *blaTEM* pozitifliği; *M. haemolytica* izolatları arasında %66,67 *AaDA25*, %77,78 *AaDB*, %77,78 *Sul 2*, %22,22, *blaOXA58* ve %100 *blaTEM* pozitifliği belirlendi. Ayrıca, her iki tür bakteri izolatları için çoklu antibiyotik direnç gen varlığı ve farklı direnç gen kombinasyonları belirlendi. 16S rRNA sekans analizi sonucu oluşturulan dendrogramda, *P. multocida* izolatları 2 ana küme içerisinde yer aldı. Monofiletik bir dağılım gösteren 4 sığır izolatu ile 1 koyun izolatından oluşan küme yüksek (%97) homolojiye sahipti. Dendrogramın diğer kümesini ise parafiletik görümlü 2 koyun izolatu oluşturdu. İki ana küme içerisinde yer alan *M. haemolytica* izolatları ise oldukça heterojen bir dağılım sergiledi. Dendrogramın birinci kümesinde yer alan 3 sığır ve 1 koyun izolatları ile ikinci kümesinde yer alan 2 sığır ve 3 koyun izolatının tümü parafiletik bir görünümdeydi. Büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinin yoğun bir şekilde yapıldığı Erzurum yöresinde, sığır ve koyun pnömonilerinde etiyolojik etken olarak *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın yaygınlığının saptanması, elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının ve mevcut antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi gibi lokal bakteri davranışlarının yanı sıra ve evrensel bakıda filogenetik pozisyonlarının belirlendiği bu çalışmaya ait verilerin pastörelloz hastalığının eradikasyonunda fayda sağlayacağı umulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, PZR, 16S rRNA sekanslama

## SUMMARY

### **ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* AND *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* FROM LUNGS OF CATTLE AND SHEEP WITH PNEUMONIA IN ERZURUM REGION (TÜRKİYE) AND DETERMINATION OF THEIR ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES AND POSSIBLE RESISTANCE GENES**

The pathogenic members of the heterogeneous *Pasteurellaceae* family are generally included in the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. Among these, *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* cause serious infections such as hemorrhagic septicemia, enzootic pneumonia and mastitis in cattle and sheep and cause significant economic losses such as animal mortality, yield losses and treatment-protection-control expenses. In this study, 100 cattle and 100 sheep pneumonic lung samples collected from slaughterhouses in Erzurum region (Türkiye) were analyzed for the presence of *Pasteurella* spp. by culture method. Identification of the isolates was performed by conventional methods, VITEK 2 Compact identification system and species-specific PZR. In addition, antibiotic susceptibilities of the isolates were determined phenotypically (VITEK 2 Compact system) and molecular bases (PZR). Identification and phylogenetic analysis of the isolates were confirmed by 16S rRNA sequencing. *Pasteurella* spp. culture positivity was obtained 8%. The species distribution was 7 for *P. multocida* and 9 for *M. haemolytica*. *P. multocida* positivity was 4% and *M. haemolytica* positivity was 5% in cattle, whereas, *P. multocida* positivity was 3% and *M. haemolytica* positivity was 4% in sheep. The diagnostic concordance of PCR with VITEK 2 Compact identification system was 100%. All *P. multocida* isolates were resistant to ampicillin, amoxicillin-clavulonic acid and trimethoprim-sulfamethoxazole, while ceftiofur (100%) and doxycycline (85.71%) susceptibilities were high. Multiple antibiotic resistance was found in at least 71.43% of *P. multocida* isolates. While all *M. haemolytica* isolates were resistant to ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole, all isolates had high susceptibility to amoxicillin-clavulonic acid (100%), doxycycline (100%) and ceftiofur (88.89%). Multiple antibiotic resistance was found in at least 44.44% of *M. haemolytica* isolates. In

parallel with the phenotypically widespread antibiotic resistance, gene positivity responsible for resistance to related antibiotics was also high. Among the *P. multocida* isolates, 71.43% *AaDA25*, 42% *AaDB*, 42.86% *Tet H*, 85.71% *Sul 2*, 100% *blaOXA58* and 100% *blaTEM* positivity was detected. Among the *M. haemolytica* isolates, 66.67% *AaDA25*, 77.78% *AaDB*, 77.78% *Sul 2*, 22.22% *blaOXA58* and 100% *blaTEM* positivity was detected. In addition, the presence of multiple antibiotic resistance genes and different resistance gene combinations were determined for both bacterial isolates. In the dendrogram generated by 16S rRNA gene sequencing, *P. multocida* isolates were included in 2 main clusters. The cluster consisting of 4 bovine isolates and 1 sheep isolate with a monophyletic distribution had a high homology (97%). The other cluster of the dendrogram consisted of 2 sheep isolates with paraphyletic appearance. *M. haemolytica* isolates in the two main clusters showed a very heterogeneous distribution. All 3 cattle and 1 sheep isolates in the first cluster of the dendrogram and 2 cattle and 3 sheep isolates in the second cluster had a paraphyletic appearance. It is hoped that the data of this study, which determined the local bacterial behaviors such as prevalence, antibiotic susceptibility and antibiotic resistance genes as well as the phylogenetic positions in the universal perspective of the *P. multocida* and *M. haemolytica* as the etiological agents of cattle and sheep pneumonia in Erzurum region, where cattle and sheep pneumonia are intensively farmed, will be useful in the eradication of the disease.

**Keywords:** *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, PCR, 16S rRNA sequencing

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>KISALTMALAR</b>	<b>I</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>II</b>
<b>RESİM LİSTESİ</b>	<b>III</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>IV</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> 'nın Genel Özellikleri	3
2.1.1 Tarihçe	3
2.1.2 Taksonomi ve Sınıflandırma	5
2.1.3 Morfolojik, Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri	6
2.1.3.1 Morfolojik Özellikleri	6
2.1.3.2 Kültürel Özellikleri	7
2.1.3.3 Biyokimyasal Özellikleri	8
2.1.4 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> 'nın Virülens Faktörleri	9
2.1.4.1 Kapsül	9
2.1.4.2 Lipopolisakkarit (LPS)	10
2.1.4.3 Fimbria	12
2.1.4.4 Dış Membran Proteinleri	12
2.1.4.5 Bakteri Toksinleri	13
2.1.4.6 Ekstrasellüler Enzimler	14
2.1.4.7 Bakteri Plazmidleri	14
2.2 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	14
2.3 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> Enfeksiyonlarının Patogenezi	15
2.4 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular	16
2.5 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i>	

Enfeksiyonlarının Teşhisi	18
2.5.1 Klinik Teşhis ve Ayırıcı Tanı	18
2.5.2 Laboratuvar Teşhisi	18
2.5.2.1 Konvansiyonel Teşhis	19
2.5.2.2 Serolojik Teşhis	20
2.5.2.3 Moleküler Teşhis	20
2.6 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i>	
Enfeksiyonlarının Sağaltımı	21
2.7 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i>	
Enfeksiyonlarında Korunma	22
<b>3. MATERYAL VE METOT</b>	<b>24</b>
3.1 Materyal	24
3.1.1 Çalışma İzni	24
3.1.2 Çalışma Alanı ve Materyali	24
3.1.2.1 Çalışma Alanı	24
3.1.2.2 Hayvan Kaynağı ve Çalışma Planı	25
3.1.3 Pnömonili Akciğer Örneklerinden Etken İzolasyonu ve İdentifikasyonu	
İçin Gerekli Materyaller	25
3.1.3.1 Besiyerleri	25
3.1.3.2 Çözelti ve Ayıraçlar	26
3.1.3.3 İdentifikasyon için Gerekli Malzemeler	26
3.1.3.4 Cihazlar	26
3.1.4 İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının	
Belirlenmesi için Gerekli Materyaller	28
3.1.5 Moleküler Analiz için Gerekli Materyaller	28
3.1.5.1 Tür Spesifik PZR Analizleri için Gerekli Malzemeler	28
3.1.5.2 Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR Analizleri	
için Gerekli Malzemeler	29
3.1.5.3 16S rRNA PZR Analizi için Gerekli Malzemeler	31
3.1.5.4 Sekans için Gerekli Materyaller	31
3.2 Metot	31
3.2.1 Örnekleme	31

3.2.2 Pnömonik Akciğerlerden Etken İzolasyonu ve İdentifikasyonu	32
3.2.2.1 Etken İzolasyonu	32
3.2.2.2 İzolatların İdentifikasyonu	33
3.2.3. <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testleri	33
3.2.4 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının PZR ile İdentifikasyonu	34
3.2.4.1 DNA Eldesi	34
3.2.4.2 Tür Spesifik PZR	35
3.2.4.3 Elektroforez	35
3.2.5 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR ile Tespiti	36
3.2.6 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının 16S rRNA PZR Analizi	37
3.2.7 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının 16S rRNA Sekans Analizi	38
3.2.8 İstatistiksel Analiz	39
<b>4. BULGULAR</b>	<b>40</b>
4.1 İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	40
4.2 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının PZR ile İdentifikasyon Bulguları	42
4.3 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları	43
4.4 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Genleri	48
4.5 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının 16S rRNA PZR Analiz Bulguları	51
4.6 <i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Mannheimia haemolytica</i> İzolatlarının 16S rRNA Sekans Analiz Bulguları	51
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>55</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>66</b>



**KISALTMALAR**

AGID: Agar jel immunodiffüzyon

CIE: Counter immunoelectrophoresis

CLSI: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EUCAST: Avrupa Birliği Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Dünya Tarım Örgütü)

IHA: İndirekt hemaglutinasyon

MLST: Multilokus sekans tiplendirme

NSAIDs: Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar

OMP: Dış membran proteinleri

PBS: Phosphate Buffered Saline

PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis

PMT: *P. multocida* toxin

RAPD: Random-amplified polymorphic DNA

REA: Restriction Endonuclease Analysis

## TABLO LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No:</u></b>
Tablo 1: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> 'nın biyokimyasal özellikleri	8
Tablo 2: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> 'nın virülens faktörleri	11
Tablo 3: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> 'nın neden olduğu hastalıklar	17
Tablo 4: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> 'nın identifikasyonunda kullanılan tür spesifik primerler	29
Tablo 5: Antibiyotik direnç genlerinin PZR analizi için kullanılan primerler	30
Tablo 6: 16S rRNA geninin amplifikasyonu için kullanılan primer çifti	31
Tablo 7: Akciğer örneklerinden izole edilen bakterilerin dağılımı	40
Tablo 8: <i>P. multocida</i> izolatına ait VITEK 2 Compact sistem biyokimyasal testleri	41
Tablo 9: <i>M. haemolytica</i> izolatına ait VITEK 2 Compact sistem biyokimyasal testleri	42
Tablo 10: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> izolatlarının AST-GN97 kartlı ile belirlenen MİK değerleri	44
Tablo 11: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> izolatlarının AST-GN97 kartlı ile belirlenen MİK değerlerinin EUCAST ve CLSI'ya göre yorumlanması	46
Tablo 12: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> izolatlarının antibiyotik direnç gen profilleri sonuçları	48
Tablo 13: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> izolatlarının NCBI erişim numaraları	52

**RESİM LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa No:</u></b>
Resim 1: Pnömonik akciğer örneklerinin kültürel analiz bulguları	41
Resim 2: <i>P. multocida</i> tür spesifik PZR'de elde edilen ampliconların agaroz jel görüntüleri	42
Resim 3: <i>M. haemolytica</i> tür spesifik PZR'de elde edilen ampliconların agaroz jel görüntüleri	43
Resim 4: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> izolatlarının antibiyotik direnç gen PZR analizlerine ait elektroforez	49
Resim 5: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> izolatlarının antibiyotik direnç gen PZR analizlerine ait elektroforez	50
Resim 6: <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> izolatlarının 16S rRNA PZR analizine ait ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	51

**ŞEKİL LİSTESİ**

- Şekil 1: *P. multocida* izolatlarının global suşlar ile karşılaştırma dendrogramı 53
- Şekil 2: *M. haemolytica* izolatlarının global suşlar ile karşılaştırma dendrogramı 54



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çiftlik hayvanlarında solunum sistemi enfeksiyonları her yaş döneminde ortaya çıkabilen ve yüksek morbidite ve mortalite ile hayvan yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan hastalıklara sebep olmaktadır. Solunum sistemi enfeksiyonlarının ortaya çıkışında; kalabalık yetiştiricilik, hayvan hareketleri, iklim koşulları, bakım ve besleme hataları gibi çeşitli predispoze faktörlerin yanı sıra bakteriyel, viral, mikotik ve paraziter enfeksiyöz etkenler de etkili olmaktadır. Çiftlik hayvanlarında rinit, laringit, trakeit, bronkopnömoni ve pnömoni gibi solunum sistemi enfeksiyonlarının ortaya çıkışında; *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* ve *Mycoplasma* spp. gibi bakteriyel etkenler ön plana çıkmaktadır. Bu etkenler içerisinde özellikle *Pasteurella* türleri sığır ve koyunlarda pastörelloz ve hemorajik septisemi gibi enfeksiyöz hastalıklara neden olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Radostitis ve ark. 1995, Karahan ve ark. 2010).

Pastörelloz, çiftlik, evcil ve vahşi hayvanların bulaşıcı bir hastalığıdır. Akut olgularda septisemi, krupöz yangı, pulmoner ödem ve plörezi ve kronik olgularda ise nekrotizan pnömoni, artrit, mastit, keratokonjonktivit, endometrit ve bazen enterite neden olmaktadır. Uzun bir süre *Pasteurella multocida* ve *P. haemolytica* hastalığın patojenleri olup daha sonra, *Mannheimia* spp.'nin ayrı bir grup olarak yeniden sınıflandırılması nedeniyle yeni bir nozoloji Mannheimiyoz'u ayırt etme gerekliliği ortaya çıkmıştır. Mannheimiyoz, bir patojen olan *M. haemolytica*'nın neden olduğu, çoğunlukla geviş getiren hayvanlarda görülen pastörelloz benzeri bulaşıcı bir hastalık olup solunum sisteminde hemorajik ve yaygın bir hasara neden olmaktadır (Laishevtsev 2020).

Bu çalışmada, Erzurum ili mezbahanelerinde kesilen pnömonili 100 sığır ve 100 koyun akciğer materyali *P. multocida* ve *M. haemolytica* etkenlerinin kültürel yöntemlerle araştırılması hedeflendi. Elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, antibiyotik direnci sergileyen izolatların olası ve yaygın

direnç genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespiti ve izole edilen suşların 16S rRNA sekans tabanlı filogenetik pozisyonlandırılması amaçlandı.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica*'nın Genel Özellikleri

#### 2.1.1 Tarihçe

*Pasteurella* etkenleri ilk olarak 1880'li yıllarda kanatlı kolerası, sığır ve diğer hayvanların hemorajik septisemisi ile ilişkilendirilerek tanımlanmıştır (Mutters ve ark. 1985). *P. multocida*'nın kanatlı hayvanlarda koleraya neden olduğu ilk kez 1881'de Louis Pasteur tarafından bildirilmiştir. O zamandan beri, bu Gram-negatif bakteri, çok çeşitli konakçılarda ekonomik açıdan önemli diğer birçok hastalığın yapıcı etkeni olarak tanımlanmıştır (Harper ve ark. 2006). Pasteur, tavuk kolerası etkeni olan *P. multocida*'nın seri pasajlarla attenuasyonunu gerçekleştirmiştir (Mutter ve ark. 1989, Kubatzky 2012).

Kitt, etiyolojik etkenin ilk defa 1885'de kültürünü hazırlamıştır (Mutters ve ark. 1985). Bu bakterilerin ilk isimlendirilmesinde *Micrococcus gallicidus* adı kullanılmıştır (Burrill 1883). Daha sonra bu bakteri, "Bacterium", "Octopsis", "Coccobacillus" ve "Eucystia" gibi çeşitli cinslere atanmıştır (Trevisan 1885, Kitt 1885, Gamaleia 1888, Ferry ve ark. 1920). Trevisan, 1887 'de, Pasteur'un çalıştığı bu bakteri cinsinin bilimsel adını *Pasteurella* olarak önermiştir (Trevisan 1887). Takip eden yıllarda, çeşitli tür adlarına sahip birçok mikroorganizma, bipolar boyanma özelliği veya izole edildiği konakçı türüne göre *Pasteurella* cinsine dahil edilmiştir (Hussaini 1975). 1893 yılında Kitt'in ilk kullandığı *Bacterium bipolare multocidum* kombinasyonuna 1899 yılında Lehman ve Neumann *Bacterium multocidum*; 1939 yılında Rosenbusch ve Merchant ise *multocida* ifadesini kullanmıştır (Kitt 1893, Rosenbusch ve Merchant 1939). *P. multocida*'nın ilk adlandırılması 1883 yılında Burrill tarafından "*Micrococcus gallicidus*" olarak gerçekleştirilmiştir. Etken, sırasıyla 1887 yılında Trevisan tarafından "*Pasteurella cholerae-gallinarum*", 1889 yılında Lehmann ve Neumann tarafından "*Bacterium multocidum*", 1893 yılında Kitt tarafından "*Bacterium bipolare multocidum*" ve 1939 yılında Rosenbusch ve Merchant tarafından *P. multocida* şeklinde adlandırılmıştır. Burrill tarafından 1883'te kullanılan "gallicida" sıfatı öncelikli gibi görünse de *P. multocida*'nın en uygun isim olarak kalması önerilmiştir (Burrill 1883, Sneath 1982). Türlerin izole edildiği hayvanlara

göre adlandırılması 1929 yılında Topley ve Wilson tarafından *Pasteurella* olarak kullanılması ile son bulmuştur (Topley ve Wilson 1929).

*Pasteurella* cinsinde 1932 yılına kadar sadece *P. multocida* türü bulunmaktaydı. Daha sonra bu cinse Newsom ve Cross (1932) tarafından, sığır ve koyunlarda saptanan *M. haemolytica* dahil edildi. Sonraki yıllarda *Pasteurella* cinsine *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella urea* ve *Pasteurella aerogenes* türleri ilave edildi (Rosenbusch ve Merchant 1939, Sneath 1982, Mutters ve ark. 1985). Müteakip yıllarda *Pasteurella* cinsi, Newsom ve Cross tarafından *Pasteurella haemolytica*, Jawetz tarafından *Pasteurella pneumotropica*, McAllister ve Carter tarafından *Pasteurella ureae* ve *Pasteurella aerogenes*'i içerecek şekilde genişletilmiştir (Mc Allister ve Carter 1974).

Bununla birlikte, *Pasteurella* cinsinin üyeleri ile *Actinobacillus* cinsinin üyeleri arasında ayırım yapmanın zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Birçok araştırmacı, bu iki cins arasındaki fenotipik farklılaşma sorunlarını ele almıştır (Mutters ve ark. 1985). 1920'lere kadar insan enfeksiyonların da belirlenen ve izole edilen bu mikroorganizmalar birbirlerine benzer nitelikte değildir (Regamey 1939, Teissier ve ark. 1922).

Kapsüler serotiplendirme ile 1962'de 17 serogrup belirlenmiştir (Biberstein ve ark. 1960, Angen ve ark. 1999). Bu mikroorganizmanın *Actinobacillus* cinsine fenotipik benzerliği nedeniyle "*Actinobacillus haemolyticus*" olarak adlandırmıştır (Mraz 1969).

*P. haemolytica*, 1985 yılında, DNA-DNA hibridizasyon verilerine dayalı olarak *Pasteurella* cinsinden çıkarılmıştır (Mutters ve ark. 1985). *P. haemolytica* arabinoz veya trehalozu fermente etmesiyle A ve T olmak üzere iki biyotipe bölünmüştür (Smith 1959). DNA-DNA hibridizasyonu, 16S rRNA dizilemesi ve biyokimyasal tiplendirmenin bir kombinasyonu kullanılarak, biyotip A mikroorganizmalarından 12 tanesi (serotip A1, A2, A5-9, A12-14, 16 ve A17) *M. haemolytica* olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Bu suşların hiçbiri L-arabinozu fermente edememektedir (Angen ve ark. 1999). Bu özellik, *M. haemolytica*'yı,

*Pasteurella sensu stricto*'dan ayırmakta olup *Mannheimia* cinsini, en yakın akrabaları olan *Pasteurella trehalosi*, *Actinobacillus capsulatus* ve *Haemophilus parainfluenzae* olan *Proteobacteria*'nın gama alt bölümü içinde filogenetik ağacın bir dalına yerleştirmiştir (Highlander 2001).

### 2.1.2 Taksonomi ve Sınıflandırma

*Pasteurella* etkenleri, Gammaproteobacteria sınıfı, Pasteurellales takımı, *Pasteurellaceae* ailesi içerisinde yer alan bakterilerdir. Son yıllarda sekans analizleri ve moleküler tekniklerin yaygınlaşması ile bu aile içerisinde birçok cins tanımlanmıştır (Christensen ve Bisgaard 2004, Catry ve ark. 2007). Güncel olarak *Pasteurellacea* ailesi içerisinde 27 bakteri cinsi bulunmaktadır. Bunlar arasında veteriner hekimlik alanında önemli hastalıklara yol açan *Actinobacillus*, *Avibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Mannheimia*, *Pasteurella* ve *Bibersteinia* gibi cinsler ve bu bakteri cinslerine ait çok sayıda tür bulunmaktadır (Quinn ve ark. 2011, Olsen ve ark. 2015).

*P. multocida*, *P. sensu stricto* kompleksi içerisinde yer alır. Bu kompleksin en patojen üyesidir. Bu kompleks içerisinde *P. canis*, *P. stomatis* ve *P. dagmatis* gibi türler de yer alır (Markey ve ark. 2013). *P. multocida*, birçok alt tip barındırmaktadır. Bunlar daha çok antijenik yapı farklılıklarına göre ortaya çıkan serotiplerdir. İlk defa Cornelius tarafından 1929 yılında yapılan tiplendirmede *P. multocida* için I, II, III, IV serotip belirlenmiştir. Roberts, 1947 yılında, pasif fare koruma testi ile I, II, III, IV serotiplerini belirlemiştir. Sonrasında, Hudson tarafından bu serotiplere serotip V ilave edilmiştir (De Alwis 1999). *P. multocida*'nın kapsül antijenik özelliği esas alınarak 5 serogrup (A, B, D, E ve F) belirlenmiştir (Carter 1955, Boyce ve ark. 2000a, b). Ayrıca LPS antijenlerine göre 16 serotip (1-16) bildirilmiştir (Heddleston ve ark. 1972, Rimler ve ark. 1984).

*P. multocida* metabolik aktivite ve genetik altyapısına göre de alt türlere ayrılmıştır. DNA hibridizasyonu ile *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica* ve *P. multocida* subsp. *gallicida* olmak üzere 3 alt türe ayrılmıştır (Mutters ve ark. 1985). Bisgaard ve ark. (1991), *P. multocida*'yı dulcitol, sorbitol ve

trehaloz fermentasyon yeteneklerine göre *P. multocida* subsp. *multocida* (dulcitol negatif, sorbitol ve trehaloz pozitif); *P. multocida* subsp. *septica* (dulcitol ve sorbitol negatif, trehaloz pozitif) ve *P. multocida* subsp. *gallicida* (dulcitol ve sorbitol pozitif, trehaloz negatif) olarak tiplendirmiştir.

*Mannheimia* cinsi içerisinde birçok tür yer almaktadır (NCBI Taxonomy 2020). Bunlardan en önemlisi ruminantların solunum sistemi enfeksiyonlarına yol açan *M. haemolytica*'dır. Bu bakteri cinsinin diğer üyeleri ise *M. glucosida*, *M. varigena*, *M. granulomatis* ve *M. ruminalis*'dir (Angen ve ark. 1999). *Mannheimia* cinsine Christensen ve ark. (2011) tarafından *M. caviae* ve Hadjadj ve ark. (2015) tarafından *M. massilioguelmeansis* adlı iki yeni tür daha eklenmiştir.

*M. haemolytica*'nın kapsüler antijen yapıları ve DNA-DNA hibridizasyon teknikleri ile 12 serotipi (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16, 17) saptanmıştır. Bunlardan serotip 11, *M. glucosida* olarak yeniden adlandırılmıştır (Younan 1995, Angen ve ark. 1999, Omaleki 2012).

### **2.1.3 Morfolojik, Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri**

#### **2.1.3.1 Morfolojik Özellikleri**

*Pasteurellaceae* ailesine ait mikroorganizmalar sporsuz, hareketsiz, Gram negatif bakterilerdir. Bunlar içerisinde *P. multocida*, 0.2 x 1-2 µm boyutunda, küçük çomak ya da kokobasil şekilli bakteridir (Quinn ve ark. 2011, Markey ve ark. 2013). *M. haemolytica* ise 0.5 × 1.2 µm boyutunda, kapsüllü, çomak ya da kokobasil şekilli bir bakteridir. Her iki tür de dokudan hazırlanan preparatlarda Giemsa ile boyandığı zaman bipolar boyanma özelliği göstermektedir (Quinn ve ark. 2002, Mutter ve ark. 2015, Nefenchenko ve ark. 2019).

### 2.1.3.2 Kültürel Özellikleri

*Pasteurella* türleri, aerobik veya fakültatif anaerobik bakterilerdir. Kan veya serum ilaveli besiyerinde oldukça iyi ürerler. Çeşitli örneklerden etken izolasyonunda nutrient agar, çikolata agar ve kanlı agar gibi besiyerleri tercih edilmektedir (Dziva ve ark. 2008). *P. multocida*, bu besiyerlerinde optimum 37 °C'de 7.2-7.8 pH'da ve 24-48 saat arası sürede üreyebilmektedir (Markey ve ark. 2004, Aydın 2006). Besiyerlerine %10 koyun kanı, dekstroz, thalium asetat, siklohekzimit, kristal violet ve nişasta ilavesi özellikle sindirim sisteminden *Pasteurella* türlerinin izolasyonunu kolaylaştırmaktadır (Lee ve ark. 2000). Safra tuzları hassasiyeti nedeniyle *Pasteurella* etkenleri MacConkey agarda ürememektedir (Kalhoru ve ark. 2015).

*P. multocida*, katı besiyerlerinde mukoid (M), smooth (S), iridesans (I) ve rough (R) olmak üzere 4 farklı koloni oluşturur (Garrity ve ark. 2004, Quinn ve ark. 2004, Aydın 2006). M koloni, kapsüllü suşlardan ibaret olup daha çok kronik olgulardan izole edilmektedir. Bu koloniler katı besiyerinde parlak düzenli, yuvarlak ve yapışkan karakterdedir. S koloni, M koloniye benzer şekilde düzgün ve parlak koloniler olup daha çok akut olgulardan elde edilmektedir. I koloni formu da gerek yapısı gerekse bulunuşu yönünden S koloniye benzemektedir. R koloni, kapsülsüz, zayıf patojen veya apotojen suşlar tarafından oluşturulur (Carter 1962, Bisping ve Amtsberg 1995, Aydın 2006).

*M. haemolytica*, fakültatif anaerobik veya mikroaerofilik (%5-10 CO<sub>2</sub>) üreme özelliğine sahiptir. Etken, 37 °C'de ve kan veya serum ilaveli besiyerlerinde rahat ürer (Quinn ve ark. 2002, Mutter ve ark. 2015, Nefedchenko 2019). Neomisin, novobiosin ve aktidione ilavesinin besiyerine selektivite kazandıracığı bildirilmiştir (Morris 1958). %5-7 defibrine kan eklenmiş besiyerinde 24-48 saatlik inkübasyon sonrası 1-2 mm çapında S koloniler oluşturmaktadır (Mutter ve ark. 2015). Etken, sıvı besiyerinde bulanıklık ve dipte tortu oluşturur. *M. haemolytica*'nın geneli kanlı agarda hemoliz oluşturur (Tomassini ve ark. 2009, Taunde ve ark. 2019).

### 2.1.3.3 Biyokimyasal Özellikleri

*P. multocida*, metabolik olarak aktif bir mikroorganizmadır. Oksidaz, katalaz ve glukoz reaksiyonları pozitif olup, laktoz, maltoz, dulsit ve arabinoz etkinlikleri farklılık gösterir. Nitratları nitrite indirgeyen etkenler indol pozitifdir.  $\beta$ -galaktosidaz, Voges Proskauer ve Metil kırmızısı reaksiyonları negatiftir. Üreaz negatif olan bu etkenler, ornitin dekarboksilaz pozitifdir. D-trehaloz, D-ksiloz ve L-arabinoz özellikleri farklılık gösterir (Markey ve ark. 2004, Aydın 2006) (Tablo 1).

*M. haemolytica*, oksidaz ve katalaz pozitif bir bakteridir. D-sorbitol, D-ksiloz, D-mannitol, maltoz ve dekstrini fermente ederler. Glukoz, laktoz ve sükroz pozitif olan etkenler H<sub>2</sub>S oluşturmazlar. Alkalın fosfataz pozitif olup nitratı indirgerler. Ornitin dekarboksilaz, L-arabinoz,  $\beta$ -glukosidaz ve üreaz reaksiyonları negatiftir (Quinn 2002, Mutter ve ark. 2015, Nefedchenko ve ark.2019) (Tablo 1).

Tablo 1: *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın biyokimyasal özellikleri (Quinn 2002, Mutter ve ark. 2015, Nefedchenko ve ark. 2019).

<b>Biyokimyasal Testler</b>	<b><i>M. haemolytica</i></b>	<b><i>P. multocida</i></b>
Hemoliz	+	-
MacConkey Agarda üreme	+	-
Katalaz	+	+
Oksidaz	+	+
İndol	-	+
Üreaz	-	-
Laktoz	+	-
Sükroz	+	+
Glukoz	+	+
Maltoz	+	-
Mannoz	+	-
Arabinoz	+	+
Mannitol	+	+
Trehaloz	-	-

## 2.1.4 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica*'nın Virülens Faktörleri

### 2.1.4.1 Kapsül

Bakteri kapsülü, polisakkarit yapıda olup etkenin nötrofil fagositozu ve komplement aracılı lizisine karşı koymada fonksiyon gören yapıdır (De Angelis ve Padgett-McCue 2000, Harper ve ark. 2007). *P. multocida*, kapsüllü bir bakteri olup kapsül özelliğine göre serolojik yöntemlerle A, B, D, E ve F olarak adlandırılan beş grupta sınıflandırır (Harper ve ark. 2006). *P. multocida* serotipleri A, D ve F'de bulunan kapsüller materyalin bileşimi ve yapısı, memeli glikozaminoglikanlarına çok benzer ve esas olarak sırasıyla hyaluronan, heparosan ve sülfatlanmamış kondroitinden oluşur (Pandit ve Smith 1993, Rimler 1994, De Angelis 1996, DeAngelis ve Padgett-McCue 2000). Bu kapsüller tiplerin sentezi ve taşınması için gerekli olan genler, genom üzerinde tek bir bölge içinde kodlanmıştır (Townsend ve ark. 2001). Bununla birlikte, son zamanlarda, A, D ve F tipi suşlarda, bilinen kapsül biyosentez bölgesinin dışında bir heparosan sentezi kodlayan ek bir gen tanımlanmıştır. *HssB* (eski adıyla *pgla*) olarak yeniden adlandırılan bu gen tarafından kodlanan sentez, kapsül operonu içindeki sentezden 10 kat daha az kopyalanır, farklı bir alıcı kullanır ve daha küçük moleküler ağırlıklı polimer ürünlerine yol açar. Bu genin ekspresyonunun kapsüller varyasyona yol açabileceği öne sürülmüştür (Deangelis ve White 2004).

Genel olarak, kapsüle sahip suşlar kapsülsüz olanlardan daha patojendir (Heddleston ve ark. 1964, Snipes ve ark. 1987, Tsuji ve Matsumoto 1989). Kapsülün *P. multocida* patogenezindeki önemli rolü, genetik olarak açıkça gösterilmiştir (Boyce ve Adler 2000a, b, Chung ve ark. 2001). A serogrup akapsüller mutantın tavuklarda avirüalent olduğu ve tavuk kasında üremediği gösterilmiştir (Chung ve ark. 2001). İlginç bir şekilde, kalıcı olmamasına rağmen, tavukların bu akapsüller mutantın yüksek dozları ile aşılınması, koruyucu bağışıklığı uyarmıştır (Chung ve ark. 2005). Kapsüller yapıya bağlı enfeksiyon olguları ile ilgili olarak, Tip A ve tip D kanatlılarda kolera,

Tip F kanatlılarda ve buzağılarda fibrinli peritonit olgularından sıklıkla izole edilen suşlarda bildirilmiştir. Tip D kapsüllü suşlar domuzlarda atrofik rinit ve tip A pnömoni olgularından tanımlanmıştır. Tip B ve Tip E kapsüler suşlar ise daha çok tropik bölgelerde sığır ve bufalolarda hemorajik septisemiden sorumlu etkenlerdir. Tip A kapsül yapısına sahip suşlar sığırların solunum sistemi enfeksiyonlarının primer etkenidir (Dabo ve ark. 2008).

*M. haemolytica*'nın kapsülü polisakkarit yapıda olup,  $\beta$ -1-4 bağı ile bağı N-asetilmannozaminüronik asit ve N-asetilmannozamin'in oluşturduğu tekrarlı disakkarit yapıdan ibarettir (Adamu 2007). Etkenin solunum sistemine kolonizasyonunu kolaylaştırmasının yanı sıra antifagositik özelliği ve komplement lizisini engellenmesiyle bakteriye yaşama imkânı sunar (Lo ve ark. 2001b, Yavrucu 2008). Kapsüler antijenik yapısına göre *M. haemolytica*'nın 12 serotipi (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 ve A17) bildirilmiştir. Serotip A1, A2 ve A6, sığır ve koyunlarda üst solunum yolları enfeksiyonların da yaygın olarak bulunur (Al-Ghamdi ve ark. 2000, Hauglund ve ark. 2015, Klima ve ark. 2017). Bu serotipler ayrıca sağlıklı hayvanlarda da bildirilmiştir. Serotip A7, A9 ve A12'nin neden olduğu vakalar bildirilse de sığırların solunum yolu hastalıklarında serotip A1 ve A6 en önemli serotipler olarak kabul edilmektedir (Yavrucu 2008, Klima ve ark. 2017, Garcia-Alvarez ve ark. 2018). Koyunlardaki yaygın serotip A2'dir. Ayrıca, bu hayvanlarda A5, A6 ve A7 serotiplerine bağı enfeksiyonlar da bildirilmiştir (Rice ve ark. 2008).

#### 2.1.4.2 Lipopolisakkarit (LPS)

*P. multocida*'nın lipopolisakkarit (LPS) yapısı, hastalığın patogenezinde kritik bir rol oynar. LPS, hümmoral bağıışıklığı uyarır, ayrıca koruyucu bir antijen olarak kabul edilir (Wijewardana ve ark. 1990). *P. multocida* suşları arasında 16 farklı somatik serotipin (1-16) ortaya çıkmasında etkilidir ve üç önemli kısımdan oluşur. Lipid A, merkez polisakkarit ve O spesifik oligosakkaritten oluşan LPS, *Pasteurella* türlerinde tekrarlı "O" antijeninden yoksun olduğu için rough karakterindedir (Boyce ve ark. 2010, Harper ve ark. 2011).

Tablo2: *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın ana virülans faktörleri (Markey ve ark. 2013).

Bakteri	Virülans belirleyicileri	Fonksiyonlar
<i>P. multocida</i>	PMT toksin (serotip A ve D)	Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini uyaran sitotoksik protein
	DnaK, DnaJ, DjlA, HscA, HscB, HtrA, GrpE, HslV, HslU, GroES, GroEL	Isı şok proteinleri
	Kapsüler polisakkarit	Fagositozu önleme, komplemente direnç, adezyon
	SodA, SodC, Tpx, HktE, TsaA, ThdF D	Detoksifikasyon
	Demir alım sistemi genleri tonB, exbD ve exbB, HemB, HemE, HemH, HemL, HemU, Fur, RsgA1, RsgA2	Demir alımı
	SurA, SurE	Sabit faz hayatta kalma
	Filamentöz hemaglutininler (PfhB1 ve PfhB2), yüzey fibrinleri (Hsf_1 ve Hfs_2), ve firin altüniteleri (PtfA, FimA, Flp_1, Flp_2)	Konak hücrelere yapışma, kemotaksis
<i>M. haemolytica</i>	LPS	Endotoksik aktivite, salınımını uyarır, proinflamatuvar sitokinler, mikrovasküler nekroz ve tromboz
	Lökotoksin (gözenek oluşturan sitolizin)	Lökositler için sitotoksik
	Kapsül	Fagositozu önleyen, hücre yüzeyini maskeleyen, tamamlayıcıya direnç, bağlılık
	Fibrin	Yapışma
	Siderofor	Demir alımı
	Nöraminidaz	Siyalik asit kalıntılarının konaktan uzaklaştırılması glikoproteinler, böylece yapışmayı teşvik eder
	Metalo-endopeptidaz (sialoglikoproteaz)	Sialoglikoproteinin parçalanması epitel hücrelerinin, makrofajların veya lökositlerin
	Süperoksit dismutaz (metallo-enzim)	Serbest radikallerin detoksifikasyonu

*M. haemolytica*'nın LPS'si, polisakkarid yan zincir (O antijen), lipid A ve oligosakkarit yapıdan oluşur. *M. haemolytica* rough (çekirdek oligosakkarit ve Lipid A) ve smooth (çekirdek oligosakkarit, Lipid A ve O antijen) yapılı LPS'ye sahiptir (Adamu 2007). LPS, hücre lizisi, koagülasyon, sitokin sentezinde artış ve lökosit infiltrasyonuna yol açarak yangıyı kuvvetlendirir (Highlander 2001, Singh ve ark. 2011).

#### 2.1.4.3 Fimbria

Fimbria ya da pilus bakterinin konak hücre yüzeyine tutunmasını sağlayan yapıdır. *Pasteurellaceae* ailesi içerisinde ototransporter protein (tip V protein), Flp pilus ve tip IV pilus olmak üzere üç tür fimbria bulunur (Kuhnert ve Christensen 2008). Tip IV fimbrialar, *P. multocida*'nın bazı serogruplarının önemli virülens faktörleridir (Ruffolo ve ark. 1997, Doughty ve ark. 2000).

*M. haemolytica* fimbriaları, konakçının nazofarinks ve tonsillerine kolonizasyonunu sağlamaktadır (Adamu 2007). *P. multocida*'da olduğu gibi tip IV piluslar virülenste önemli rol oynar. Bu pilus adhezyon dışında bakterinin hareketi ve DNA aktarımında da rol oynar (Hounscome 2012).

#### 2.1.4.4 Dış Membran Proteinleri

Bakteri dış membran proteinleri (OMP) konak savunmasında antikor yanıtına neden olan koruyucu antijen özellikli yapılardır (Adamu 2007). Bu yapıların ayrıca bakteri adezyonunda rol aldıkları da bilinmektedir. OMP'ler çok sayıda protein içeren kompleks yapılardır (Lin ve ark. 2002, Hatfaludi ve ark. 2010).

*P. multocida*'nın 27 kDa, 37,5 kDa, 49,5 kDa, 58,7 kDa, 64,4 kDa ağırlığındaki OMP'leri immunité açısından çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bunlardan özellikle 37,5 kDa ağırlığındaki protein immunojenik olup aşı çalışmalarında kullanılmıştır (Vasfi Marandi ve Mittal 1997, Luo ve ark. 1999).

Koruyucu bağıklık sağlayacak yetenekte olan diğer bir yapı OmpH'dır ve aşı denemelerinde kullanılmıştır (Luo ve ark. 1997). Diğer bir yapı olan OmpA, *P. multocida*'nın konak hücrelerine adezyonunu sağlar (Dabo ve ark. 2003, Hatfaludi ve ark. 2010).

*P. multocida* suşlarında, bakteri üremesi için elzem olan demiri bağlamak amacıyla TbpA ve TbpB protein reseptörleri de bulunmaktadır (Gray Owen ve Schryvers 1996). Sığır ve koyunlarda TbpA proteini demir alımını kolaylaştırarak bakterinin enfeksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Fuller ve ark. 2000, Bosch ve ark. 2002b).

*M. haemolytica*'nın patogenezinde rol oynayan lipoprotein yapılı 5 OMP bildirilmiştir (Highlander 2001). Bunlardan üçü *plpABC* operonunun kontrolü altındadır. *PlpA* bakterinin epitelyal hücrelere bağlanmasında görev alır (Kisiela ve Czuprynski 2009). *plpABC* operonunun haricinde *plpD* geni 31 kDa'luk lipoproteini sentezler. *plpE* geni ise 45 kDa'luk bir OMP'nin üretiminden sorumludur (Hounscome 2012). Bunların dışında *M. haemolytica* enfeksiyonlarında koruyucu bağıklık oluşturabilecek antikor yanıtına yol açan gs60 OMP'si bildirilmiştir (Lee 2008, Hounscome 2012, El Dokmak ve ark. 2015). Etkenin, serotip spesifik antijen 1 olarak bilinen ve hücre adezyonunda görev alan başka bir OMP'si de bildirilmiştir (Lo ve ark. 1991). Ayrıca, *M. haemolytica* demir bağlayan OMP'lere de sahiptir (Adamu 2007).

#### 2.1.4.5 Bakteri Toksinleri

Toksinler, tip D ve bazı tip A kapsüle sahip *P. multocida* suşları tarafından üretilen yapılardır. Bu toksinler domuzlarda atrofik rinit, sığır akciğerlerinde sitotoksisite, farelerde mukoid ishal ve dalak atrofisi, domuz, sığan ve tavşanlarda nazal konka atrofisine neden olmaktadır (Pullinger ve ark. 2004, Wilson ve Ho 2005).

*M. haemolytica*'nın en önemli toksinleri lökotoksinlerdir ve bunlar ruminantlarda pnömonik lezyonların gelişimine neden olurlar (Shewen ve Wilkie 1988, Rice ve ark. 2008, Singh ve ark. 2011). Lökotoksinler, por oluşturarak alveolar makrofaj, lökosit ve monositlerin lizisine yol açar (Yavrucu 2008). Bu toksinlere karşı salgılanan sitokinler ile doku hasarı şekillenir ve alveollerde nekroz meydana gelir. Ayrıca, lökotoksinler trombositleri lize ederek trombus oluşturur (Mohamed ve Abdelsalam 2008, Yavrucu 2008).

#### **2.1.4.6 Ekstrasellüler Enzimler**

*P. multocida* enfeksiyonlarının patogeneğinde rol alan önemli enzimatik yapılar lipaz (Pratt ve ark. 2000) ve hyaluronidaz enzimleridir (Carter ve Chengappa 1980, Rimler ve Rhoades 1994). Bunların haricinde, nörominidaz ve sialik asit enzimleride (sialidaz) bulunmaktadır (Mizan ve ark. 2000).

*M. haemolytica*'nın ekstrasellüler enzimleri arasında yer alan nörominidaz konak mukozasına kolonizasyonda görev alır (Adamu 2007, Hounscome 2012). Glikoproteaz enzimi, mukozal sialoglikoproteinleri yıkımlar ve IgG1'i hidrolize eder (Mohamed ve Abdelsalam 2008, Singh ve ark. 2011).

#### **2.1.4.7 Bakteri Plazmidleri**

*Pasteurella* türleri arasında yaygınlıkları ve boyutları farklı olan birçok plazmid bildirilmiştir (Hunt ve ark. 2000). Bu plazmidlerin toksin üretimi ve antibiyotik direncine neden olduğu ve bakteriyel mutasyonlarda rol oynadığı bildirilmiştir (Garrity ve ark. 2004).

## **2.2 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi**

*P. multocida* ve *M. haemolytica* hem küresel yaygınlığı hem de geniş konak çeşitliliği ile ruminantların önemli patojenleridir (Aydın 2006). Her iki etken de

sağlıklı hayvanların üst solunum yollarında ve yutaklarında fakültatif olarak yer almaktadır. Dışarıdan fazla miktarda alındığında veya hayvanlarda bağışıklığın zayıfladığı durumlarda bu etkenler hastalığa yol açmaktadır (Bisping ve Amtsberg 1995, Quinn ve ark. 2004).

*P. multocida* ve *M. haemolytica* türleri farklı çevresel ortamlarda bulunabilmekte coğrafi bölge, iklim ve çeşitli stres faktörlerine bağlı olarak enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Kumar ve ark. 2015). Enfeksiyonları genellikle bahar aylarında meralarda ve kapalı işletmelerde yoğun bir şekilde barındırılan hayvanlarda yaygındır. Enfeksiyonlar, soğuk ve rutubetli alanlarda, uzun süren hayvan transportunda, bakım ve beslemenin yetersizliğinde ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyonlar büyük ve küçük ruminantlar arasında çoğunlukla sporadik seyretmekle beraber enzootik boyuta da ulaşabilmektedir. Enfeksiyonlar, bu hayvanlarda her iki cinsiyeti ve tüm yaş gruplarını etkilemektedir. Enfeksiyöz etkenlerin bulaşı daha çok solunum sistemi, sindirim sistemi ve deri yoluyla gerçekleşmektedir (Aydın 2006).

### **2.3 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* Enfeksiyonlarının Patogenezi**

*Pasteurella* ve *Mannheimia* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar endojen veya ekzojen kaynaklı olabilir. Etkenin giriş yeri genellikle solunum sistemi olup pnömonik pastörellozda olduğu gibi virülans hayvandan hayvana bulaşma ile artabilmektedir. Üst solunum yollarının doğal florasında da yer alan *Pasteurella* türleri, özellikle immun sistemi baskılanan hayvanlarda çoğalma, patojenite kazanma ve dokulara yayılma imkânı bularak enfeksiyonlara yol açar (Quinn ve ark. 2011). Solunum sisteminin siliar yapısına ait hücre hareketleri ve ürettiği mukus salgısı ile kommensal etkenler rumene doğru hareket ettirilerek mide asidi ile inaktif hale getirilir. Fakat çeşitli predizpoze faktörler nedeniyle bu eliminasyon mekanizması bozulduğunda enfeksiyon riski artar. Bakteri, OMP ve yüzey lipoproteinleri sayesinde akciğerlerde bronş epitellerine kolonize olur. Kapsülün antifagositik özelliği sayesinde nötrofil ve makrofaj fagositozundan kurtularak, nazo-farinksden akciğere geçer ve pnömoni oluşturur (Ahmet 2003, Yavrucu 2008).

*P. multocida* enfeksiyonlarında patolojik tablolar, inkübasyon süresine göre değişir. Hastalık yalın bir bronkopnömoni ile seyredildiği gibi (Mathy ve ark. 2002; Ewers ve ark. 2006), akut fibrinosupuratif (Gagea ve ark. 2006), fibrinli ve fibrinopurulent (Dungworth 1985), supuratif ve fibrinonekrotik (Tegtmeier ve ark. 1999) lezyonlarla da seyredilmektedir.

*M. haemolytica* enfeksiyonları akut kranio-ventral fibrinöz ve fibrinopurulent plöra pnömoni tablosu ile seyretmektedir (Confer 2009). Makroskopik bakıda akciğerlerin kesit yüzeyi mermerimsi yapıdadır. Akciğer loblarında hemoraji ve koagülasyon nekrozu ile birlikte gri-kırmızı renkte bir görüntü mevcuttur. İnterlobuler septumda genellikle fibrinden zengin ödem mevcuttur. Histolojik bakıda, alveollerde nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu ve fibrinli eksudat birikimi vardır (Aitken 2007, Rice ve ark. 2008).

#### **2.4 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular**

*Pasteurella* türleri, koyun, sığır, domuz, kanatlı hayvanlar, lagomorflar ve yabani hayvanlar gibi çok çeşitli hayvan türlerinde hastalığa neden olabilmektedir. *M. haemolytica*'ya kıyasla *P. multocida* çok daha fazla konağa adaptasyonu ile daha avantajlı gözükmektedir. *Pasteurella* spp. enfeksiyonları arasında kanatlılarda kolera, sığırlarda hemorajik septisemi ve enzootik pnömoni, domuzlarda atrofik riniti gibi ekonomik açıdan önemli hastalıklar sayılabilir (De Alwis 1992).

*P. multocida* kapsüller antijen tipine göre sahip olduğu serotiplerle sığır ve koyunlarda farklı klinik tablolara yol açabilmektedir. Tip A, sığırlarda uzun süreli transportlar sonrası hayvanlarda ortaya çıkarak seyahat ateşi (shipping fever) ve enzootik pnömoni ve mastitise yol açmaktadır (Okay 2011, Markey ve ark. 2013). Koyunlarda ise plörapnömoni ve mastitis etkeni olarak rol oynar. Tip B ve Tip E, özellikle sığırlar olmak üzere manda, bizon ve yak gibi geniş getirenlerde epizootik hemorajik septisemi etkenidir (Soike ve ark. 2012). Koyun ve sığırlarda Tip D ve Tip

F kaynaklı enfeksiyonlar yaygın değildir. *M. haemolytica*, sığırlarda hemorajik septisemi ve nakliye ateşinin bir parçası olup, pnömoniye de yol açmaktadır. Koyunlarda ise enzootik pnömoni, genç hayvanlarda septisemi ve erginlerde gangrenli mastitis oluşturabilmektedir (Christensen ve ark. 2005, Dziva ve ark. 2008, Markey ve ark. 2013) (Tablo 3).

Tablo 3: *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın neden olduğu başlıca hastalıklar (Markey ve ark. 2013).

<i>P. multocida</i>	Konakçı	Hastalıklar
<b>Tip A</b>	Sığır	Nakliye ateşi kompleksinin ve enzootik pnömoninin bir parçası, buzağılarda kompleks (pnömoniler), ara sıra fakat şiddetli mastitis
	Koyun	Pleuropnömoni, mastit
	Domuz	Pnomoni ve atrofik rinit
	Tavşan	Plöropnömoni, apseler, orta kulak iltihabı, konjunktivit ve genital enfeksiyonlar
	Kümes Hayvanları	Kanatlı kolerası
	Vahşi hayvanlar	Pnomoni
<b>Tip B</b>	Sığır, manda, bizon, yak ve diğer geviş getirenler	Epizootik hemorajik septisemi
<b>Tip D</b>	Domuz	Atrofik rinit
	Kümes Hayvanları	Kanatlı kolerası
<b>Tip E</b>	Sığır ve bufalo	Epizootik hemorajik septisemi
<b>Tip F</b>	Kümes Hayvanları	Kanatlı kolerası
	Tavşan	Fibrinopürülan pnömoni veya diffüz hemorajik pnömoni
<i>M. haemolytica</i>	Sığır	Nakliye ateşinin bir parçası kompleks, pnömoni (birincil veya ikincil)
	Koyun	Enzootik pnömoni, kuzular da septisemi, gangrenli mastit

*Pasteurella* türleri tarafından oluşturulan hastalık pastörelloz olarak adlandırılmakta olup sığır, koyun ve mandalarda akut, kronik ve subakut şekilde ortaya çıkmaktadır. Akut olgular genellikle kısa sürede ölümle sonuçlanır. Bu hayvanlarda genel durum bozukluğunu takiben ishal ve kanlı dışkılama görülmektedir. Kas

kasılması, epistaksis ve hematüri yaygındır. Subakut olgularda, hayvanlarda baş, boyun ve göğüs bölgesinde deri altı ödemler yaygındır. Akciğer ödemi sonrası oluşan asfeksi veya kanlı ishal nedeniyle hayvan ölümleri gerçekleşmektedir. Kronik olgularda genel durum bozukluğu haricinde hızlı solunum, ağrılı kuru öksürük ve farklı karakterde burun akıntısı gözlenmektedir (De Alwis 1999).

## **2.5 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* Enfeksiyonlarının Teşhisi**

### **2.5.1 Klinik Teşhis ve Ayırıcı Tanı**

*Pasteurella* enfeksiyonlarında klinik bulguların spektrumu, etkilenen türlerin yaşına ve işletmelerdeki hayvan popülasyonuna göre değişir. Genç hayvanlar daha çok etkilenir ve kolay farkedilir iken, yine laktasyondaki bireysel bir hayvanda süt veriminde ve yem tüketiminde azalma kolay fark edilebilir. Yine bireysel vakalarda, hastalığın fiziksel olarak yakından takibinin yanı sıra oskultasyonla solunum sistemindeki değişiklikler izlenebilir. Pnömonik pasteurelloziste solunum sayısında artış, yüksek ateş ve solunum güçlüğü ve nazal ve oküler akıntı yaygın klinik bulgular arasındadır. Ancak bu bulgular hastalığın kesin tanısı için yeterli değildir. Pastörelloz ile klinik olarak sıklıkla karışabilecek birçok enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz hastalık söz konusudur. Bunlar arasında kontagiyöz bovine plöyrapnömoni, İnfeksiyöz bovine rhinotracheitis, Verminöz pnömoni, *Haemophilus somnus* ve *Dictyocaulus viviparous* enfeksiyonları, akciğer apseleri ve aspirasyon pnömonisi başta gelir (Griffin 1998, Radostitis ve ark. 2007).

### **2.5.2 Laboratuvar Teşhisi**

*Pasteurella* enfeksiyonlarının teşhisinde, etkenin kültürünün yapıldığı konvansiyonel teknikler, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) esaslı moleküler teknikler ve serolojik yöntemler yaygın şekilde kullanılmaktadır (Aydın 2006).

### 2.5.2.1 Konvansiyonel Teşhis

Konvansiyonel yöntemler, etiyolojik etkenin çeşitli besiyerlerinde üretilmesi ve takiben biyokimyasal olarak identifikasyonuna yönelik testlerdir. Birçok bakterinin teşhisinde altın standart olarak kullanılan kültür yöntemi zaman alması ve zahmetli olmasına rağmen teşhiste halen en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir (Aydın 2006, Dziva ve ark. 2008).

Kültürel analiz amacıyla genellikle nazal svap, tonsil svabı, transtrakeal aspirasyon içeriği, bronkoalveolar lavaj ve nekropsi sonrası trake, akciğer ve bölgesel lenf nodüllerine ait doku örnekleri kullanılmaktadır. Bunun haricinde, kan ve süt örnekleri de değerlendirilmektedir. Doku örneklerinden hazırlanan preparatların Giemsa ile boyanmasını takiben *Pasteurella* spp. etkenlerinin tipik bipolar görüntüleri tanıda avantaj sağlamaktadır (Aydın 2006).

*Pasteurella* spp'nin ilk izolasyonu genellikle %5 kan (koyun-sığır) ilaveli Kanlı agarda yapılmaktadır. Bunun haricinde, Çikolata agar, Dextrose Starch agar ve Casein Sucrose Yeast agar gibi besiyerleri de kullanılmaktadır (De Alwis 1999, Garrity ve ark. 2004, Quinn ve ark. 2004). *Pasteurella* türlerinin selektif izolasyonu amacıyla besiyerlerine klindamisin, neomisin, gentamisin, vankomisin, potasyum tellurit, amfoterisin gibi antimikrobiyaller katılmaktadır (Knight ve ark. 1983, Avril ve ark. 1990). Aerobik koşullarda 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben *P. multocida* kanlı agarda düzgün, yuvarlak, gri renkli, nonhemolitik mukoid veya nonmukoid koloniler oluşturmaktadır (Dziva ve ark. 2008). *M. haemolytica* kolonileri ise 1-2 mm çapında, düzgün, grimsi ve  $\beta$ -hemolitik S-tipli koloniler şeklindedir. *M. haemolytica*, laktoz pozitif oldukları için MacConkey agarda küçük, kırmızı koloniler oluştururlar (Winn ve ark. 2006).

Kültür sonrası *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın ilk identifikasyonu Gram boyanma özellikleri, oksidaz ve katalaz reaksiyonları, hemoliz yetenekleri, MacConkey agarda üreme durumu ve çeşitli biyokimyasal testler ile yapılmaktadır

(Mutters ve ark. 1989, Dziva ve ark. 2008). Teşhiste, identifikasyon kitleri (API 20NE) kullanılmasına rağmen güvenilirliği sorgulanır niteliktedir (Samuel ve ark. 2003).

Son dönemlerde fenotipik identifikasyon temeline dayanan ve teşhiste hem zaman tasarrufu sağlayan hem de daha güvenli sonuçlar veren otomatize identifikasyon sistemleri de geliştirilmiştir. Bunlar arasında BD Phoenix, Vitek 2 ve MicroScan otomatize identifikasyon sistemleri birçok laboratuvarında kullanılmaktadır. Bu sistemler ile Gram negatif ve Gram pozitif birçok bakteri ve mayaların identifikasyonu yapılabilmektedir. Bu sistemler ayrıca test edilen mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarını da ortaya koyabilmektedir (Abubakr ve ark. 2020).

#### **2.5.2.2 Serolojik Teşhis**

Serolojik yöntemlere *Pasteurella* enfeksiyonlarında enfekte veya portör ayırımında kullanılmaktan ziyade daha çok elde edilen ve tanımlanan izolatların varyantlarının araştırılmasında başvurulmaktadır. *P. multocida* izolatlarının kapsül tiplerinin belirlenmesinde çabuk lam aglutinasyon testi, indirekt hemaglutinasyon (IHA) (Namioka ve Murata 1961), counter immunoelectrophoresis (CIE), agar jel immunodiffüzyon (AGID), koaglutinasyon testi ve ELISA gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (Fillion ve ark. 1985). Ayrıca etkene ait bu kapsül tipleri PZR ile de belirlenebilmektedir (Towsened ve ark. 2001).

*Pasteurella* enfeksiyonlarında doğal antikorların veya aşılama sonrası antikor düzeyinin belirlenmesinde ve özellikle domuzların atrofik rinitisinde ELISA yaygın olarak kullanılmaktadır (De Jong 1999).

#### **2.5.2.3 Moleküler Teşhis**

Kültürel yöntemlerin zahmetli olması, zaman alması ve izolatların biyokimyasal özelliklerinin değişkenlik göstermesi, serolojik yöntemlerin çapraz reaksiyonlardan dolayı kullanımlarının sınırlı olması *Pasteurella* enfeksiyonlarında

moleküler yöntemlerin kullanımını zorunlu kılmıştır (Hassan ve ark. 2016, Rawat ve ark. 2019).

*P. multocida* ve *M. haemolytica* etkenlerinin moleküler identifikasyonunda Pulsed-field gel electrophesis (PFGE), Restriction endonuclease analysis (REA), Multilokus sekans tiplendirme (MLST), Random-amplified polymorphic DNA (RAPD) ve PZR fingerprint gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (Dziva ve ark. 2008). Bunlar arasında PZR fingerprint çeşitli konaklardan elde edilen *P. multocida* izolatlarının tanımlanmasında yaygın kullanım alanı bulmuştur (Dabo ve ark. 1999, Dziva ve ark. 2004, Taylor ve ark. 2010).

PZR yöntemi, tür spesifik korunaklı genlerin in vitro koşullarda amplifikasyonunu gerçekleştirerek teşhis imkânı sağlar (Townsend ve ark. 1998). Kolay ve ucuz uygulanabilen bu yöntemin tanısal doğruluğu yüksektir. PZR, solunum sistemi temsili örnekleri, kan, idrar, dışkı gibi birçok klinik materyalden direkt teşhis sağlayabileceği gibi bakteri kültür ve izolatlarının tanımlanmasına da imkân verir (Townsend ve ark. 1998, Miflin ve Blackall 2001). PZR, *P. multocida* kapsüler tiplerini (A, B, D, E, F) belirleyerek alternatif bir tiplendirme yöntemi olarak da kullanılmıştır (Townsend ve ark. 2001).

## **2.6 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* Enfeksiyonlarının Sağaltımı**

*Pasteurella* enfeksiyonlarının sağaltımında antibiyotikler önemli bir yer tutmaktadır. Hızlı, yeterli ve doğru uygulanan antibiyotik sağaltımı ile enfeksiyonlar kontrol altına alınabilmektedir. *Pasteurella* enfeksiyonlarının sağaltımında yaygın kullanılan antibiyotikler, betalaktamlar, tetrasiklinler ve kinolonlardır. Ayrıca sağaltımda sulfonamid kombinasyonlarına da yer verilmektedir (Gürel 2009). *Pasteurella* enfeksiyonlarının başta Mycoplasmalar olmak üzere birçok viral etkenlerle de beraber seyretmesi antibiyotikle tedavide başarısızlıklara yol açabilmektedir (Erbaş ve Kaya 2008). Bu nedenle özellikle solunum sistemi

enfeksiyonlarının sağaltımında dokuya yüksek penetre olan, geniş etki sepektrumuna sahip antibiyotik seçimi gerekmektedir (Mike 2006, Erbaş ve Kaya 2008).

*Pasteurella* enfeksiyonlarının sağaltımında antimikrobisallerin yanısıra öksürük kesici olarak antitüssifler de kullanılmaktadır. Bu amaçla sığırlarda amonyum klorür kullanılabilir. Ancak eksudat ve amfizem varlığında kullanımlarına dikkat edilmelidir (Perino ve Apley 1999). Tedavide bronşlardaki spazmların azaltılması amacıyla antihistaminikler, ağrı ve ateşin azaltılması amacıyla Nonsteroidal antiinflatuvar ilaçlar (NSAID) ve bronkodilatatorlere de başvurulmaktadır (Friton ve ark. 2005). Destekleyici tedavi olarak vitamin A ve vitamin C kullanımına özen gösterilmelidir (Güneş ve ark. 2013).

*Pasteurella* türleri içerisinde antimikrobiyal direnç daha çok *M. haemolytica* izolatları arasında gözlenmektedir (Katsuda ve ark. 2009). Bu direnç çoğunlukla bakteri plazmid ve transpozonları ile bağıntılıdır (Zecchinon ve ark. 2005, Klima ve ark. 2010). Hayvan yemlerine profilaktik veya büyümeyi teşvik etmek amacıyla kontrolsüz ve uzun süre antibiyotik katılması mevcut antibiyotik direncinin en önemli nedeni olarak bilinmektedir (Schwarz ve ark. 2004, Katsuda ve ark. 2009).

## **2.7 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* Enfeksiyonlarında Korunma**

*Pasteurella* spp. kaynaklı solunum sistemi enfeksiyonlarında korunmada en yaygın uygulanan yöntem aşılamadır. *P. multocida* kaynaklı tavuk kolerası aşısı dünyada ilk olarak kullanılan aşılardan biridir. *Pasteurella* aşıları daha çok bakterinin lökotosini, LPS'si, kapsül polisakkaridi ve OMP yapılarını içermektedir. *Pasteurella* enfeksiyonlarında inaktif ve canlı attenue aşılar kullanılmaktadır. İnaktif aşılar, güvenilir olmalarına rağmen homolog bir serotipe karşı kısa süreli koruma sağlaması nedeniyle yaygın kullanılmaktadır. Canlı aşılar, farklı suşlara karşı bağışıklık sağlayarak enfeksiyonun şiddetini ve insidensini azaltabilmektedir (Quinn ve ark. 2004, şentürk 2020).

Pastörelloza karşı aşılama ergin hayvanlarda yılda bir kez ve genellikle ilkbahar aylarında gerçekleştirilmektedir. Genç hayvanlarda aşılanmanın ve hiperimmün serum kullanımının sütten kesim sonrası dönemde ve hayvan naklinden en az 15 gün önce yapılması tavsiye edilmektedir (Aydın 2006). Maternal bağışıklığa sahip genç hayvanların 2-3 aylıkken 14 gün ara ile iki kez aşılanmaları yeterli koruyuculuk sağlamaktadır. Gebe hayvanların doğumdan 3 - 6 hafta önce aşılanmaları serum ve kolostrumda yüksek nötralizan antikor titresi oluşturarak pasif bağışıklık sağlamaktadır (Şentürk 2020).



### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Çalışma İzni**

Bu çalışma, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün E-71037622-929-1243362 sayılı 20.04.2021 tarihli yazılı izni ile gerçekleştirildi.

Çalışmanın etik kurul izni, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulunun "26.05.2021" tarihli ve "99" numaralı karar ile alındı.

Çalışmanın bir kısmı Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilirken, bir kısmı da T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde gerçekleştirildi.

##### **3.1.2 Çalışma Alanı ve Materyali**

Bu çalışmanın materyalini, Mayıs 2021 ile Mayıs 2022 tarihleri arasında Erzurum İli mezbahanelerinde kesimi yapılan 100 adet sığır ve 100 adet koyun pnömoni şüpheli akciğer örnekleri oluşturdu.

###### **3.1.2.1 Çalışma Alanı**

Erzurum ili, 39° Kuzey – 41° Doğu boylamları arasında yer almaktadır. Erzurum, genel olarak yüksek ve plato özelliği göstermektedir. Erzurum, Türkiye' nin en yüksek rakıma sahip olan (1900 m) illerinden biridir. Yükseltisinden dolayı, Türkiye'nin en nadir iklimlerinden olan sert karasal iklim görülmektedir. Erzurum, 25.066 km<sup>2</sup> yüz ölçümüne sahiptir. Türkiye'nin en geniş yüzölçümüne sahip dördüncü ilidir. Erzurum ili'nin 20 ilçesi ve 1184 mahallesi vardır (Dengiz ve ark. 2019).

### 3.1.2.2 Hayvan Kaynağı ve Çalışma Planı

Çalışmadaki hayvan kaynağını Mayıs 2021 ve Mayıs 2022 tarihleri arasında Erzurum ili merkez mezbahanelerinde kesimi yapılan makroskobik olarak pnömoni şüpheli sığır ve koyun akciğerleri oluşturdu. Belirtilen tarihler arasında mezbahaneye gidilerek kesim sırasında alınan pnömoni şüpheli akciğer örneklerinin *P. multocida* ve *M. haemolytica* yönünden araştırılması amacıyla yapılan bu çalışma modifiye bir kesitsel çalışma şeklinde yürütüldü.

### 3.1.3 Pnömonili Akciğer Örneklerinden Etken İzolasyonu ve İdentifikasyonu İçin Gerekli Materyaller

#### 3.1.3.1 Besiyerleri

Alınan akciğer örneklerinden *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolasyonu ve ön identifikasyonu için Blood agar base (Oxoid, CM0271) ve MacConkey agar (Oxoid, CM0007) kullanıldı. Bakteri izolatlarının saklanması için CryoBank kullanıldı.

MacConkey agar besiyeri üretici firmanın talimatları doğrultusunda 52 gr besiyeri 1 litre distile suda süspansiyon haline getirilip tamamen çözünmesi için ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatıldı. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Steril edildikten sonra besiyeri 45-50°C'ye kadar soğutulup petri kutularına döküldü. Besiyeri tamamen donduktan sonra kullanılıncaya kadar +4°C buzdolabında muhafaza edildi.

Kanlı agar hazırlamak için, Blood agar base besiyeri üretici firmanın talimatları doğrultusunda 40 gr besiyeri 1 litre distile suda süspansiyon haline getirilip ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatılarak besiyerinin çözünmesi sağlandı. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Steril edildikten sonra besiyeri 45-

50°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine %5-7 oranında defibrine koyun kanı eklenip yavaşça karıştırılıp petri kutularına döküldü. Besiyeri tamamen donduktan sonra kullanılıncaya kadar +4°C buzdolabında muhafaza edildi.

### 3.1.3.2 Çözelti ve Ayıraçlar

Oksidaz test şeritleri; bakteri izolatlarının oksidaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Bactident Oxidase Test Stripleri (Merck, 1.00181) kullanıldı.

Katalaz test ayıracağı; bakteri izolatlarının katalaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla %3'lük hidrojenperoksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, 108597) kullanıldı.

Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS); bakteri izolatlarından inokulum ve dilüsyonlarının hazırlanması amacıyla ticari PBS tabletleri (Sigma, P4417) kullanıldı.

### 3.1.2.3 İdentifikasyon İçin Gerekli Malzemeler

Bu çalışmada bakteriyel izolatların identifikasyonu amacıyla VITEK 2 Compact sistemine ait identifikasyon kartları (VITEK 2 GN ID) kullanıldı.

Bakteriyel izolatların VITEK 2 Compact cihazına yüklenebilmesi ve bakteriyel süspansiyonlarının hazırlanması için %0,45 saline solüsyonu kullanıldı.

### 3.1.2.4 Cihazlar

Eppendorf otomatik pipet; Sıvı hacimleri ölçmek için kullanıldı.

Biyolojik Güvenlik Kabini - Thermo Scientific Class 2; Bütün analiz işlemlerinde kontaminasyonu önlemek için filtre ve havalandırma sistemine sahip biyogüvenlik kabini içerisinde çalışıldı.

Vorteks cihazı; Materyallerin homejenizasyonunu sağlamak için kullanıldı.

VITEK 2 Compact System; bakteriyel izolatların identifikasyonu için kullanıldı.

DensiCHEK™ PLUS (McFarland cihazı); bakteriyel izolatlardan hazırlanan süspansiyonların McFarland değerini ölçmek için kullanıldı.

Qiagen Qiacube ekstraksiyon cihazı; bakteriyel izolatlardan total nükleik asit izolasyonu için kullanıldı.

Thermo Scientific NanoDrop 2000; izole edilen total nükleik asitdeki DNA miktarını ölçmek için kullanıldı.

SensoQuest labcycler PZR cihazı; bakteriyel izolatlardan elde edilen DNA miktarını çoğaltmak ve 16S rRNA sekans işlem aşamalarında kullanıldı.

Labnet Power Station 300 Jel Elektroforez cihazı; saflaştırılmış DNA'nın fragment uzunluğunu belirlemek için kullanıldı.

Geneline ImageSCI görüntüleme cihazı; jel elektroforez cihazında yürütülen DNA fragmentlerini görüntülemek için kullanıldı.

Qiagen Qiaxcel Advanced Görüntüleme Sistemi; kapillar elektroforez sisteminde antibiyotik direnç genlerine ait DNA fragmentlerini görüntülemek için kullanıldı.

Qubit4 fluonometer; sekans işlemi öncesi DNA yoğunluğunu ölçmek için kullanıldı.

Oxford Nanopore MinION Mk1C; 16S rRNA dizileme işlemi için kullanıldı.

### 3.1.4 İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi İçin Gerekli Materyaller

*P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları, VITEK 2 Compact sistemi eşliğinde VITEK 2 AST GN97 kartı kullanılarak analiz edildi.

### 3.1.5 Moleküler Analiz İçin Gerekli Materyaller

#### 3.1.5.1 Tür PZR Analizleri İçin Gerekli Malzemeler

Qiagen Cador Pathogen Kit; bakteriyel nükleik asit izolasyonu için kullanıldı.

Qiagen HotStarTaq Master Mix Kit; PZR uygulamalarında yüksek spesifitede amplifikasyon sağlamak için kullanıldı.

Agaroz jel; amplifiye ürünlerin elektroforez analizi için %2'lik agaroz jel kullanıldı.

DNA Ladder H3 RTU; DNA fragmentlerinin boyutunu belirlemek için kullanıldı.

1x TBE buffer; %2' lik agaroz jel hazırlamak için kullanıldı.

RedSafe Nucleic Acid Staining Solution; DNA fragmentlerinin görünürlüğünü sağlamak için kullanıldı.

*P. multocida* ve *M. haemolytica* primerleri; Tablo 4'de yer alan primer çiftleri moleküler identifikasyon için kullanıldı.

Tablo 4: *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın identifikasyonunda kullanılan tür spesifik primerler

Bakteri ismi	Gen bölgesi	Primer ismi	Primer Dizilimi (5'—3')	Bant Büyüklüğü	Kaynak
<i>M. haemolytica</i>	<i>lktA</i>	MHlktA-F	TGTGGATGCGTTTGA AGAAGG	1145 bp	García-Alvareza ve ark. 2018
		MHlktA-R	ACTTGCTTTGAGGTG ATCCG	1145 bp	García-Alvareza ve ark. 2018
<i>P. multocida</i>	<i>Pm23</i>	PM23 F	GGCTGGGAAGCCAA ATCAAAG	1432 bp	Klima ve ark. 2014
		PM23 R	CGAGGGACTACAATT ACTGTAA	1432 bp	Klima ve ark. 2014

### 3.1.5.2 Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR Analizleri İçin Gerekli Malzemeler

Qiagen HotstarTaq Master mix; antibiyotik direnç genlerinin PZR ile amplifikasyonu için kullanıldı.

Qiagen DNA High Resolutin kit; kapiller elektroforez sisteminde antibiyotik direnç gen varlığı tespit etmek için kullanıldı.

Marker (QX Size- QX Alignment); DNA fragmentlerinin boyutunu belirlemek için kullanıldı.

Antibiyotik direnç gen primerleri; Tablo 5'de yer alan primer çiftleri antibiyotik direnç genlerinin varlığını tespit etmek için kullanıldı.

Tablo 5: Antibiyotik direnç genlerinin amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri

Antimikrobiyal	Gen	Primer Dizilimi (5'→3')	Bant (bp)	Bağlanma (°C)	Kaynak
Amikasin Gentamisin	<i>AadB F</i>	TTACGCAGCAGGGCAGTCGC	551	66	Sahay ve ark. 2020
	<i>AadB R</i>	GCGGCACGCAAGACCTCAAC			
	<i>AadA25 F</i>	GCAGTGGATGGCGGCCTGAA	503	66	Klima ve ark. 2014
	<i>AadA25 R</i>	TCGGCGCGATTTTGCCTGTT			
Tetrasiklin Doksisiklin	<i>Tet B F</i>	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	774	55	Vu-Khac ve ark. 2020
	<i>Tet B R</i>	ACTGCCGTTTTTTTCGCC			
	<i>Tet H F</i>	ATACTGCTGATCACCGT	1076	60	Vu-Khac ve ark. 2020
	<i>Tet H R</i>	TCCAATAAGCGACGCT			
Trimetoprim/ Sülfametaksazol	<i>Sul 2 F</i>	CCAATACCGCCAGCCGTCG	489	64	Sahay ve ark. 2020
	<i>Sul 2 R</i>	TGCCTTGTCGCGTGGTGTGG			
Seftiofur	<i>bla CMY-2 F</i>	GACAGCCTCTTTCTCCACA	1000	55	Zhao ve ark. 2003
	<i>bla CMY-2 R</i>	TGGAACGAAGGCTACGTA			
Ampisilin- Amoksisilin/ Klavulanik Asit	<i>bla ROB-1 F</i>	CATTAACGGCTTGTTTCGC	856	55	Vu-Khac ve ark. 2020
	<i>bla ROB-1 R</i>	CTTGCTTTGCTGCATCTTC			
	<i>bla TEM F</i>	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	861	57	Hosoglu ve ark. 2007
	<i>bla TEM R</i>	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG			
	<i>bla OXA-58 F</i>	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	52	Rodriguez-Martinez ve ark. 2009
	<i>bla OXA-58 R</i>	CCCCTCTGCGCTCTACATAC			
	<i>bla CTX F</i>	TTTGGGATGTGCAGTACCAGTAA	544	57	Edelstein ve ark. 2003
	<i>bla CTX R</i>	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA			

### 3.1.5.3 16S rRNA PZR Analizi İçin Gerekli Malzemeler

Qiagen HotstarTaq Master mix; 16S rRNA geninin amplifikasyonu için kullanıldı.

16S rRNA sekans primerleri; Tablo 6'da yer alan primer çiftleri 16S rRNA PZR işlemi için kullanıldı.

Tablo 6: 16S rRNA geninin amplifikasyonu için kullanılan primer çifti

Primer	Primer dizisi (5'—3')	Hedef gen	Bant boyutu (bp)	Kaynak
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	1465	Lane, 1991
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT			

### 3.1.5.4 Sekans İçin Gerekli Materyaller

Oxford Nanopore MinION Rapid Barkoding kit; 16S rRNA PZR işlemi sonucunda elde edilen ampliconları kimliklendirilerek kütüphane oluşturulup 16S rRNA gen dizilime işlemi için kullanıldı.

MinION Flow Cell; hazırlanan kütüphane akış hücresine eklenerek dizileme işlemi başlatmak için kullanıldı.

## 3.2. Metot

### 3.2.1 Örnekleme

Çalışmada, Erzurum İli mezbahanelerinde kesimi yapılan 100 adet sığır ve 100 adet koyun pnömonili akciğer örnekleri kullanıldı. Örnekler pnömonili akciğerlerin lezyonlu bölgelerinden steril numune kaplarına alınarak soğuk zincir altında laboratuvara inceleme için getirildi.

### 3.2.2 Pnömonik Akciğerlerden Etken İzolasyon ve İdentifikasyonu

#### 3.2.2.1 Etken İzolasyonu

Pnömonili sığır ve koyun akciğer örneklerinden etken izolasyonu *in vitro* kültür yöntemi ile gerçekleştirildi. Pnömonili akciğer örnekleri ekim yapmadan önce organın yüzeyi Bek alevinde ısıtılan spatül ile dağlandı. Dağlanan bölge üzerinde, steril bir bistüri ile ensizyon yapıldı. Ensizyon yapılan bölgeden organın iç kısmından 10 µl'lik tek kullanımlık öze yardımı ile alınan örneklerin Kanlı agar ve Mac Conkey agara ekimleri gerçekleştirildi. Ekim yapılan besiyerleri aerobik ortamda 37 °C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı (Garrity ve ark. 2004, Quinn ve ark. 2004, Aydın 2006).

İnkübasyon sonunda üreyen bakterilerin koloni morfolojileri ve hemoliz özellikleri incelendi. Kanlı agarda 1-2 mm çapında gri renkli düzgün, yuvarlak veya mukoid özellikte ve hemolitik olmayan koloniler *Pasteurella* spp. şüpheli olarak kabul edildi ve identifikasyon işlemleri gerçekleştirilmek üzere saf kültürleri hazırlandı (Dziva ve ark. 2008, Önat ve ark. 2010, Güler ve ark. 2013).

İnkübasyon sonunda üreyen 1-2 mm çapında grimsi, şeffaf, düzgün, yuvarlak veya mukoid özellikteki hemolitik koloniler ise *Mannheimia* spp. şüpheli olarak kabul edildi ve identifikasyon işlemlerinde yapılmak üzere saf kültürleri hazırlandı (Önat ve ark. 2010, Quinn ve ark. 2011).

Taze ve saf kültürlerden öze ile alınan *M. haemolytica* şüpheli tek bir bakteri kolonisi MacConkey agara ekildi ve 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyon sonunda besiyerinde üreme olması *M. haemolytica* şüphesini güçlendirdi (Önat ve ark. 2010, Quinn ve ark. 2011).

### 3.2.2.2 İzolatların İdentifikasyonu

Gram boyama ile boyanan preparatlarda pembe/kırmızı renkli görünen bakteriler Gram negatif olarak değerlendirildi (Lenette ve ark. 1985).

İzolatlarda oksidaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla oksidaz test stripleri kullanıldı. Testte, üretici firmanın protokolüne göre, saf bakteri kültüründen öze ile alınan tek bir koloni oksidaz stripe sürüldü ve 15-30 sn sonra sürüntü yerinde mavi-mor rengin görülmesi pozitif, renk değişiminin görülmemesi negatif olarak değerlendirildi (Quinn ve ark. 2011).

İzolatlarda katalaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla lam üzerine bir damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu damlatıldı. Daha sonra kanlı agardaki taze ve saf bakteri kültüründen bir öze dolusu bakteri kolonisi alınıp %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonuna değdirildiğinde gaz kabarcıklarının oluşması pozitif, gaz kabarcığının oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi (Lenette ve ark. 1985).

Şüpheli izolatların kesin identifikasyonları VITEK 2 Compact sistemine ait identifikasyon kartları (VITEK 2 GN ID) kullanılarak gerçekleştirildi.

Vitek 2 Compact cihazına identifikasyonu gerçekleştirmek üzere bakteri saf kolonileri, %0,45'lik NaCl<sub>2</sub> içeren 3 ml' lik tüp içerisinde süspanse edildi. Sonrasında bakteri yoğunluğu DensiChek<sup>TM</sup> cihazında McFarland 0.5-0.63 standardına göre ayarlanarak VITEK 2 GN ID kart ile Vitek 2 Compact cihazına yükleme yapıldı. Yükleme yapılan izolatlara ait bilgiler cihazdaki VITEK 2 Software yazılım programı ile tanımlandı. Vitek 2 Compact sistemi tarafından bakteriler biyokimyasal olarak *P. multocida* ve *M. haemolytica* olarak doğrulandı.

### **3.2.3 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

*P. multocida* ve *M. haemolytica* olarak tanımlanan suşların antibiyotik duyarlılıkları Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Birliği Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST) standartları kapsamında VITEK 2 AST GN97 kartıyla analiz edildi (CLSI 2020, EUCAST 2021).

VITEK 2 kartları, tanımlama substratları veya antimikrobiyaller içeren 64 mikrokuyuya sahiptir. Organizmaların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testi için kapsamlı bir altyapı sunar. VITEK 2 test kartları kontaminasyonu en aza indirecek şekilde tasarlanmıştır. VITEK 2 AST GN97 kartı sadece veteriner teşhisine spesifik olarak üretilmiştir. VITEK 2 AST GN97 kartı, mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen MİK'ler için iki kat dilüsyon tekniğini kullanarak düşük seviyeli direncin saptanmasını sağlamak için genişletilmiş MİK aralığı sunmaktadır.

*P. multocida* ve *M. haemolytica* olarak tanımlanan suşların antibiyotik duyarlılıklarını tespit etmek için saf kültürlerden 3 ml %0,45 NaCl<sub>2</sub> içeren tüp içerisinde süspanse edildi. Sonrasında bakteri yoğunluğu DensiChek™ cihazında McFarland 0.5-0.63 standardına göre ayarlandı. McFarland ayarlanan tüpten 145 µl pipetle alınarak 3 ml %0,45 NaCl<sub>2</sub> içeren tüp içerisine aktarıldı. VITEK 2 AST GN97 kart ile Vitek 2 Compact cihazına yükleme yapıldı.

### **3.2.4 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının PZR ile İdentifikasyonu**

Fenotipik yöntemlerle *P. multocida* ve *M. haemolytica* olarak tanımlanan izolatlarının konfirmasyonu tür spesifik PZR ile gerçekleştirildi.

### 3.2.4.1 DNA Eldesi

İzolatlardan genomik DNA eldesi için bakterilerin uygun katı besiyerinde taze ve saf kültürleri hazırlandı. PZR analizleri için 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde (200 µl) fosfat tamponlu tuz (PBS) çözeltisi birkaç koloni ile homojen hale getirilerek ekstraksiyon sürecine kadar -20°C'de muhafaza edildi. 200µl PBS içerisinde hazırlanmış olan bakteri süspansiyonundan DNA ekstraksiyonu için ticari otomatize ekstraksiyon cihazı (Qiacube, Qiagen). DNA ekstraksiyonu ticari kit (Cadorpatogen kit, Qiagen) eşliğinde üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Elde edilen DNA'ların konsantrasyon, kalite ve saflık kontrolleri Thermo Scientific NanoDrop 2000 cihazı ile ölçülerek gerçekleştirildi. Kalıp DNA'lar kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.4.2 Tür Spesifik PZR

*P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın konfirmasyonu tür spesifik PZR ile gerçekleştirildi. Bu amaçla *P. multocida* için PM23 ve *M. haemolytica*'için *lktA* gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlayan PM23-F ve PM23-R primer çifti ve MHIktA-F ve MHIktA-R primer çifti kullanıldı (Tablo 4).

PZR işlemi, Sensequest Labcycler Thermalcycler cihazında gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu total hacim (25 µl) olacak şekilde; (12,5 µl) HotstarTaq Master mix, (8 µl) nükleaz ari su, (1 µl) forward primer, (1 µl) revers primer ve (2,5 µl) kalıp DNA'dan oluşturuldu. PZR, 95 °C'de 15 dk ilk denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 56 °C'de 1 dk primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dk sentezden oluşan 35 döngülük amplifikasyon ve 72 °C'de 8 dk son uzama termal basamaklarından oluşturuldu.

### 3.2.4.3 Elektroferez

Amplifiye ürünlerin elektroferez analizi %2'lik agaroz jelde gerçekleştirildi. Agaroz jel, 2 g agaroz, 100 ml 1x TBE buffer ve 5 µl RedSafe Nucleic Acid Staining Solution eşliğinde hazırlandı. Hazırlanan jele PZR ürünleri (10 µl), 5 µl DNA Ladder H3 RTU eşliğinde yüklendi. Power station (Labnet 300) elektroferez cihazı 90 volt/saat 90 miliamper ve 45 dakika sabit akımda gerçekleştirildi. Elektroferez sonucunda PZR ürünlerine ait bantlar bilgisayarlı UV transillüminatör (Geneline ImageSCI) cihazında görüntülendi ve fotoğraflanarak kaydedildi. 1432 bp ve 1145 bp boyutlu ürünler *lktA* ve *PM23* gen varlığına ve dolayısıyla *M. haemolytica* ve *P. multocida* pozitifliğine yorumlandı.

### 3.2.5 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR ile Tespiti

Fenotipik olarak (VITEK 2 AST GN97 aracılığı ile) antibiyotik duyarlılık aktiviteleri belirlenen *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşları arasında dirençli olanların olası ve yaygın direnç genleri PZR ile analiz edildi. Bu amaçla Tablo 5'te bildirilen direnç gen primerleri kullanıldı. PZR işlemi, Sensequest Labcycler Thermalcycler cihazında gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu total hacim (25 µl) olacak şekilde; (12,5) µl Hotstart Taq Master mix, (8 µl) nükleaz ari su, (1 µl) forward primer, (1 µl) revers primer ve (2,5 µl) kalıp DNA'dan oluşturuldu. PZR termal döngüsü, 95 °C'de 15 dk ilk denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 56 °C'de 1 dk primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dk zincir uzamasından oluşan 35 döngülük amplifikasyon ve 72 °C'de 8 dk son uzama aşamalarından oluşturuldu. PZR ürünlerinde *AadB*, *AadA25*, *Tet B*, *Tet H*, *Sul 2*, *blaCMY* ve *blaROB* için oluşturulan ampikonlar Qiagen Qiaxcel Advanced (30226) kapillar jel elektroferez sistemi kullanılarak QIAxcel ScreenGel Software programında görüntülendi. PZR ürünlerinde *blaOXA58*, *blaTEM* ve *blaCTX* gen bölgeleri için oluşturulan ampikonlar jel elektroferez kullanılarak görüntülendi. Tablo 5'de bildirilen bant büyüklüklerinin saptanması ilgili direnç geni yönünden pozitif kabul edildi.

Kapiller Jel Elektrofrezinde Fragment Analizi: Lokus büyüklüklerinin tespitinde QIAxcel DNA High Resolution Kit (929002), QX DNA Siz Marker ve QX Alignment marker kitleri kullanıldı.

QIAxcel DNA High Resolution Kit Kalibrasyon Aşaması: QIAxcel DNA High Resolution Kit (+4) oda sıcaklığına çıkarıldı ve 1 saat süresince oda sıcaklığına düşmesi için beklendi. Mavi kapaklı kartuş standında kartuşun yerleştirileceği kuyucuğa önce QX Wash Buffer eklendi ve daha sonra üstüne 2 ml mineral yağ eklendi. Kartuş içerisine yerleştirildiği jel içinden çıkartılıp peçete ile ucu temizlendi. Kartuşun arkasında yer alan yapışkan bant çıkartıldı. Buffer tray'de yer alan WP ve WI pozisyonlarını 8 ml QX Wash Buffer ile dolduruldu. Buffer tray'de yer alan BUFFER pozisyonunu 18 ml QX Separation Buffer ile dolduruldu. WP ve WI pozisyonlarının üzerine 2 ml, Buffer pozisyonunun üzerine 4 ml mineral eklendi. Buffer tray, Buffer tray holder'a yerleştirildi. 12'li striplerin yerleştirileceği kısımlar öne gelecek şekilde yerleştirildi. QIAxcel DNA High resolution kitin içerisinden çıkan QX 0.2 ml 12-Tube Strip'lerin, 12 kuyucuğuna da 15 µl Alignment marker eklendi (Alignment marker +4). Her kuyucuğun üzerine Alignment marker'ın uçmaması için bir damla mineral yağ eklendi. Bu 12'li strip MARKER1 pozisyonuna yerleştirildi. QIAxcel DNA High resolution kitin içerisinden çıkan QX Colored 0.2 ml 12-Tube Striplerin her kuyucuğuna 15 µl Intensity Calibration Marker eklendi. Üzerlerine bir damla mineral yağ eklenerek MARKER 2 pozisyonuna yüklendi. 'Service' sekmesinden 'Start calibration' yapıldı.

PZR Ürünlerinin QIAxcel (Kapiller Jel Elektrofrez) Cihazında Yürütülmesi: QIAxcel DNA High resolution kitinin kalibrasyonu bittikten sonra hazırlanan QX Alignment marker 15bp/1kb 12'li strip MARKER 1 pozisyonuna, Size Marker 0.2 ml'lik PZR tüpünde EBA buffer ile 1:20 oranında dilüe edilerek birinci kuyucuğa, 0.2 ml'lik PZR tüpünde bulunan ampikonlar ise diğer kuyucuklara yerleştirilip; 'OM500-20 sec' protokolü kullanılarak analiz işlemi başlatıldı. Çalışma bitince 'Analysis' ekranı seçildi. Kapillar jel elektrofrez cihazında elektrofrez sonucu elde edilen bant büyüklükleri tespit edildi. Bant büyüklüklerine göre antibiyotik direnç genleri değerlendirildi.

### **3.2.6 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının 16S rRNA PZR Analizi**

*P. multocida* ve *M. haemolytica* suşlarının filogenetik analizlerinin yapılması amacıyla gerçekleştirilecek sekans analizi öncesi 16S rRNA geni amplifikasyonunu gerçekleştirildi. Bu amaçla Tablo 6' daki primer çifti kullanıldı. 16S rRNA PZR, MJ Mini Gradient Thermalcycler (Bio-Rad) cihazında gerçekleştirildi.

PZR testi total hacim 25 µl olacak şekilde; (12,5 µl) HotstarTaq Master miks, (7,5 µl) nükleaz ari su, (1 µl) forward primer, (1 µl) revers primer ve (3 µl) kalıp DNA'dan oluşturuldu. PZR'nin termal döngüsü, 95 °C'de 5 dk ilk denatürasyonu takiben 35 siklustan oluşan 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 59 °C'de 30 sn primer bağlanması, 72 °C'de 45 sn zincir uzamasından oluşan amplifikasyon ve 72 °C'de 7 dk son uzaması aşamalarından oluşturuldu. 16S rRNA gen bölgesinin PZR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonucu 1465 bp boyutundaki amplifiye ürünlerin varlığı 16S rRNA gen varlığını gösterdi.

### **3.2.7 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının 16S rRNA Sekans Analizi**

*P. multocida* ve *M. haemolytica* suşlarının sekans analizi, 16S rRNA PZR sonrası elde edilen amplifiye ürünlerin Oxford Nanopore MinION cihazında sekanslanması ile gerçekleştirildi. Sekanslama, 16S rRNA PZR'de kullanılan 27F ve 1492R primerleri eşliğinde, Oxford Nanopore MinION Rapid Barkoding kit ve 16S rRNA sekans analizi kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

16S rRNA sekans işleminde SQK-RBK110.96 Kiti kullanıldı. DNA konsantrasyonları ortalama olarak 30 ng/ml olarak tespit edildi. Kütüphane hazırlığı için Thermalcycler cihazı 30 °C 2 dk, 80 °C 2 dk' ya ayarlandı. Rapid Barkoding kiti oda sıcaklığına getirildi. 1.5 ml hacimli tüpler içerisine 1 µl DNA konuldu, hacim 9 µl su ile tamamlandı ve pipetasyon yapıldı. Takiben 0.2 ml hacimli tüp içerisine 9 µl

template DNA ve 1 µl Rapid Barkod ilave edildi (her numune için bir barkod kullanıldı). Pipetasyon ile karıştırıldıktan sonra her numune 30 °C de 2 dk ve 80 °C’de 2 dk tutulup soğumaya bırakıldı. Toplam hacime dikkat edilerek tüm barkodlu numuneler havuzlanıp 1.5 ml hacimli tüpte SPRI beadsleri vorteksleyerek homojen hale getirildi. Numune havuzu eşit hacimde SPRI beads ile karıştırıldı ve 5 dk boyunca çalkalandı. En az 3 ml olacak şekilde %80’ lik etanol hazırlandı. Manyetik stand üzerinde bırakılan tüplerde süpernatant pipetle uzaklaştırıldı. Manyetik kaset üzerinde boncuklar 1.5 ml taze %80’lik etanol ile yıkandı. Pelet bozulmadan etanol uzaklaştırıldı. Tüp hafifçe döndürüldükten sonra tekrar manyetik kaset üzerine alındı. Ethanol kalıntısı tamamen uzaklaştırıldı ve 30 sn kurumaya bırakıldı. Tüp manyetik kasetten alınıp 15 mikrolitre Ethanol Buffer (EB) ile karıştırıldı. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Oluşturulan elüsyonda beadslerin pelet olmaması için tekrar manyetik standı yerleştirildi. Temiz ve renksiz görüntü oluşana kadar 1 dk inkübe edildi. 15 µl hacimli örnek 1.5 ml hacimli tüp içerisine aktarılıp örneğin 1.5 µl’lik kısmı nanodopla ölçüldü. 1.5 ml hacimli tüp içerisine havuzdan 11 µl aktarılıp üzerine 1 µl Rapid Adaptor (RAPF) aktarıldı. Karışım hafifçe karıştırıldı ve 5 dk inkübe edildi.

Flowcell’e yükleme işlemi öncesi kit içerisinde bulunan Sequencing Buffer II (SBII), Loading Beads II (LBII) ya da Loading Solutions (LS), Flush Tetter (FLT), Flush Buffer (FB) oda sıcaklığına getirildi. SBII, FB ve FLT hafifçe vortekslendi.

Flowcell’e yüklemek üzere 30 µl FLT, 1,17 ml FB ile karıştırıp priming miks hazırlandı. Hava kabarcığı oluşmayacak şekilde 800 µl priming miks priming porttan yüklendi. Loading Beadsler kullanımdan önce pipetasyon ile homojen hale getirildi. Yeni bir tüpte 37.5 µl SBII, 25.5 µl LBII ve 12 µl DNA karıştırıldı. Spot On kapağı açılıp 7.5 µl örnek damla damla yüklendi. Spot On kapatılıp flowcell çalıştırıldı ve okuma işlemi gerçekleştirildi.

### 3.2.8 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS Version 21.0 ile gerçekleştirildi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkileri belirlemede Ki-kare testi kullanıldı.  $P < 0,05$  değerler anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

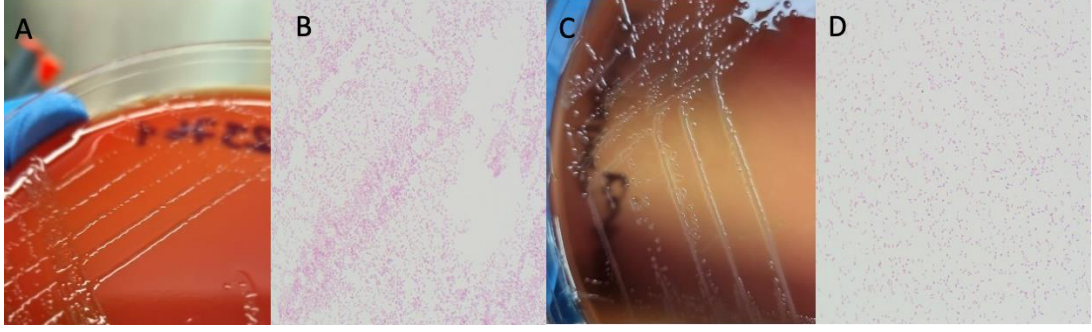
### 4.1 İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Bu çalışmada, Erzurum İli mezbahanelerinde kesimi yapılan 100 koyun ve 100 sığır pnömonili akciğeri olmak üzere toplam 200 örnek *P. multocida* ve *M. haemolytica* yönünden kültürel yöntemlerle incelendi. Pnömonili akciğer örneklerinin kültürel analizi sonucu 16' sından (%8) *P. multocida* ve *M. haemolytica* şüpheli kültür pozitifliği elde edildi. Kültür pozitifliği koyun pnömonili akciğer örneklerinde %7 (n=7) ve sığır pnömonili akciğer örneklerinde ise %9 (n=9) olarak saptandı (Tablo 7).

Tablo 7: Akciğer örneklerinde izole edilen bakterilerin dağılımı

Hayvan Türü	Numune sayısı	<i>P. multocida</i> İzolasyon sayısı	<i>M. haemolytica</i> İzolasyon sayısı	Toplam
Sığır	100	4 (%4)	5 (%5)	9 (%9)
Koyun	100	3 (%3)	4 (%4)	7 (%7)
<b>Toplam</b>	200	7 (%3,5)	9 (%4,5)	16 (%8)

Kültür pozitif örneklere ait kolonilerin kanlı agar besiyerinde 37°C'de subkültürleri yapılarak saflaştırıldı. Saf koloniler mikroskopik ve makroskopik morfolojileri ve bazı fenotipik özelliklerine göre tanımlandı. Bu kapsamda; Kanlı agarda hemoliz oluşturmayan, Mac Conkey agarda üremeyen, oksidaz ve katalaz pozitif Gram negatif kokobasil morfolojili 7 (%3,5) izolat *P. multocida* şüpheli; kanlı agarda β-hemolitik koloni oluşturan, MacConkey agarda üreme yeteneğine sahip, oksidaz ve katalaz pozitif Gram negatif kokobasil morfolojili 9 (%4,5) izolat ise *M. haemolytica* şüpheli olarak değerlendirildi (Resim 1).



Resim 1: Pnömonik akciğer örneklerinin kültürel analiz bulguları. A) Kanlı agarda *P. multocida*'nın koloni morfolojisi B) *P. multocida*'nın Gram boyama sonrası mikroskopik morfolojisi C) Kanlı agarda *M. haemolytica*'nın koloni morfolojisi D) *M. haemolytica*'nın Gram boyama sonrası mikroskopik morfolojisi

*P. multocida* (n= 7) ve *M. haemolytica* (n= 9) şüpheli izolatlarının identifikasyonu, Vitek 2 Compact sistemi GN ID kartı ile gerçekleştirildi. Bu kapsamda 7 adet *P. multocida* şüpheli izolatın tümü *P. multocida* ve 9 adet *M. haemolytica* şüpheli izolatın tümü ise *M. haemolytica* olarak doğrulandı (Tablo 8 ve Tablo 9).

Tablo 8: *P. multocida* izolatına ait VITEK 2 Compact biyokimyasal testler

Organizma Kaynağı	VITEK 2																
Seçilen Organizma	99% Olasılık <b>Pasteurella multocida</b>								Uyum: Mükemmel identifikasyon								
	Biyonumara: 0001410100040001																
<b>Ayrılacak Analiz Organizmaları ve Testler:</b>																	
<b>Analiz Mesajları:</b>																	
<b>Uyumsuz Olan Tipik Biopattern(ler)</b>																	
<b>Biyokimyasal Detaylar</b>																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

*P. multocida* izolatlarının 4 (%4)'ü sığır ve 3 (%3)'ü koyun pnömonili akciğerlerine ait iken, *M. haemolytica* izolatlarının 5 (%5)'i sığır ve 4 (%4)'ü koyun pnömonili akciğerlerine aitti. Dolayısıyla sığır pnömonili akciğerlerinden 4 (%4) adet *P. multocida* ve 5 (%5) adet *M. haemolytica* olmak üzere toplam 9 (%9) adet

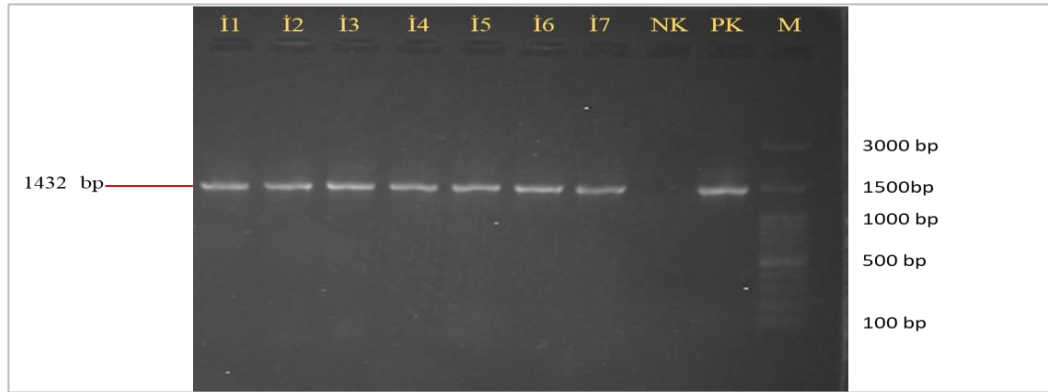
*Pasteurellaceae* familyası üyesi bakteri kültüre edilirken, koyun pnömonili akciğerlerinden 3 (%3) adet *P. multocida* ve 4 (%4) adet *M. haemolytica* olmak üzere toplam 7 (%7) adet *Pasteurellaceae* familyası üyesi bakteri kültüre edildi (Tablo 7).

Tablo 9: *M. haemolytica* izolatına ait VITEK 2 Compact biyokimyasal testler

Organizma Kaynağı	VITEK 2																
Seçilen Organizma	99% Olasılık <b>Mannheimia haemolytica</b> Biyonumara: 0001600410040001 Uyum: Mükemmel identifikasyon																
Ayrılacak Analiz Organizmaları ve Testler:																	
Analiz Mesajları:																	
Uyumsuz Olan Tipik Biopattern(ler)																	
Biyokimyasal Detaylar																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

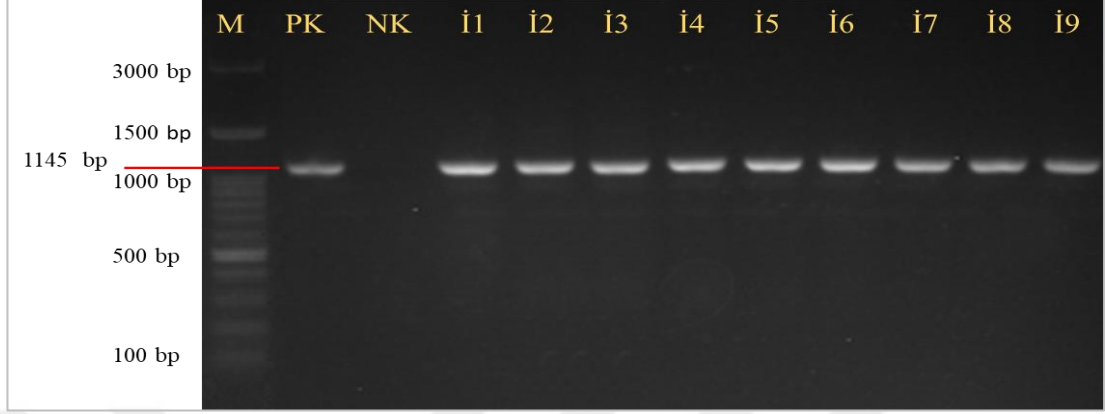
#### 4.2 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının PZR ile İdentifikasyon Bulguları

Vitek 2 Compact sistemiyle tanımlanan 7 *P. multocida* izolatının tümü PZR sonucu 1432 bp'lik bant elde edilmesiyle *P. multocida* olarak teyit edildi (Resim 2).



Resim 2: *P. multocida* tür spesifik PZR'de elde edilen ampliconların agaroz jel görüntüleri (1432 bp) (M: 100 bp DNA marker; PK: *P. multocida* Pozitif Kontrol; I1-I7: *P. multocida* izolatları; NK: Negatif Kontrol).

Vitek 2 Compact cihazı ile tanımlanan 9 *M. haemolytica* izolatının tamamının *M. haemolytica* olduğu PZR ile de teyit edildi (Resim 3).



Resim 3: *M. haemolytica* spesifik PZR'de elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüleri (1145 bp) (M: 100 bp DNA marker; PK: *M. haemolytica* Pozitif Kontrol; İ1-İ9 *M. haemolytica* izolatları; NK: Negatif Kontrol).

### 4.3 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Tanımlanan *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 Compact sistem AST GN97 kartı ile test edildi ve sonuçlar MİK değeri olarak sunuldu. Tespit edilen MİK değerlerinin yorumlanması, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2020) ve Avrupa Birliği Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST, 2021) standartlarına göre yapıldı.

Tablo 10: *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının AST-GN97 kartı ile belirlenen MİK değerleri

Antibiyotik	İzolat no															
	S105P	S3P	S19M	S29M	S71M	S102M	S79M	S88P	K83M	K15P	K73M	K24P	K38M	S63P	K69M	K17P
Ampisilin	≤2	≤2	≥32	≥32	≥32	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≥32	≤2
Amoksisilin/Klavulonik asit	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Seftiofur	≤1	≤1	≤1	2	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≥32	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
İmipenem	≤0,25	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Amikasin	≥64	≥64	16	16	32	32	16	≥64	32	16	16	≤2	16	≥64	32	32
Gentamisin	8	8	4	4	4	4	4	8	4	4	≤1	≤1	4	8	4	4
Enrofloksasin	0,5	≤0,12	0,5	0,25	≤0,12	≤0,12	≤0,12	0,5	≤0,12	≤0,12	0,5	≤0,12	≤0,12	0,5	0,5	≤0,12
Doksisiklin	1	≤0,5	1	1	1	≤0,5	≤0,5	1	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	2	1	1
Tetrasiklin	≥16	8	8	4	8	≤1	≤1	≥16	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≥16	4	≥16
Trimetoprim/Sülfametoksazol	40	40	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	40	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	40	≤20	40

EUCAST'a göre yapılan yorumlamada *P. multocida* izolatlarının tamamının ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametaksazole ve 1 (%14,29)'inin doksisikline dirençli olduğu saptandı. *P. multocida* için EUCAST'da amikasin, enrofloksasin, gentamisin, imipenem, seftiofur ve tetrasiklin referans aralıkları olmayıp, bu antibiyotiklerin MİK değerleri sırasıyla  $\leq 2 - \geq 64$  ug/ml,  $\leq 0,12 - 0,5$  ug/ml,  $\leq 1 - 8$  ug/ml,  $\leq 0,25 - 0,5$  ug/ml,  $\leq 1$  ug/ml ve  $\leq 1 - \geq 16$  ug/ml arasında değişmekteydi. CLSI'ye göre yapılan yorumlamada ise ampisilin ve amoksisilin-klavulonik asite *P. multocida* izolatlarının tamamı dirençli iken, enrofloksasine 3 (%42,86)'ü ve tetrasikline 5 (%71,43)'i dirençliydi. İzolatların tamamının ise seftiofura duyarlı olduğu saptandı. *P. multocida* için CLSI'da amikasin, doksisiklin, gentamisin, imipenem ve trimetoprim-sulfametoksazol referans aralıkları olmayıp, bu antibiyotiklerin MİK değerleri sırasıyla  $\leq 2 - \geq 64$  ug/ml,  $\leq 0,5 - 2$  ug/ml,  $\leq 1 - 8$  ug/ml,  $\leq 0,25 - 0,5$  ug/ml ve  $\leq 0,20 - 40$  ug/ml arasında değişmekteydi. Her iki manuele göre dirençli saptanan izolatların ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametoksazol MİK değerleri sırasıyla  $\leq 2 - \geq 32$  ug/ml,  $\leq 2$  ug/ml ve  $\leq 20 - 40$  ug/ml arasında değişmekteydi (Tablo 10 ve 11). EUCAST'a göre *P. multocida* izolatlarının 7 (%100)'sında üçlü antibiyotik direnci (ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametoksazol) ve 1 (%14,29)'inde dördü antibiyotik direnci (ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit, doksisiklin ve trimetoprim-sulfametoksazol) gözlenirken, CLSI'ye göre izolatların 3 (%42,86)'ünde dördü antibiyotik direnci (ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit, enrofloksasin ve tetrasiklin) ve 2 (%28,57)'sinde ikili antibiyotik direnci (ampisilin ve tetrasiklin) saptandı (Tablo 11). *P. multocida* izolatlarının EUCAST ve CLSI'ye göre tamamında en az ikili olmak üzere çoklu antibiyotik direnci mevcuttu (Tablo 11).

Tablo 11: *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının AST-GN97 kartlı ile belirlenen MİK değerlerinin EUCAST ve CLSI'ye göre antibiyotik duyarlılık sonuçları.

No	Kod	Etken	Manuel	Ampisilin	Amikasin	Amoksisilin/ Klav. asit	Doksisisiklin	Enrofloksasin	Gentamisin	İmipenem	Seftiofur	Tetrasiklin	Trimetoprim /Sülfametaksazol
1	S105P	<i>P. multocida</i>	EUCAST	R	-	R	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	R	-	R	-	-	S	R	-
2	S3P	<i>P. multocida</i>	EUCAST	R	-	R	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	R	-	S	-	-	S	R	-
3	S19M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	R	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	R	-	-	S	R	-
4	S29M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	R	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	S	-	-	S	I	-
5	S71M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	R	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	S	-	-	S	R	-
6	S102M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	S	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	S	-	-	S	S	-
7	S79M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	S	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	S	-	-	S	R	-
8	S88P	<i>P. multocida</i>	EUCAST	R	-	R	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	R	-	R	-	-	S	R	-
9	K83M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	S	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	S	-	-	S	S	-
10	K15P	<i>P. multocida</i>	EUCAST	R	-	R	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	R	-	S	-	-	S	S	-
11	K73M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	S	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	R	-	-	R	S	-
12	K24P	<i>P. multocida</i>	EUCAST	R	-	R	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	R	-	S	-	-	S	S	-
13	K38M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	S	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	S	-	-	S	S	-
14	S63P	<i>P. multocida</i>	EUCAST	R	-	R	R	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	R	-	R	-	-	S	R	-
15	K69M	<i>M. haemolytica</i>	EUCAST	R	-	S	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	S	-	R	-	-	S	I	-
16	K17P	<i>P. multocida</i>	EUCAST	R	-	R	S	-	-	-	-	-	R
			CLSI	R	-	R	-	S	-	-	S	R	-

R: Dirençli S: Duyarlı I: Orta dercede duyarlı “-“: CLSI ve EUCAST veri tabanında ilgili antibiyotik için veri bulunmamaktadır.

EUCAST'a göre yapılan yorumlamada *M. haemolytica* izolatlarının tamamının trimetoprim-sulfametaksazole ve 4 (%44,44)'ünün ampisiline dirençli olduğu saptandı. İzolatların tamamının amoksisilin-klavulonik asit ve doksisisikline duyarlı olduğu saptandı. İki izolat ise tetrasikline orta derecede duyarlıydı. *M. haemolytica* için EUCAST'da amikasin, enrofloksasin, gentamisin, imipenem, seftiofur ve tetrasiklin referans aralıkları olmayıp, bu antibiyotiklerin MİK değerleri sırasıyla 16 - 32 ug/ml,  $\leq 0,12$  - 0,5 ug/ml,  $\leq 1$  - 4 ug/ml,  $\leq 0,25$  ug/ml,  $\leq 1$  -  $\geq 32$  ug/ml ve  $\leq 1$  - 8 ug/ml arasında değişmekteydi. CLSI'ye göre yapılan yorumlamada ise ampisiline *M. haemolytica* izolatlarının tamamı dirençli iken, enrofloksasine 3 (%33,33)'ü, tetrasikline 3 (%33,33)'ü ve seftiofura 1 (%11,11)'i dirençliydi. *M. haemolytica* için CLSI'da amikasin, amoksisilin-klavulonik asit, doksisisiklin, gentamisin, imipenem ve trimetoprim-sulfametoksazol referans aralıkları olmayıp, bu antibiyotiklerin MİK değerleri sırasıyla  $\leq 2$  -  $\geq 64$  ug/ml,  $\leq 2$  ug/ml,  $\leq 0,5$  - 2 ug/ml,  $\leq 1$  - 8 ug/ml,  $\leq 0,25$  - 0,5 ug/ml ve  $\leq 0,20$  - 40 ug/ml arasında değişmekteydi. Her iki manuele göre dirençli saptanan izolatların ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametoksazol MİK değerleri sırasıyla  $\leq 2$  -  $\geq 32$  ug/ml,  $\leq 2$  ug/ml ve  $\leq 20$  ug/ml olarak değişmekteydi (Tablo 10 ve 11). EUCAST'a göre *M. haemolytica* izolatlarının 4 (%44,44)'ünde ikili antibiyotik direnci (ampisilin ve trimetoprim-sulfametoksazol) gözlenirken, CLSI'ye göre izolatların 1 (%11,11)'inde üçlü antibiyotik direnci (ampisilin, enrofloksasin ve tetrasiklin), 1 (%11,11)'inde farklı türde üçlü antibiyotik direnci (ampisilin, enrofloksasin ve seftiofur), 2 (%22,22)'sinde ikili antibiyotik direnci (ampisilin ve tetrasiklin) ve 2 (%22,22)'sinde farklı türde ikili antibiyotik direnci (ampisilin ve enrofloksasin) saptandı. *M. haemolytica* izolatlarının EUCAST'a göre 4 (%44,44)'ünde ve CLSI'ye göre 5 (%55,56)'inde en az ikili olmak üzere çoklu antibiyotik direnci mevcuttu (Tablo 11).

*Pasteurella* türleri arasında genel çoklu antibiyotik dirençliliği EUCAST'a göre %68,75 (n= 11) ve CLSI'ye göre %62,5 (n= 10) olarak değişmekteydi (Tablo 11).

#### 4.4 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Genleri

*P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının VITEK 2 AST GN97 kartıyla belirlenmiş olan antibiyotik direnç profillerine paralel olarak ilgili antibiyotik direncinden sorumlu olan en yaygın direnç genlerinin PZR analizleri gerçekleştirildi. Bu kapsamda; ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit ve seftiofur antibiyotiklerine dirençliliği temsilen *blaROB-1*, *blaOxa58*, *blaTEM*, *blaCTX* ve *blaCMY-2* genleri, trimetoprim/sülfametaksazole direnci temsilen *Sul 2* geni, doksisisiklin ve tetrasikline direnci temsilen *Tet B* ve *Tet H* genleri, amikasin ve gentamisine direnci temsilen *AaDB* ve *AaDA25* genleri analiz edildi.

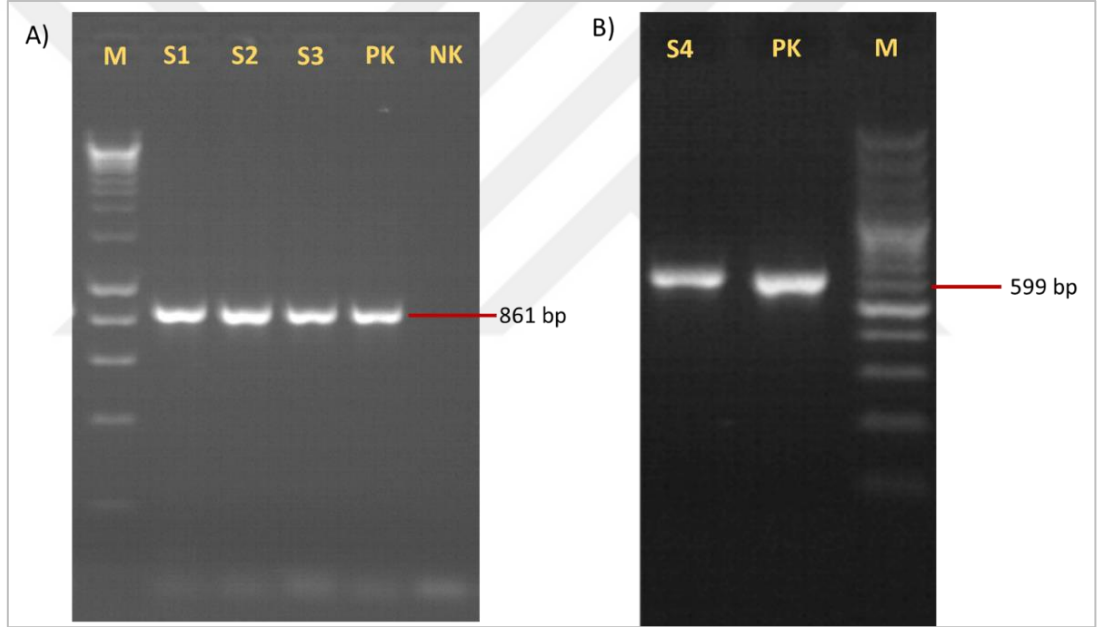
Tablo 12: *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının antibiyotik direnç gen profilleri

No	Kod	Konak türü	Etken	<i>AaDA25</i>	<i>AaDB</i>	<i>Tet H</i>	<i>Tet B</i>	<i>Sul 2</i>	<i>blaROB-1</i>	<i>blaCTX</i>	<i>blaOXA58</i>	<i>blaCMY-2</i>	<i>blaTEM</i>
1	S105P	Sığır	<i>P. multocida</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
2	S3P	Sığır	<i>P. multocida</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
3	S19M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
4	S29M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
5	S71M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
6	S102M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
7	S79M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
8	S88P	Sığır	<i>P. multocida</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
9	K83M	Koyun	<i>M. haemolytica</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
10	K15P	Koyun	<i>P. multocida</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
11	K73M	Koyun	<i>M. haemolytica</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
12	K24P	Koyun	<i>P. multocida</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
13	K38M	Koyun	<i>M. haemolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14	S63P	Sığır	<i>P. multocida</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
15	K69M	Koyun	<i>M. haemolytica</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
16	K17P	Koyun	<i>P. multocida</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+

“+” direnç geni tespit edilen, “-“ direnç geni tespit edilmeyen.

*P. multocida* izolatlarının 5 (%71,43)'ünde *AaDA25*, 3 (%42)'ünde *AaDB*, 4 (%57,14)'ünde *Tet H*, 6 (%85,71)'sında *Sul 2*, 7 (%100)'sinde *blaOXA58* ve 7 (%100)'sinde *blaTEM* antibiyotik direnç genleri tespit edildi (Tablo 12).

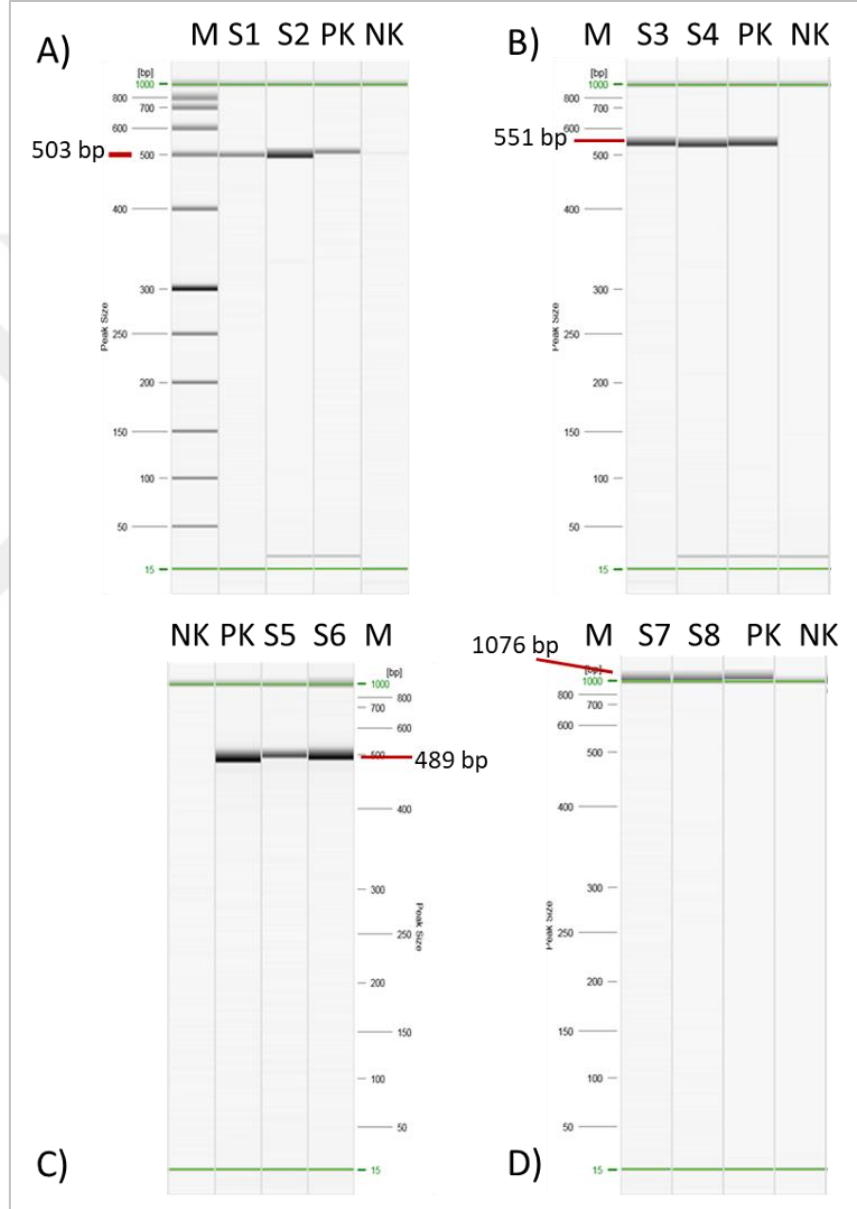
*P. multocida* izolatlarının 3 (%42,86)'ünde (S3P, S88P ve K15P) *AaDA25*, *AaDB*, *Tet H*, *Sul 2*, *blaOXA58* ve *blaTEM*; 1 (%14,29)'inde (S105P) *AaDA25*, *Sul 2*, *blaOXA58* ve *blaTEM*; 1 (%14,29)'inde (K24P) *AaDA25*, *blaOXA58* ve *blaTEM*; 1 (%14,29)'inde (S63P) *Sul 2*, *blaOXA58* ve *blaTEM*; 1 (%14,29)'inde (K17P) *Tet H*, *Sul 2*, *blaOXA58* ve *blaTEM* çoklu antibiyotik direnç genleri tespit edildi (Tablo 12) (Resim 4).



Resim 4: *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının antibiyotik direnç gen PZR analizlerine ait elektroforez: (A): *blaTEM* gen spesifik PZR ürünlerinin elektroforezi. S1-S3: Saha suşları, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol M: DNA ladder (HyperLadder 1 kb DNA ladder, BIO-33053, Bioline), (B): *Oxa58* gen spesifik PZR ürünlerinin elektroforezi. S1: Saha suşları, PK: Pozitif kontrol, M: DNA ladder (GeneRuler 100 bp plus DNA ladder, SM0321, ThermoFisher Sci.)

*M. haemolytica* izolatlarının 6 (%66,67)'sında *AaDA25*, 7 (%77,78)'sinde *AaDB*, 7 (%77,78)'sinde *Sul 2*, 2 (%22,22)'sinde *blaOXA58* ve 9 (%100)'unda *blaTEM* antibiyotik direnç genleri tespit edildi (Tablo 12).

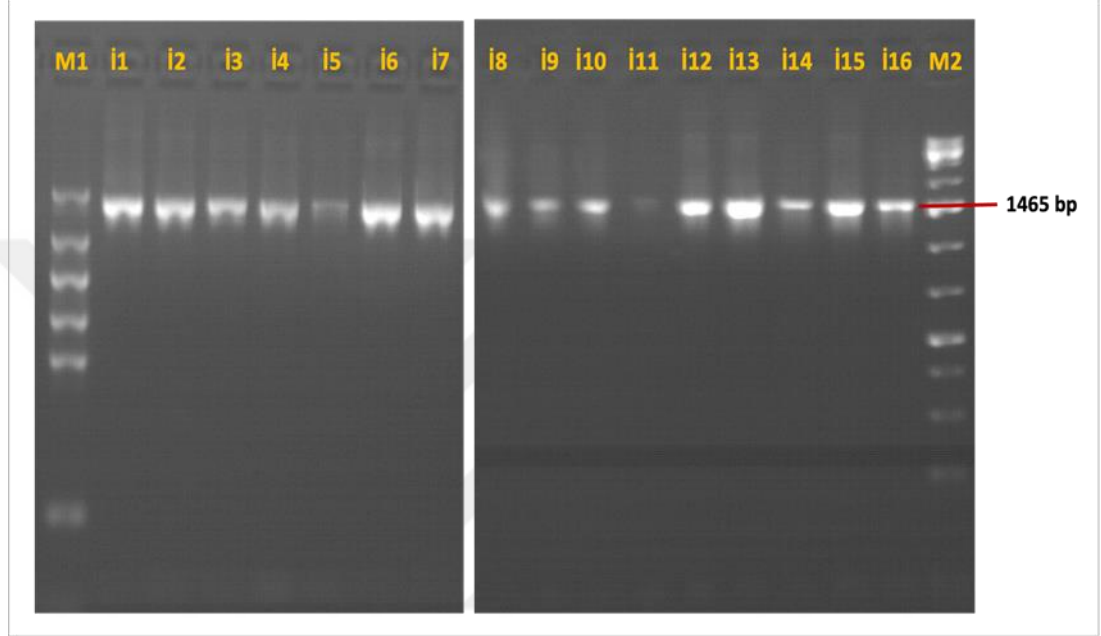
*M. haemolytica* izolatlarından 2 (%22,22)'sinde (S29M ve S71M) *AaDA25*, *AaDB*, *Sul 2*, *blaOXA58* ve *blaTEM*; 3 (%33,33)'ünde (S19M, S102M ve S79M) *AaDA25*, *AaDB*, *Sul 2* ve *blaTEM*; 1 (%11,11)'inde (K83M) *AaDA25*, *AaDB* ve *blaTEM*; 1 (%11,11)'inde (K73P) *AaDB*, *Sul 2* ve *blaTEM*; 1 (%11,11)'inde (K69M) *Sul 2* ve *blaTEM* çoklu antibiyotik direç genleri tespit edildi (Tablo 12) (Resim 5).



Resim 5: *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının antibiyotik direç gen PZR analizlerine ait elektroforez: (A): *AaDA25* (503bp) gen spesifik PZR ürünlerinin elektroforezi. S1-S2: Saha suşları, PK: Pozitif kontrol, M: QIAxcel DNA Size Marker, (B): *AaDB* (551 bp) gen spesifik PZR ürünlerinin elektroforezi. S3-S4: Saha suşları, PK: Pozitif kontrol, M: QIAxcel DNA Size Marker, (C): *Tet H* (1076 bp) gen spesifik PZR ürünlerinin elektroforezi. S5-S6: Saha suşları, PK: Pozitif kontrol, M: QIAxcel DNA Size Marker, (D): *Sul 2* (489 bp) gen spesifik PZR ürünlerinin elektroforezi. S7-S8: Saha suşları, PK: Pozitif kontrol, M: QIAxcel DNA Size Marker

#### 4.5 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının 16S rRNA PZR Analiz Bulguları

Üniversal primerler (27F ve 1492R) ile gerçekleştirilen PZR analizi sonucu, 16 izolatın tamamında 1465 bp bant varlığı ile 16S rRNA gen bölgesinin başarılı bir şekilde amplifikasyonu gerçekleştirildi (Resim 6).



Resim 6: *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının 16S rRNA PZR analizine ait ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder, SM0311 (M1); GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, SM1331 (M2), Thermo Fisher Sci. İ1-İ16: *P. multocida* ve *M. haemolytica* saha izolatları

#### 4.6 *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* İzolatlarının 16S rRNA Sekans Analiz Bulguları

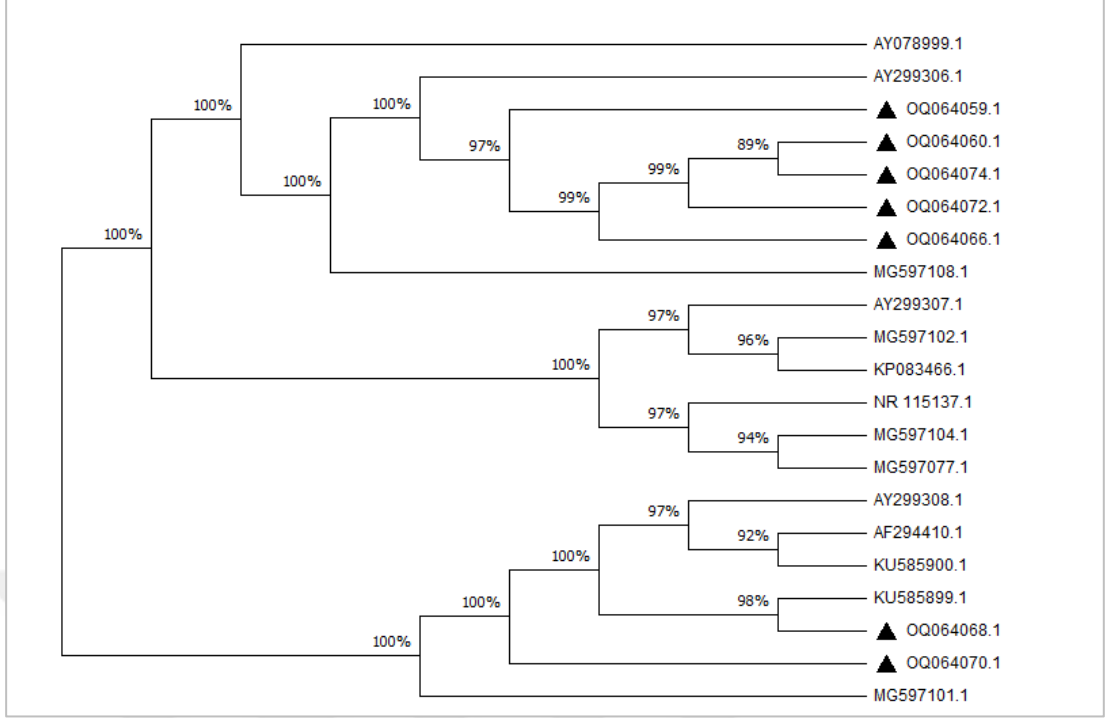
Elde edilen dizilerin analizi Metrichor v.2.42.2 program eşliğinde gerçekleştirildi ve veriler NCBI GenBank' daki *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı.

Oxford Nanopore MinION sekans cihazında, Oxford Nanopore MinION Rapid Barkodıng kit ve 16S rRNA sekans analizi kiti kullanılarak gerçekleştirilen sekans işlemi sonucunda alınan veriler gen bankasına yüklenmiş olup NCBI kayıt numarası Tablo 13'de sunuldu.

Tablo 13: *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatların NCBI erişim numaraları

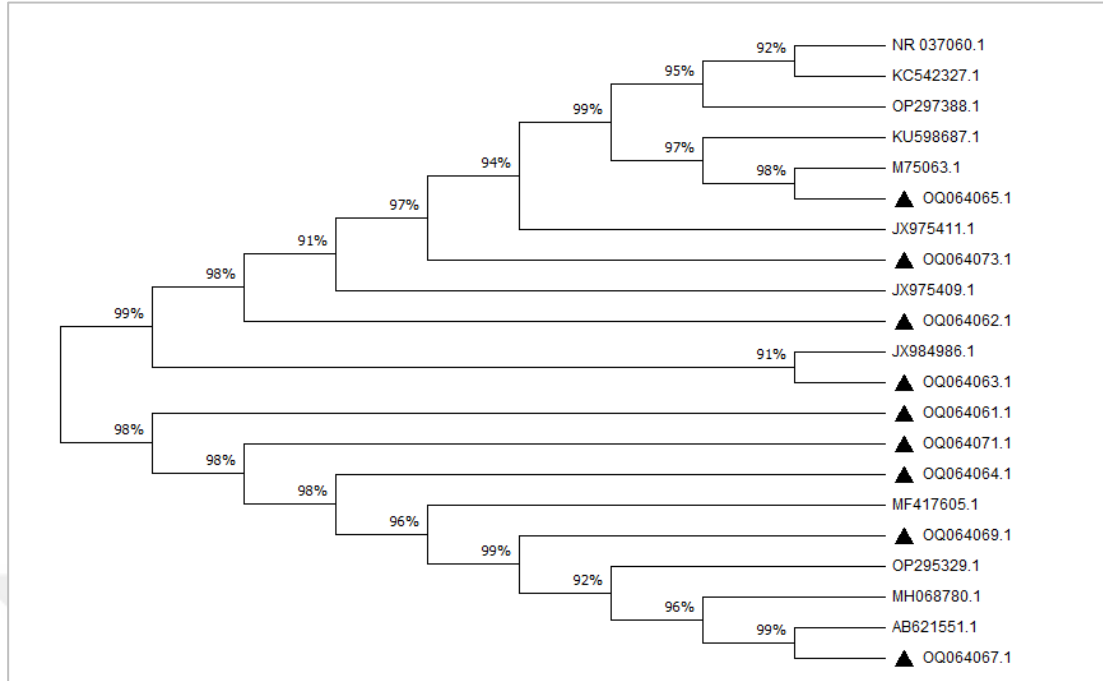
No	Kod	Konak türü	Etken	NCBI Gönderim kodu	NCBI Kayıt Kodu	NCBI Erişim No
1	S105P	Sığır	<i>P. multocida</i>	SUB12441343	S105PASTMUL	OQ064059.1
2	S3P	Sığır	<i>P. multocida</i>	SUB12441343	S3PASTMUL	OQ064060.1
3	S19M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	S19MANNHEM	OQ064061.1
4	S29M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	S29MANNHEM	OQ064062.1
5	S71M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	S71MANNHEM	OQ064063.1
6	S102M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	S102MANNHEM	OQ064064.1
7	S79M	Sığır	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	S79MANNHEM	OQ064065.1
8	S88P	Sığır	<i>P. multocida</i>	SUB12441343	S88PASTMUL	OQ064066.1
9	K83M	Koyun	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	K83MANNHEM	OQ064067.1
10	K15P	Koyun	<i>P. multocida</i>	SUB12441343	K15PASTMUL	OQ064068.1
11	K73M	Koyun	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	K73MANNHEM	OQ064069.1
12	K24P	Koyun	<i>P. multocida</i>	SUB12441343	K24PASTMUL	OQ064070.1
13	K38M	Koyun	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	K38MANNHEM	OQ064071.1
14	S63P	Sığır	<i>P. multocida</i>	SUB12441343	S63PASTMUL	OQ064072.1
15	K69M	Koyun	<i>M. haemolytica</i>	SUB12441343	K69MANNHEM	OQ064073.1
16	K17P	Koyun	<i>P. multocida</i>	SUB12441343	K17PASTMUL	OQ064074.1

16S rRNA gen bölgesinin dizilerine göre analiz edilen 21 *P. multocida* ve 21 *M. haemolytica* izolatlarının MEGA 11 programında Neighbor joining yöntemiyle filogenetik dendrogramı oluşturuldu (Şekil 1 ve Şekil 2).



Şekil 1: *P. multocida* izolatlarının global suşlar ile karşılaştırma dendrogramı (▲: bu çalışmada izole edilen *P. multocida* 'lara ait GenBank erişim numaraları)

*P. multocida* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine ait sekans verileri kullanılarak MEGA 11 programında Neighbor joining yöntemiyle yapılan filogenetik analiz sonucu oluşturulan dendrogramda mevcut çalışmaya ait suşların 2 ana küme içerisinde yer aldığı görüldü. Mevcut çalışmaya ait 4 sığır ve 1 koyun izolatu olmak üzere toplam 5 izolat (OQ064059.1, OQ064060.1, OQ064074.1, OQ064072.1, OQ064066.1) kendi içerisinde yüksek (%97) benzerlik göstermiş olup elde edilen dizilimlerde farklı taksonlarda yer aldı. Bu izolatlar içerisinde 4'ü (OQ064060.1, OQ064074.1, OQ064072.1, OQ064066.1) %99 benzerlikle monofiletik bir dağılım gösterirken, 1'i (OQ064059.13) parafiletik bir dağılım gösterdi. OQ064060.1 kodlu sığır izolatu ile OQ064074.1 kodlu koyun izolatu %89 benzerlikle aynı branşta yer aldı. Dendrogramın diğer kümesini oluşturan 2 koyun izolatu (OQ064068.1 ve OQ064070.1) ise kendi arasında parafiletik bir görünüm sergiledi (Şekil 1).



Şekil 2: *M. haemolytica* izolatlarının global suşlar ile karşılaştırma dendrogramı (▲ : bu çalışmada izole edilen *M. haemolytica* 'lara ait GenBank erişim numaraları)

*M. haemolytica* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine ait sekans verileri kullanılarak MEGA 11 programında Neighbor joining yöntemiyle yapılan filogenetik analiz sonucu oluşturulan dendrogramda mevcut çalışmaya ait suşların 2 ana küme içerisinde oldukça heterojen bir dağılım gösterdiği saptandı. Dendrogramın birinci kümesini, OQ064065.1, OQ064073.1, OQ064062.1 ve OQ064063.1 erişim numaralı 3 sığır ve 1 koyun izolatları oluşturup, bu izolatlar parafiletik bir dağılım gösterdi. Dendrogramın diğer kümesini ise OQ064061.1, OQ064071.1, OQ064064.1, OQ064069.1 ve OQ064067.1 erişim numaralı 2 adet sığır ve 3 adet koyun izolatları oluşturdu. Bu izolatlar arasında da parafiletik bir bağıntı mevcuttu (Şekil 2).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır ve koyunlarda solunum sistemi hastalıkları gerek ülkemizde gerekse dünyanın diğer ülkelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalığın ortaya çıkışında bakteri, virüs ve parazit gibi biyolojik etkenlerin yanı sıra, yetersiz beslenme, iklim değişikliği, yetersiz barınak şartları, taşıma gibi çeşitli çevresel faktörler ve stres etkili olmaktadır (Horwood ve Mahony 2011, Jesse ve ark. 2019).

Sığır ve koyunların solunum yollarında fırsatçı patojen olarak bulunan *P. multocida* ve *M. haemolytica*, konakçı immun sisteminin zayıfladığı durumlarda primer ve sekonder bakteriyel etkenler hastalık meydana getirebildiği gibi ayrıca sığır ve koyunlarda enzootik pnömoni, septisemi, pnömonik pastörelloz (shipping fever) ve mastitise neden olmaktadır (Harper ve ark. 2006, Dziva ve ark. 2008, Quinn ve ark. 2011, Ermilio ve ark. 2011, Castillo ve ark. 2017, Jesse ve ark. 2019).

Dünyanın birçok ülkesinde ve ülkemizde sığır ve koyunlarda solunum sistemi enfeksiyonlarına sebep olan *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle identifikasyonuna yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Dinler 1998, Sağlam ve ark. 1999, Gürbüz 2003, Kılıç ve Muz 2004, Kırkan ve Kaya 2005, Tel ve Keskin 2010; Konak 2012, Ülker ve ark. 2012, Tolera ve ark. 2019, Eser ve ark. 2020, Ashrafi ve ark. 2022).

Ashrafi ve ark. (2022), İran'da yaptıkları çalışmada kesimevlerinden aldıkları enfekte ve sağlıklı görünümlü 120 sığır akciğer örneğinden kültürel ve PZR yöntemleri sonucu 14 (%11,6)'ünde *P. multocida* ve 22 (%18,3)'ünde *M. haemolytica* olmak üzere 36 (%30)'sında pozitiflik tespit etmişlerdir. Tolera ve ark. (2019), Etiyopya'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada, 176 koyun ve sığır pnömonik akciğer örneğinin %13,07'sinde *M. haemolytica* ve %6,83'ünde *P. multocida* pozitifliği elde ederlerken, bu oranlar koyunlarda %14,46 ve %8,43 ve sığırlarda %11,83 ve %5,38 olarak belirlenmiştir. Bakteri izolasyon oranları özellikle gençlerde yüksek olmak üzere hayvanların yaşı, pnömoni varlığı ve entansif yetiştiricilikte daha yaygın olmak üzere

yetiştiricilik şekli ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kılıç ve Muz (2004), Elazığ yöresinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada 500 sığır pnömonili akciğer örneklerinin kültürel analizi sonucu 30 (%6)'unda *P. multocida* ve 9 (%1,8)'unda *M. haemolytica* pozitifliği elde etmişlerdir. Tel ve Keskin (2010), Şanlıurfa ilinden topladıkları 240 adet pnömonik koyun akciğer örneğinden kültürel yöntemlerle 76 (%31,6)'sında *P. multocida* ve 30 (%12,5)'unda *M. haemolytica* pozitifliği elde etmişlerdir. Kırkan ve ark. (2005), Aydın yöresinde mezbahanelerden aldıkları pnömoni semptomu gösteren 200 adet koyun akciğer örneğinin 24 (%12)'ünde *M. haemolytica* kompleksi izole ettiklerini bildirmişlerdir. Gürbüz (2003), Kars yöresinde incelediği 231 pnömonik akciğer örneklerinden, sığırlarda 32 (%26), koyunlarda ise 29 (%37,3) olmak üzere toplam 61 *P. haemolytica* saptamıştır. Ülker ve ark. (2012), Hatay yöresinde kesimi yapılan sığırlardan alınan pnömonik 122 akciğer örneğinin 3'ünden (%2,45) bakteriyolojik ve PZR yöntemleri ile *P. multocida* izole ve tanımlanmışlardır. Araştırmacılar, aynı örneklerden *M. haemolytica* izole edemediklerini bildirmişlerdir. Konak (2012), Afyonkarahisar yöresinde, sığırlardan alınan 650 akciğer, nazal svap ve trakeal yıkıntı örneğinin 48 (%7,4)'inden fenotipik yöntemler, serolojik yöntemler ve PZR ile *P. multocida* tanımlanmıştır. Çalışma yöresi olan Erzurum ilinde de koyun ve sığır pastörellozisi üzerine birçok araştırma gerçekleştirilmiştir. Dinler (1998), Erzurum yöresinde, pnömonili sığır akciğer örneklerinden kültürel yöntemlerle %5,9 *M. haemolytica*, %4,5 *P. multocida* izole ederken, Sağlam ve ark. (1999), 1993-1995 yılları arasında inceledikleri 47 pnömonili kuzu akciğer örneğinden *P. haemolytica* ve *P. multocida* pozitifliğini sırasıyla %40,42 ve %2,12 olarak bildirmişlerdir. Sonraki yıllarda bu pozitiflik kuzu pnömonilerinde *M. haemolytica* için %16 ve %56,14 olarak bildirilmiştir (Ülgen ve ark. 1997, Oruç 2006, Yüzbaşıgil 2010). Yörede, *Pasteurella* spp. kaynaklı koyun pnömonilerinde en güncel veriler Eser ve ark. (2020)'na ait olup araştırmacılar Erzurum'da bir mezbahaneden aldıkları pnömonik 100 koyun akciğer örneğinden bakteriyolojik yöntemlerle %17 *Pasteurella* spp. izole etmişlerdir. Bu çalışmada, *in vitro* kültürü gerçekleştirilen 200 adet pnömonili koyun ve sığır akciğer örneklerinde toplam *Pasteurella* spp. izolasyonu %8 olup, bu oran koyun pnömonili akciğer örneklerinde %7 ve sığır pnömonili akciğer örneklerinde ise %9 olarak değişmekteydi. *Pasteurella* etkenleri içerisinde tür dağılımı *P. multocida* için %3,5 ve *M. haemolytica* için %4,5

olarak değişmekteydi. *P. multocida* izolatlarının 4 (%4)'ü sığır ve 3 (%3)'ü koyun pnömonili akciğerlerine ait iken, *M. haemolytica* izolatlarının 5 (%5)'i sığır ve 4 (%4)'ü koyun pnömonili akciğerlerine aitti. Mevcut çalışmadaki identifikasyon bulguları birçok araştırma bulguları ile benzerlik gösterirken (Dinler 1998, Kılıç ve Muz 2004, Kırkan ve ark. 2005, Konak 2012, lker ve ark. 2012, Tolera ve ark. 2019, Ashrafi ve ark. 2022), diğer birçoğunda elde edilen pozitiflikten daha düşük kalarak farklılık arz etmektedir (lgen ve ark. 1997, Sağlam ve ark. 1999, Gürbüz 2003, Oruç 2006, Tel ve Keskin 2010, Yüzbaşıgil 2010). Bu durum, çalışmaların yapıldığı coğrafya, iklim, sezon ve yıl farklılıkları; çalışmalarda kullanılan materyal sayısı, orijinleri ve türü, materyalin pnömonik olguları temsil etme durumu, materyallerin elde edildiği konağın türü, yaşı, bakım ve beslenme şekli gibi farklılıklar; çalışmalarda kullanılan yöntem çeşitliliği gibi birçok faktörden kaynaklanabileceği düşündürmektedir. Ancak, mevcut çalışmada, yörede 1998'den beri bildirimleri başlayan ve farklı zaman dilimlerinde dalgalı bir seyir (pozitiflik oranı %2,12 ile %56,14 değişmektedir) izlenimi veren *Pasteurella* spp. varlığı bildirilen sınırlar içerisinde bir oran göstermiştir.

*Pasteurella* etkenlerinin tanımlanmasında kültürel yöntemlerin yanı sıra, korunaklı gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlayan PZR yöntemleri de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Diğer bakterilere kıyasla *in vitro* kültürü daha zahmetsiz olan *Pasteurella* etkenlerinin teşhisinde kültür ile PZR yöntemlerinin uyumu daha yüksektir (Deressa ve ark. 2010, Kumar ve ark. 2015, Gulaydin ve Gurturk 2018, Tabatabaei ve Abdollahi 2018). Mevcut çalışmada fenotipik yöntemlerle *P. multocida* (n= 7) ve *M. haemolytica* (n= 9) n tanısı konulan izolatların tümü tür spesifik PZR ile doğrulandı. Fenotipik yöntemlerle PZR yönteminin tanısal uyumu diğer çalışmalara (Güler ve ark. 2013, Kumar ve ark 2015) benzer şekilde oldukça yüksekti. Çok sayıda metabolik aktiviteyi eř zamanlı olarak kısa sürede test ederek yüksek tanısal doğruluk sağlayan otomatize identifikasyon sistemlerinin veteriner hekimlik alanında kullanımı henüz yaygınlık kazanmamıştır (Alarawi ve Saeed 2021). Ancak, uygulandığı takdir de otomatize identifikasyon sistemlerinin elde edilen izolatların antimikrobiyal aktivitelerini belirleme gibi önemli bir avantajı bulunmaktadır. Bu sistemlerin veteriner hekimlik alanında az sayıda kullanımı tanısal yeterlilikle ilgili kıyaslamaları

da sınırlamaktadır. Yine de bu çalışmada, fenotipik ve moleküler yöntemlerle identifikasyonu gerçekleştirilen 7 adet *P. multocida* ve 9 adet *M. haemolytica* izolatlarının tamamı Vitek 2 Compact identifikasyon sistemi ile benzer şekilde doğrulandı. Bu veriler, VITEK 2 Compact otomatize identifikasyon sisteminin, kültür ve PZR yöntemleri ile benzer ve yüksek tanısal doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir.

*Pasteurella* spp. kaynaklı koyun ve sığır pnömonilerinde enfeksiyonun kompleks seyri hastalıkla mücadelede etken spesifik antibakteriyel tedaviyi zorunlu kılmaktadır. Tedaviye başlama zamanı ve antibiyotiğin yeterli doz ve sürede kullanımının yanı sıra uygun antibiyotik seçimi tedavi başarısını olumlu yönde etkilemektedir. *Pasteurella* etkenlerinden ileri gelen enfeksiyonlarda daha çok betalaktam, tetrasiklin ve florokinolon gibi antibiyotikler ve sulfonamidler gibi antimikrobiyaller kullanılmaktadır (Gürel 2009). Ancak yaygın kullanılan bu antimikrobiyalere karşı hem *P. multocida* hem de *M. haemolytica* türlerinin yaygın ve güncel antimikrobiyal direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Ashrafi ve ark. (2022), İran'da enfekte ve sağlıklı sığır akciğer örneğinden elde ettikleri 14 *P. multocida* ve 22 *M. haemolytica* izolatının tümünü tularomisin duyarlı saptarken, penisilin ve eritromisine yüksek dirençlilik belirlemiştir. Katsuda ve ark. (2013), Japonya'da sağlıklı ve enfekte buzağılardan elde ettikleri 378 *P. multocida* izolatının 102 (%27)'sinin test edilen 9 antimikrobiyalden en az birine dirençli olduğunu, bunlar arasında oksitetrasiklin direnci en yaygın (%21,7) olmak üzere tiamfenikol, ampisilin, kanamisin, florfenikol direnci sırasıyla %13,2, %5,8, %9 ve %0,5 saptamıştır. Sefazolin, seftiofur, sefquinom ve enrofloksaine karşı tüm izolatların duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ülker ve ark. (2012), Hatay yöresinde, sığır pnömonik akciğer örneklerinden elde ettikleri 3 *P. multocida* izolatının, amoksisilin, amoksisilin-klavulanik asit, trimetoprim-sulfametoksazol, enrofloksasin ve penisilin-G'ye duyarlı olduğunu, eritromisin, oksitetrasiklin ve gentamisine ise %34'ünün dirençli olduğunu saptamışlardır. Konak (2012), Afyonkarahisar yöresinde, sığırlarda solunum yollarından elde ettikleri 48 *P. multocida* izolatının %95,8'inin florfenikole, %93,8'inin seftiofura, %91,7'sinin amoksisilin-klavulanik aside duyarlı olduğunu, izolatlar arasında oksitetrasiklin direncini %22,9, penisilin G ve eritromisin direncini

ise %20,8 olduğunu bildirmiştir. Tel ve Keskin (2010), pnömonik koyun akciğerlerinden elde ettiği 76 *P. multocida* izolatının 72 (%95)'sinin ampisilin ve amoksisilin, 74 (%97)'ünün norfloksasin ve tetrasiklin, 70 (%92)'inin sulfametaksazol-trimetoprim ve 66 (%87)'sının eritromisin, streptomisin ve gentamisin duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, *M. haemolytica* izolatlarının tamamı sulfametaksazol-trimetoprim ve norfloksasine, 29 (%97)'u gentamisin ve streptomisine, 27 (%90)'si eritromisine, 26 (%87)'sı tetrasikline, 18 (%60)'i ampisiline, 9 (%30)'u amoksisiline duyarlı saptanmıştır. Gülaydın ve ark. (2021), sığırların solunum yollarından izole ettikleri 59 adet *P. multocida* izolatının E-test yöntemiyle MİK değerlerini belirlemiş ve izolatların tamamını enrofloksasin, kloramfenikol ve gentamisine duyarlı, sefoksitine ise dirençli saptamışlardır. Ayrıca izolatlar arasında ampisilin direnci %88,14, tilmikosin direnci %64,41, klindamisin direnci %83,05 ve streptomisin direnci %59,32 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada, EUCAST'a göre *P. multocida* izolatlarının tamamının ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametaksazole ve 1 (%14,29)'inin doksisikline dirençli olduğu, CLSI'ye göre ise izolatların tamamının ampisilin ve amoksisilin-klavulonik asite, 3 (%42,86)'ünün enrofloksasine ve 5 (%71,43)'inin tetrasikline dirençli olduğu saptandı. Her iki manuele göre dirençli saptanan izolatların ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametoksazol MİK değerleri sırasıyla  $\leq 2 - \geq 32$  ug/ml,  $\leq 2$  ug/ml ve  $\leq 20 - 40$  ug/ml arasında değişmekteydi. Çalışmada EUCAST'a göre *M. haemolytica* izolatlarının tamamının trimetoprim-sulfametaksazole ve 4 (%44,44)'ünün ampisiline dirençli olduğu saptandı. CLSI'ye göre ampisiline tamamının, enrofloksasine 3 (%33,33)'ünün, tetrasikline 3 (%33,33)'ünün ve seftiofura 1 (%11,11)'inin dirençli olduğu saptandı. Her iki manuele göre dirençli saptanan izolatların ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametoksazol MİK değerleri sırasıyla  $\leq 2 - \geq 32$  ug/ml,  $\leq 2$  ug/ml ve  $\leq 20$  ug/ml olarak değişmekteydi. Bakteri özelinde ve bireysel antibiyotik duyarlılık/dirençliliğinde benzer oranlar ve MİK aralıkları elde edilse de (Ülker ve ark. 2012, Katsuda ve ark, 2013, Gülaydın ve ark. 2021), diğer çalışmalarla kıyaslandığında (Tel ve Keskin 2010, Konak 2012) mevcut çalışmada her iki etiyolojik etken için yüksek antimikrobiyal direncin saptanması, bölgesel antibiyotik kullanımının farklılığı ve yaygınlığından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlandı. Çalışmada,

EUCAST'a göre *P. multocida* izolatlarının 7 (%100)'sinde üçlü antibiyotik direnci ve 1 (%14,29)'inde dördü antibiyotik direnci gözlenirken, CLSI'ye göre izolatların 3 (%42,86)'ünde dördü antibiyotik direnci ve 7 (%100)'sinde ikili antibiyotik direnci saptandı. *P. multocida* izolatlarının EUCAST' ve CLSI'ye göre 7 (%100)'sinde en az ikili olmak üzere çoklu antibiyotik direnci mevcuttu. Yine, EUCAST'a göre *M. haemolytica* izolatlarının 4 (%44,44)'ünde ikili antibiyotik direnci gözlenirken, CLSI'ye göre izolatların 1 (%11,11)'inde üçlü antibiyotik direnci, 1 (%11,11)'inde farklı türde üçlü antibiyotik direnci, 2 (%22,22)'sinde ikili antibiyotik direnci ve 2 (%22,22)'sinde farklı türde ikili antibiyotik direnci saptandı. *M. haemolytica* izolatlarının EUCAST'a göre 4 (%44,44)'ünde ve CLSI'ye göre 5 (%55,56)'inde en az ikili olmak üzere çoklu antibiyotik direnci mevcuttu. *Pasteurella* türleri arasında genel çoklu antibiyotik direnç pozitifliği ise EUCAST'a göre %68,75 (n= 11) ve CLSI'ye göre %62,5 (n= 10) olarak belirlendi. Bu oranlar hem bakteri özelinde hem de test edilen antimikrobiyal madde özelinde yüksek olup bunun yansıması olarak yaygın çoklu antibiyotik direnç pozitifliğine yol açmıştır. Ayrıca çoklu antibiyotik dirençliliğin yüksek oluşu bu dirençliliğin tanımlamasında hesaba katılan dirençli antibiyotik sayısı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir ki, mevcut çalışmada iki ve üzeri antibiyotiğe direnç gelişimi çoklu antibiyotik direnci olarak ele alınmıştır. Yine de çoklu antibiyotik direnç pozitifliği birçok araştırmacı tarafından bildirilen (Klima ve ark. 2020, Bahr ve ark. 2021; Gülaydın ve ark. 2021) dirençli antibiyotik tür/kombinasyonuna ve direnç oranlarına benzer niteliktedir.

*Pasteurella* enfeksiyonlarının sağaltımında penisilin, tetrasiklin, sulfametoksazol-trimetoprim, aminoglikozid ve makrolidler gibi antibiyotikler yaygın kullanılmakta olup bu antibiyotiklere dirençten sorumlu olan yaygın direnç genleri arasında sırasıyla *blaROB-1*, *tet H*, *sul II*, *str A/aphA 1* ve *erm 42* bulunmaktadır (Klima ve ark. 2011, Gülaydın ve ark. 2021). Penisilinlerin haricinde, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar ve beta laktamaz inhibitörleri gibi beta-laktam antibiyotiklere dirence yol açan *CTX-M*, *TEM*, *SHV* ve *OXA* direnç genleri de tanımlanmıştır (Michael ve ark. 2012, Elsayed ve ark. 2021). Gülaydın ve ark. (2021), sığırlardan izole edilen fenotipik olarak penisilin ve ampisilin dirençliliği bulunan 4 adet *P. multocida* izolatının 3 (%75)'ünde *blaROB-1*, tetrasiklin dirençliliği bulunan

21 adet izolatın 20 (%95,24)'sinde *Tet H* ve 1 (%4,76)'inde *Tet B* ve trimetoprim-sulfametoksazol dirençliliği bulunan 23 izolatın tamamında *Sul II* direnç geni bildirmiştir. Sahay ve ark. (2020), koyun solunum sisteminden elde ettiği *M. haemolytica* ve *P. multocida* izolatları arasında *blaOXA-2*, *blaROB-1* ve *Sul 2* direnç gen varlığını sırasıyla %11,11 ve %0, %3,7 ve %0, %22,22 ve %42,86 saptamışlardır. İzolatlar arasında *Tet H* ve *AaDB* gen pozitifliğine rastlanılmamıştır. Susmitha ve ark. (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada pnömonik koyun akciğerlerinden elde ettikleri *P. multocida* izolatları arasında %42,8 *Tet B* pozitifliği saptanırken, izolatlar *Sul 2* yönünden negatif bulunmuştur. Mevcut çalışmada, *P. multocida* izolatlarının 5 (%71,43)'inde *AaDA25*, 3 (%42)'ünde *AaDB*, 4 (%57,14)'ünde *Tet H*, 6 (%85,71)'sında *Sul 2*, 7 (%100)'sinde *blaOXA58* ve 7 (%100)'sinde *blaTEM* antibiyotik direnç genleri tespit edildi. *M. haemolytica* izolatlarının 6 (%66,67)'sında *AaDA25*, 7 (%77,78)'sinde *AaDB*, 7 (%77,78)'sinde *Sul 2*, 2 (%22,22)'sinde *blaOXA58* ve 9 (%100)'unda *blaTEM* antibiyotik direnç genleri tespit edildi. *Pasteurella* türleri arasındaki antibiyotik direnci, coğrafi konum, profilaktik veya sağaltım amaçlı antibiyotik ön tedavisi varlığı, alınan antibiyotik dozu ve alışı süresi gibi dış faktörlerin yanı sıra, izolatların gen havuzunda direnç genlerini barındırma yetenekleri ve bunların saptanabilirliğine de bağlıdır. Dolayısıyla diğer çalışmalarla kıyaslandığında antibiyotik direnç gen varlığındaki bu oransal farklılıklar normal karşılanmaktadır. Yine de her iki etiyolojik etken için bilinen antibiyotiklere karşı fenotipik olarak yüksek oranda ve çoklu bir şekilde saptanan direnç varlığına paralel olarak direnç gen çeşitliliği ve frekansları da yüksek saptandı. Bu durum, genellikle plazmid kaynaklı olan ve kolay aktarılabilir özelliği ile solunum sistemi yerleşkesi olan diğer bakterilere yatay yolla transferi olasılığı endişesini de beraberinde getirmektedir.

16S rRNA prokaryotik mikroorganizmalarda oldukça korunaklı bir gen bölgesidir. 16S rRNA dizileme, yeni bakterilerin tanımlanmasında, taksonomik çalışmalarda ve epidemiyolojik araştırmalarda ve filogenetik analizinde değerli sonuçlar sağlamaktadır (Janda ve Abbott 2007). 16S rRNA sekanslama, *Pasteurella* türlerinin tanımlanmasında, filogenetik analizlerinde, genetik çeşitliliklerinin ortaya konulmasında ve taksonomik araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Angen

ve ark. 1999; Davies, 2004; Dey ve ark. 2007; Hassan ve ark. 2016; Narcana ve ark. 2020). 16S rRNA sekanslamasının *Pasteurella* türleri için ilk kullanımı, *P. haemolytica* olarak tanımlanan suşun *M. haemolytica* olarak yeniden klasifikasyonun gerçekleştirildiği taksonomik çalışma olmuştur (Angen ve ark. 1999). Takiben, Dey ve ark. (2007), bufalo, sığır, domuz, koyun ve keçiden elde ettiği *P. multocida* B:2 izolatlarının 16S rRNA sekans analizi sonucu izolatlar arasında yüksek homoloji saptamışlardır. Hassan ve ark. (2016), benzer şekilde, koyun, sığır ve bufalo *P. multocida* izolatları arasında varyasyonu belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada 16S rDNA ve KMT1 gen sekansı sayesinde sığır ve koyun izolatları arasındaki yakın ilişkilerden ziyade, manda ve sığırlardan izolatları arasında daha yüksek bir benzerlik saptamışlardır. 16S rRNA sekanslama, aynı konak türü içerisinde sirküle olan *P. multocida* izolatları arasındaki ilişkiyi belirlemek için de kullanılmıştır (Taylor ve ark. 2014). Mevcut çalışmada, identifiye edilen 7 adet *P. multocida* ve 9 adet *M. haemolytica* izolatının filogenetik benzerlikleri, 16S rRNA gen sekanslarının MEGA 11 programında Neighbor joining yöntemiyle analizi sonucu oluşturulan dendrogramlar eşliğinde yorumlandı. Ortak atadan geldiği düşünülen 4 sığır ve 1 koyun izolatı (OQ064059.1, OQ064060.1, OQ064074.1, OQ064072.1, OQ064066.1) dendrogramın birinci kümesinde yer aldı. Kendi içerisinde yüksek (%97) benzerlik gösteren bu kümeye ait izolatlar, GenBank'tan elde edilen dizilimlerine göre farklı taksonlarda yer aldı. Bu 5 izolat, İngiltere ve Galler'de 1987-1999 yılları arasında çoğunlukla enfekte hayvanlardan elde edilen İngiliz suş koleksiyonuna ait bir adet pnömonili sığır *P. multocida* subsp. *multocida* PM564 suşu (AY299306.1) (Davies, 2004) ile kardeş taksonda yer aldı. Dendrogramın diğer kümesini oluşturan 2 adet koyun *P. multocida* izolatı (OQ064068.1 ve OQ064070.1) ise kendi arasında parafiletik bir görünüm sergilemiş olup, OQ064068.1 kodlu izolat, Hindistan'da 2015 yılında pnömonik koyunlardan elde edilen *P. multocida* strain NIVEDI/PMS-4 (KU585899.1) (Swati ve ark. 2016) ile yakın taksonda yer aldı. OQ064070.1 kodlu izolat ise ilgili kümenin dış taksonunu oluşturdu. *M. haemolytica* izolatları da 2 ana küme içerisinde oldukça heterojen bir dağılım sergiledi. Birinci küme, OQ064065.1, OQ064073.1, OQ064062.1 ve OQ064063.1 kodlu 3 sığır ve 1 koyun izolatından oluşmaktaydı ve bu izolatlar parafiletik bir dağılım sergiledi. OQ064065.1 kodlu sığır izolatı, Edinburgh Enstitüsü tarafından 1968 yılında kuzu nazofaringeal mukusundan

saptanan *M. haemolytica* NCTC 10624 suşu (M75063.1) (Dewhirst ve ark. 1993) ile yakın taksonda yer alırken, OQ064073.1 kodlu koyun izolatu ve OQ064062.1 kodlu sığır izolatu ise dış taksonları oluşturdu. Dış taksonun diğer bir üyesi olan OQ064063.1 kodlu sığır izolatu ise Kang ve ark. (2012) tarafından bildirilen koyun akciğerine ait *M. haemolytica* strain XJNKY-125-YF1 suşu ile aynı taksonda yer aldı. Dengrogramın diğer kümesini ise OQ064061.1, OQ064071.1, OQ064064.1, OQ064069.1 ve OQ064067.1 kodlu 2 adet sığır ve 3 adet koyun izolatu oluşturdu. Bu izolatlar arasında da parafletik bir bağıntı mevcuttu. OQ064067.1 kodlu koyun izolatu, Katsuda ve ark. (2012) tarafından bildirilen *M. haemolytica* Th1405 suşu ile aynı taksonda yer alırken, diğer 4 izolat oldukça uzak bir filogenetik pozisyon sergiledi. Genel olarak bakıldığında, iki ayrı filogenetik pozisyonda (küme) yer almalarına rağmen *P. multocida* izolatlarının birbirlerine olan yakınlıkları, *M. haemolytica* izolatlarına kıyasla daha fazla saptandı. 16S rRNA gen sekanslama, ülkeler arası sınır komşuluğundan dolayı olası olan ortak ata epidemilerini ve farklı coğrafyalara ait suş benzerliklerini ortaya çıkarabilmektedir. Ancak, 16S rRNA gen sekansı sonrası *Pasteurella* izolatlarının çeşitli kümelere taksimine yönelik bir üniformite olmadığı için farklı çalışmalardan elde edilen bakteri konumları birbirleri ile tam olarak örtüşmemekte ve ayrı taksonlarda yer almaktadır. Uzak coğrafyalara ait suş benzerlikleri ise genelde tesadüften ibarettir. Bu benzerliklerin bir nedeni de gen bankalarında ülkeleri temsil eden sekans verilerinin ve standart taksonların yetersizliğidir. Mevcut çalışmada, bazı *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatları, Britanya ve Hindistan gibi ülkemize oldukça uzak coğrafyaların izolatları ile benzeştirilmeye ve filogenetik ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Ülkemizde koyun ve sığırlarda solunum sistemi infeksiyonlarından sorumlu *Pasteurella* türlerine ait sekans verileri oldukça eksiktir. Dolayısıyla, mevcut çalışmada elde edilen izolatların, ülkemize coğrafi olarak yakın olmayan ülkelerin izolatları ile filogenetik benzerlik göstermesi şaşırtıcı değildir. Ülkeye özgü sekans verilerinin artması ve yeni taksonların oluşturulması ile bu suş benzerlikleri yeniden yorumlanabilecektir.

**Sonuç olarak,** bu çalışmada, Erzurum yöresinde mezbahanelerde kesimi yapılan 100 adet sığır ve 100 adet koyun pnömonili akciğer örneklerinden *Pasteurellaceae* 'nin kültür pozitifliği %8 saptandı. Fenotipik yöntemler, otomatize sistem (Vitek 2 Compact sistem) ve moleküler yöntemlerle (PZR) identifikasyon sonucu *Pasteurella* türlerinin dağılımı 7 adet *P. multocida* ve 9 adet *M. haemolytica* olarak belirlendi. Sığırlarda *P. multocida* pozitifliği %4 ve *M. haemolytica* pozitifliği %5 iken, koyunlarda *P. multocida* pozitifliği %3 ve *M. haemolytica* pozitifliği %4 olarak tespit edildi. Mevcut çalışmada, Erzurum yöresinde 1990'lı yılların sonlarına doğru bildirimleri başlayan sığır ve koyun *Pasteurella* enfeksiyonlarının yaygınlığına benzer bir pozitiflik (%8) elde edildi. Hemorajik septisemi ve pnömoni başta olmak üzere hayvanlarda akut olgularda ölüm ve kronik olgularda verim düşüklüğüne yol açarak önemli ekonomik kayıplar oluşturan *Pasteurella* enfeksiyonlarının yaygınlığı (%8), yörede aşılama başta olmak üzere predispozisyon oluşturacak faktörlerin azaltılması ve hayvan refahının yükseltilmesine yönelik programların uygulamasını gerekli kılmaktadır. *Pasteurella* türlerinin identifikasyonunda VITEK 2 Compact identifikasyon sistemi ile PZR'nin tanısal uyumu %100 olarak saptandı. Bu bulgular, sığır ve koyunlarda pnömoni vakalarının hızlı ve doğru tanısında PZR ve VITEK 2 Compact otomatize identifikasyon sisteminin tanısal yeterliliğini de ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, tanımlanan 7 adet *P. multocida* ve 9 adet *M. haemolytica* izolatının antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 Compact sistemi ile gerçekleştirildi ve sonuçlar EUCAST ve CLSI manuellere göre yorumlandı. *P. multocida* izolatları arasında ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve trimetoprim-sulfametaksazol direnci oldukça yüksek olup, izolatların seftiofur ve doksisiklin duyarlılıkları ise yüksekti. *P. multocida* izolatlarının en az %71,43'ünde çoklu antibiyotik direncine rastlanıldı. *M. haemolytica* izolatları arasında ampisilin ve trimetoprim-sulfametaksazol direnci oldukça yüksek olup, izolatların amoksisilin-klavulonik asit, doksisiklin ve seftiofur duyarlılığı yüksekti. *M. haemolytica* izolatlarının en az %44,44'ünde çoklu antibiyotik direncine rastlanıldı. VITEK 2 Compact sistemi ile fenotipik olarak yüksek antibiyotik direnci saptanan *P. multocida* ve *M. haemolytica*

izolatlarının bu bulgularına paralel olarak ilgili antibiyotiklere dirençten sorumlu olan gen pozitiflikleri de yüksek saptandı.

Ayrıca, izolatlar arasında çoklu antibiyotik direnç gen varlığı ve farklı direnç gen kombinasyonlarına da rastlanıldı. Gelişmiş ve uzun süre antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan yüksek antibiyotik direnci veteriner hekimlik alanında *Pasteurella* spp. kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak antibiyotik seçeneklerini sınırlandırmaktadır. Yine de bu çalışmada da saptandığı gibi seftiofur ve doksisisiklin, *Pasteurella* kaynaklı pnömonilerin tedavisinde henüz ilk tercih edilebilecek antimikrobialer olarak görülmektedir. Ancak, farklı konaklardan periyodik olarak elde edilecek izolatların karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılık profillerinin ortaya konulması ve dirence yol açacak genetik alt yapının belirlenmesi *Pasteurella* enfeksiyonlarının eradikasyonuna katkı sağlayacak faydalı uygulamalar olarak yerine getirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, fenotipik karakterlerine göre *P. multocida* ve *M. haemolytica* olarak tanımlanan izolatların 16S rRNA sekans analizleri sonucu identifikasyonları yüksek doğrulukla (%100) teyit edildi. Ayrıca, bu lokal suşlara benzer konaklardan elde edilen mikroorganizmalarla kıyaslanarak filogenetik bir pozisyon kazandırıldı. Enfeksiyöz etkenlerin teşhisi, varyant analizi ve taksonomik güncellemelerde büyük fayda sağlayan sekans analizleri ve filogenetik gruplandırmalara yönelik araştırmalar giderek yaygınlaşmakta olup, mevcut çalışmada da olduğu gibi tanısal başarısı yüksek, ucuz ve kolay erişilebilen bu teknolojinin *Pasteurella* enfeksiyonlarının teşhisine entegre edilebileceği ve hatta konvansiyonel yöntemlere alternatif olabileceği öngörülebilir.

Sığır ve koyun pnömonilerinde etiyolojik etken olarak *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın yaygınlığı, antibiyotik duyarlılıklarının ve mevcut dirençliliklerine ait genetik mekanizmaların belirlenmesi gibi lokal davranışlarının yanı sıra evrensel suş koleksiyonundaki filogenetik yerlerinin belirlenmesi gibi küresel davranışlarının da belirlendiği bu çalışmaya ait verilerin, *Pasteurella* spp. kaynaklı pnömoni olgularının eradikasyonunda fayda sağlayacağı umulmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

Abubakr HS, Iskander D, El Shafei AA. *Pasteurella multocida* in cows: identification of the isolates by vitek2 system and detection of toxigenic strains by one-step elisa. J Anim Health Prod 2020; 9 (s1): 121-127.

Adamu JY. *Mannheimia haemolytica*: Phylogeny and genetic analysis of its major virulence factors. IJVM 2007; 62 (1): 6-13.

Ahmet M. Colonisation of the ovine respiratory tract by *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*, Master Thesis, New Zealland, Massey University, 2003.

Aitken ID (Ed.), Angus KW, Buxton D, Chianini F, Coop RL, Donachie W, et al. Pasteurellosis; Diseases of Sheep. UK: Blackwell Publishing Company; Pp. 224-231, 2007.

Al-Ghamdi MG, Ames RT, Baker CJ, Walker R, Chase CCL, Frank HG, et al. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from The Upper Midwest United States. J Vet Diagn Invest 2000; 12: 576-578.

Alarawi, FA and Saeed EMA Isolation, antibiogram and molecular detection of *Mannheimia* and *Pasteurella* associated with pneumonia in sheep in Al-Madinah Region, Saudi Arabia. Int J Vet Sci 2021; 10 (2): 135-140.

Angen O, Muters R, Caugant DA, Olson JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the *Pasteurella haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencings with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1999; 49, 67-86.

Ashrafi F, Azari AA, Fozouni L. Prevalence and antibiotic resistance pattern of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from cattle lung samples from an industrial abattoir: A study from Northeastern Iran. Iranian J Vet Med 2022; 16 (4): 414-422.

Avril JL, Donnio PY, Pouedras P. Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. J Clin Microbiol 1990; 28: 1438-1440.

Aydın N. *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Haemophilus* ve *Actinobacillus* İnfeksiyonları. Veteriner Mikrobiyoloji. Aydın N, Paracıkoğlu J. İlke Emek Yayınları, Ankara.173-193, 2006.

Bahr AD, Salib FA, Soliman YA, Amin MA. Multi-drug resistant *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* strains isolated from different hosts affected by pneumonic pasteurellosis in Egypt. Adv Anim Vet Sci 2021; 9 (3): 356-364.

Biberstein EL, Gills M, Knight H. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell Vet 1960; 50: 283-300.

Bisgaard M, Houghton SB, Muters R, Stenzel A. Reclassification of German, British and Dutch isolates of so-called *Pasteurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. Vet Microbiol, 1991; 26, 115-124.

Bisping W, Amtsberg G. Gram-negative, aerobic or microaerophilic or facultatively anaerobic rods, with simple culture requirements. Colour Atlas for The Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals. Paul Parey Scientific Publishers, Hamburg. Pp. 108-120, 1995.

Bosch M, Garrido E, Llagostera M, De Rozas AMP, Badiola I, Barbe J. *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. FEMS Microbiol Lett 2002b; 210: 201-208.

Boyce JD, Adler B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). Infect Immun 2000a; 68: 3463-3468.

Boyce JD, Chung JY, p Adler B. *Pasteurella multocida* capsule: Composition, function and genetics. Journal of Biotechnology. 2000b; 83(1-2): 153-160.

Boyce JD, Haerper M, Wilkie IW, Adler B. *Pasteurella*. Pathogenesis of Bacterial Infections. In: Animals. Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. Blackwell Publishing, USA. 325-337, 2010.

Burrill TJ. New species of Micrococci (bacteria). Am Nat 1883; 17: 319-320.

Carter GR. A haemagglutination test for identification of serological types. Am J Vet Res, 1955; 16: 481-484.

Carter GR, Chengappa MM. Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. J Clin Microbiol 1980; 11: 94-96.

Carter GR. Further observations on typing *Pasteurella multocida* by the indirect Hemagglutination test. Can J Comp Med Vet Sci 1962; 26: 238-240.

Castillo JLR, Valencia GL, Monge-Navara FJ, Medina-Basulto GE, Hori-Oshima S, Cueto-Gonzalez SA, et al. Detection and economic impact related to bovine respiratory disease, shrink, and traveling distance in feedlot cattle in Northwest Mexico. Turk J Vet Anim Sci 2017; 41: 294-301.

Catry B, Dewulf J, De Kruif A, Vanrobaeys M, Haesebrouck F, Decostere A. Accuracy of susceptibility testing of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*. Microb Drug Resist 2007; 13 (3): 204-211.

Christensen H, Bisgaard M, Angen Q, Frederiksen W, Olsen JE. Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. Journal of Clinical Microbiology 43 (1): 259-270, 2005.

Christensen H, Bisgaard M. Revised definition of *Actinobacillus* sensu stricto isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis. Vet Microbiol 2004; 99: 13-30.

Christensen H, Bojesen AM, Bisgaard M. *Mannheimia caviae* sp. nov. isolated from epidemic conjunctivitis and otitis media in guinea pigs. Int J Syst Evol Microbiol 2011; 61: 1699-1704.

Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Adler B. Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. Vaccine 2005; 23: 2751-2755.

Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghoddusi M, et al. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. Infection and Immunity. 2001; 69 (4): 2487-2492.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-066-9 [Print]; ISBN 978-1-68440-067-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

Confer AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. Anim Health Res Rev 2009; 10 (2): 145-148.

Dabo S, Confer AW, Montelongo M, Lu YS. Characterization of rabbit *Pasteurella multocida* isolates by use of whole-cell, outer-membrane, and polymerase chain reaction typing. Lab Anim Sci, 1999; 49, 551-559.

Dabo SM, Confer AW, Quijano Blas RA. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: Evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. Microb Pathog 2003; 35: 147-157.

Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev, 2008; 8 (2), 129-150.

Davies RL. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. Microbiology (Reading). 2004; 150 (Pt 12): 4199-1210.

De Alwis MCL. Haemorrhagic septicaemia. Australian Centre For International Agricultural Research. Aciar Monograph, Australia 1999; 1-141.

De Angelis PL, Padgett Mccu AJ. Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. J Biol Chem 2000; 275: 24124-24129.

De Jong MF. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. Straw BE, D'allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Diseases of Swine. Iowa State University Press, Iowa. Pp: 355-384, 1999.

Deangelis PL, White CL. Identification of a distinct, cryptic heparosan synthase from *Pasteurella multocida* types A, D, and F. J Bacteriol 2004; 186: 8529-8532.

De Angelis PL. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase. Biochemistry 1996; 35: 9768-9771.

Dengiz Orhan, Turan İnci Demirbağ, Özkan Barış Erzurum İli Temel Coğrafi Özellikleri ve Potansiyel İşlemeli Tarım Alanı Varlığı, 2019; DOI: 10.17097/ataunizfd.485163)

Deressa A, Asfaw Y, Lubke B, Kyule MW, Tefera G, Zessin KH. Molecular detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in sheep respiratory infections in Ethiopia. *Int J Appl Res Vet Med* 2020; 8, 101-108.

Dewhirst FE, Paster BJ, Olsen I, Fraser GJ. Phylogeny of the *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences. *Zentbl Bakteriol* 1993; 279: 35-44.

Dey S, Singh VP, Kumar AA, Sharma B, Srivastava SK, Singh N. Comparative sequence analysis of 16S rRNA gene of *Pasteurella multocida* serogroup B isolates from different animal species. *Res Vet Sci.* 2007 Aug;83(1):1-4.

Dinler U. Pnömonili sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu ve identifikasyonu. *Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1998.*

Doughty SW, Ruffolo CG, Adler B. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 2000; 72: 79-90.

Dungworth DC. The respiratory system, in 'Pathology of Domestic Animals'. Editor, Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, Pp: 448-489, Academic Press, Orlando, 1985.

Dziva F, Muhairwa AP, Bisgaard M, Christensen H. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 2008; 128: 1-22.

Dziva F, Christensen H, van Leengoed LA, Mohan K, Olsen JE. Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. *Vet Microbiol* 2004; 102, 117-122.

Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extendedspectrumlactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Chemother Agent* 2003;47:3724-32.

El Dokmak MM, Khalil SA, Ebied SKHM. Genetic diversity of *Mannheimia haemolytica* strains. *AJVS.* 2015; 47: 166-174.

Elsayed MSAE, Eldsouky SM, Roshdy T, Said L, Thabet N, Allam T, et al. Virulence determinants and antimicrobial profiles of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and humans in Egypt. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10 (5): 480.

Erbaş G, Kaya O. Aydın ve İzmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi;* 2008; 30: 7-14.

Ermilio EM, Smith MC. Treatment of emergency conditions in sheep and goats. *Vet Clin Food Anim.* 2011; 27: 33-45.

Eser G, Yildirim S, Sağlam Y, Çelebi D, Yılmaz A. Koyun Pnömonilerinde *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* izolasyonu ve patolojik incelemeler. Atatürk Üniv Vet Bilim Derg 2020; 15, 122-129.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. MIC Distributions and Epidemiological Cut-Off Value (ECOFF) Setting, EUCAST SOP 10.2. 2021.

Ewers C, Lübke-Becker A, Bethke A, Kiebling S, Filter M, Wieler LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet Microbiol, 2006; 114, 304-317.

Ferry NS, Hoskins HP. Bacteriology and control of Contagious nasal catarrh (snuffles of rabbits). J Lab Clin Med 1920; 5: 311-318.

Fillion LG, Cho HJ, Shewen PE, Raybould TJG, Wilkie BN. Comparison of serological techniques to measure antibody to *Pasteurella haemolytica* A1. Can J Comp Med 1985; 49, 99-103.

Friton GM, Cajal C, Ramirez-Romero R. Longterm effects of meloxicam in the treatment of respiratory disease in fattening cattle. Veterinary Record, 2005; 156: 809-811.

Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. Microb Pathog 2000; 29: 25-38.

Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA, Caswell JL. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. J Vet Diagn Invest 2006; 18, 18-28.

Gamaleia N. Zur Aetiologie der Huhnercholera. Zentralbl. Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig 1988 4: 161-168.

Garcia-Alvarez A, Garayzabal JF, Chaves F, Pinto C, Cid D. Ovine *Mannheimia haemolytica* isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. Vet Microbiol 2018; 219: 80-86.

Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Vol., 2 The Proteobacteria, Part B. The Gammaproteobacteria, 2004.

Gray Owen SD, Schryvers AB. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. Trends Microbiol 1996; 4: 185-191.

Griffin D. Feedlot diseases. Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice, 1998; 14, 199-231.

Gulaydın O, Gurturk K. Identification of *Pasteurella multocida* strains isolated from respiratory tract of healthy and diseased cattle and determination of capsular types by PCR". Van Vet J 2018; 29, 143-146.

Gulaydin O, Gurturk K, Ekin İ, Ozturk C. Determination of MIC values of various antimicrobial agents and presence of resistance genes in *Pasteurella multocida* strains isolated from bovine. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2021; 27 (2): 217-224.

Güler L, Gündüz K, Sarışahin AS. Capsular typing and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from different hosts. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2013; 19 (5): 843-849.

Güneş V, Onmaz AC, Ulusan M. Neonatal buzağuların solunum sistemi hastalıkları. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Science*, 2013; 4, 86-94.

Gürbüz A. Sığır ve koyunlara ait pnömonili akciğerlerden *Pasteurella haemolytica*'nın izolasyonu, identifikasyonu, biyotiplendirilmesi ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi, Doktora Tezi, Kars, Türkiye, 2003.

Gürel H. Sığırlarda solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler. *Vet Hekim Der Derg* 2009; 80 (3): 29-33.

Hadjadj L, Bentorid AA, Michelle C, Amoura K, Djahoudi A, Rolain JM. Genome sequence and description of *Mannheimia massilioguelmaensis* sp. nov. *New Microbe and New Infect* 2015; 8: 131-136.

Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett*, 2006; 265, 1-10.

Harper M, Cox A, St Michael F, Parnas H, Wilkie I, Blackall PJ, Adler B, Boyce JD. Decoration of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide with phosphocholine is important for virulence. *J Bacteriol* 2007; 189, 7384-7391.

Harper M, Cox AD, Adler B, Boyce JD. *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide: The long and the short of it. *Vet Microbiol* 2011; 153: 109-115.

Hassan GM, El-Feky ZA, Eissa EA, Teleb AA. Rapid diagnosis of virulent *Pasteurella multocida* isolated from farm animals with clinical manifestation of pneumonia respiratory infection using 16S rDNA and *KMT1* gene. *Asian Pac J Trop Dis* 2016; 6 (1): 21-26.

Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 2010; 144, 1-17.

Hauglund MJ, Tatum FM, Bayles DO, Maheswaran SK, Briggs RE. Genome sequences of serotype A6 *Mannheimia haemolytica* isolates D174 and D38 recovered from bovine pneumonia. *Genome Announc* 2015; 3 (2): 15-16.

Heddleston K, Gallagher J, Rebers P. Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Diseases* 1972; 925-936.

Heddleston KL, Watko LP, Rebers PA. Dissociation of a fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 1964; 8, 649-657.

Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6, 1128-1150.

Horwood PL, Mahony TJ. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex. *J Virol Methods*, 2011; 171, 360-363.

Hosoglu S, Gundes S, Kolaylı F, Karadenizli A, Demirdağ K, Günaydın M, et al. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in ceftazidime resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. *Indian J Med Microb* 2007; 25, 346-350.

Hounscome JDA. Comparative outer membrane proteomic analyses of bovine and ovine isolates of *Mannheimia haemolytica* and *Mannheimia glucosida*, PhD thesis, UK, University of Glasgow, 2012.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU585899.1/>. Erişim: 05.12.2022

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/429841829>. Erişim: 05.12.2022

Hunt ML, Adler B, Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 2000; 72, 3-25.

Hussaini SN. Nomenclature and taxonomy of *Pasteurella multocida*. *Vet Bull* 1975; 45:403409.

Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (9): 2761-2764.

Jesse FFA, Mubin HNA, Hambali IU, Lila MAM, Chung ELT, Abba Y, et al. Review on clinical management involving respiratory diseases in ruminants. *Adv Anim Vet Sci* 2019; 7 (4): 321-325.

Kalhoru DH, Rind R, Kalhoru MS, Zeb A, et al. Characterization and biochemical behavior assessment of vaccinal strain of *Pasteurella multocida* Type 1 B6. *IJAVMS* 2015; 9 (1): 29-35.

Karahan Ş, Ekin İH. Pnömonili sığır akciğer örneklerinde *Mycoplasma bovis*'in real time PCR ile araştırılması XIV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (ss.148-149). Konya, Türkiye, 2020.

Katsuda K, Hoshino K, Ueno Y, Kohmoto M, Mikami O. Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. *Vet Microbiol* 2013; 167, 737-741.

Katsuda K, Kohmoto M, Mikami O, Uchida I. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. *Vet Microbiol* 2009; 139 (1-2): 74-79.

Katsuda K, Kohmoto M, Mikami O, Tamamura Y, Uchida I. Plasmid-mediated florfenicol resistance in *Mannheimia haemolytica* isolated from cattle. *Vet Microbiol* 2012;155 (2-4): 444-447.

Kılıç A, Muz A. Pnömonili sığır akciğerlerinden bakteri izolasyonları ve izole pasteurella'ların polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. Turkish J Vet Anim Sci, 2004; 28 (1): 217-223.

Kırkan Ş, Kaya O. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* strains isolated from pneumonic lungs of sheep in the Aydın Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29, 491-494.

Kisiela DI, Czuprynski CJ. Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. Infect Immun, 2009; 446-455.

Kitt T. Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit. Sitzungsber. Ges Morphol Physiol Muenchen 1885; 140-168.

Kitt T. Septicaemia haemorrhagica, Pp: 302-308. In: Kitt T (Ed.), Bacterienkunde und pathologische Mikroskopie für Thierärzte und Studierende der Thiermedizin, 2nd ed. Moritz Perles, Vienna, 1893.

Klima CL, Alexander TW, Hendrick S, McAllister AT. Characterization of *Mannheimia haemolytica* isolated from feedlot cattle that were healthy or treated for bovine respiratory disease. Can J Vet Res 2014; 78 (1): 38-45.

Klima CL, Zaheer R, Briggs RE, McAllister TA. A multiplex PCR Assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2, and 6. J Microbiol Methods 2017; 139, 155-160.

Klima CL, Holman DB, Cook SR, Conrad CC, Ralston BJ, Allan N, et al. Multidrug resistance in *Pasteurellaceae* associated with bovine respiratory disease mortalities in North America From 2011 to 2016. Front Microbiol 2020; 11:606438.

Knight DP, Paine JE, Speller DCE. A selective medium for *Pasteurella multocida* and its use with animal and human specimens. J Clin Pathol 1983; 36, 591-594.

Konak S. Afyonkarahisar İlinde Sığırlardan *Pasteurella multocida* İzolasyonu, Tiplendirilmesi, Antibiyotik Duyarlılığı ve Bazı Virulens Genlerinin PCR ile Belirlenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Afyon, 2012.

Kubatzky KF. *Pasteurella multocida* and immune cells. Curr Top Microbiol Immunol 2012; 361, 53-72.

Kuhnert P, Christensen H. *Pasteurellaceae*: Biology, genomics and molecular aspects. Caister Academic Press, UK, 2008.

Kumar J, Dixit SK, Kumar R. Rapid detection of *Mannheimia haemolytica* in lung tissues of sheep and from bacterial culture. Vet World 2015; 8: 1073-1077.

Laishevstev AI. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci 2020; 548:072038.

Lane DJ. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E and Goodfellow M (Eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. John Wiley and Sons, New York, 1991. Pp. 115-175.

Lee RWH, Cornelisse M, Ziauddin A, Slack PJ, Hodgins DC, Strommer JN, et al. Expression of a modified *Mannheimia haemolytica* gs60 outer membrane lipoprotein in transgenic alfalfa for the development of an edible vaccine against Bovine Pneumonic Pasteurellosis. *J Biotechnol* 2008; 135, 224-231.

Lee YL, Cesario T, Owens J, Shanbrom E, Thrupp LD. Antibacterial activity of citrate and acetate. *Nutrition* 2000; 18 (7-8): 665-666.

Lenette EH, Balows A, Hausler JWJ, Shadomy JH. *Manual of Clinical Microbiology*. USA.1985; 4, 1149.

Lin J, Huang S, Zhang Q. Outer membrane proteins: Key players for bacterial adaptation in host niches. *Microb Infect* 2002; 4, 325-331.

Lo RYC, McKerral JL, Hills LT, Konstrzynska M. Analysis of the capsule biosynthesis of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature. *Infect Immun* 2001b; 69 (7): 4458-4464.

Lo RYC, Strathdee CA, Shewen PE, Cooney BJ. Molecular studies of Ssa1, a serotype specific antigen of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun* 1991; 3398-3406.

Luo Y, Glisson JR, Jackwood MW, Hancock RE, Bains M, Cheng IH, Wang C. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73, *J Bacteriol*, 1997; 179, 7856-7864.

Luo Y, Zen Q, Glisson JR, Jackwood MW, Cheng IH, Wang C. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine* 1999; 17, 821-831.

Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Pasteurella, Mannheimia, Bibersteinia* and *Avibacterium* species, Chapter 21, in 'Clinical Veterinary Microbiology' Second Edition, 307-316, Elsevier Ltd., UK, 2013.

Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. Blackwell, UK, 2004.

Mathy NL, Mathy JP, Lee RP, Walker J, Lofthouse S, Meeusen EN. Pathological and immunological changes after challenge infection with *Pasteurella multocida* in naive and immunized calves. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85, 179-188.

McAllister HA, Carter GR. An aerogenic Pastrurellu-like organism recovered from swine. *Am J Vet Res* 1974; 35, 917-922.

Michael GB, Eidam C, Kodlec K, Meyer K, Sweeney MT, Murray RW, et al. Increased MICs of gamithromycin and tildipirosin in the presence of the genes *erm(42)* and *msr(e)*-

*mph(e)* for bovine *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*. J Antimicrob Chemother 2012; 67 (6): 1555-1557.

Miflin JK, Blackall PJ. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. Lett Appl Microbiol 2001; 33, 216-221.

Mike A. Bovine respiratory disease: Pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2006; 22, 399-411.

Mizan S, Henk A, Stallings A, Maier M, Lee MD. Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. J Bacteriol 2000; 182, 6874-6883.

Mohamed RA, Abdelsalam EB. A review on pneumonic pasteurellosis (respiratory manheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors. Bulg J Vet Med, 2008; 11, (3): 139-160.

Morris EJ. Selective media for some *Pasteurella* species. J Gen Microbiol 1958; 19, 305-311.

Mraz O. Vergleichende studie der arten *Actinohacillus lignieresii* und *Pasteurella haemolytica*. 111. *Actinobacillus haemolyticus* (Newsom and Cross, 1932) comb. nov. Zentralbl Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene Abteilung 1969; 209, 349-364.

Mutter R, Mannheim W, Bisgaard M. Taxonomy of the group, Pp: 3-34, Adlam C, Rutter JM (Eds.) *Pasteurella* and *Pasteurellosis*, Academic Press, Inc. New York, 1989.

Mutters R, Angen Q, Bisgaard M. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, Online Bergey's Manual Trust. (e-book). Published by John Wiley and Sons. in association with Bergey's Manual Trust. 2015.

Mutters R, Ihm P, Pohl S, Frederiksen W, Mannheim W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. Int J Syst Bacteriol 1985; 35, 309-322.

Namioka M, Murat S. Serological studies on *Pasteurella multocida* I: A simplified method for capsular typing of the organisms. Cornell Vet 1961; 51, 498-507.

Narcana IK, Suardana IW, Besung INK. Molecular characteristic of *Pasteurella multocida* isolates from Sumba Island at East Nusa Tenggara Province, Indonesia. Vet World 2020;13 (1): 104-109.

NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford).2020:baaa062) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=712&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Nefedchenko AV, Glotova TI, Glotov AG. Isolation and antimicrobial resistance of *Mannheimia haemolytica* on dairy farms in Siberia. Bulg J Vet Med 2019; 22 (4): 428- 438.

Newsom IE, Cross F. Some bipolar organisms found in pneumonia of sheep. J Am Vet Med Assoc 1932; 80, 711-719.

Okay S. Development of recombinant vaccines composed of plpe and ompH from *Pasteurella multocida* A:3. The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University Doctorate Thesis, Ankara, 2011.

Olsen I, Dewhirs FE, Paster BJ, Busse H. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, 2015.

Omaleki L, Browning FG, Allen JL, Barber SR. Molecular epidemiology of *Mannheimia haemolytica* and *Mannheimia glucosida* associated with ovine mastitis. JVDI 2012; 24 (4): 730.

Oruç E. 2006. The pathologic and bacteriologic comparison of pneumonia in lambs. Turk J Vet Anim Sci, 30, 593-599.

Önat K, Kahya S, Çarlı KT. Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. Turk J Vet Anim Sci, 2010; 34 (1): 91-94.

Pandit KK, Smith J. Capsular hyaluronic acid in *Pasteurella multocida* type A and its counterpart in type D. Res Vet Sci 1993; 54, 20-24.

Perino LJ, Apley M. Bovine Respiratory Disease, In: Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice, Edit. RA Smith, WB Saunders Company, Philadelphia, USA, 1999.

Pratt J, Cooley JD, Purdy CV, Straus DC. Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. Curr Microbiol 2000; 40, 306-309.

Pullinger GD, Bevir T, Lax AJ. The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. Mol Microbiol 2004; 51, 255-269.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnell WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. Blackwell, UK, 2004.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Pasteurella* species and *Mannheimia haemolytica*. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. USA: Iowa State University Press. 22; Pp: 137-141, 2002.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Pasteurella* species, *Mannheimia haemolytica* ve *Bibersteinia trehalosi*, chapter 27, in "Veterinary Microbiology and Microbial Disease" Second Edition, Pp: 300-308, John Wiley & Sons Ltd., UK, 2011.

Radostitis OM, Gay CC, Constable PD, Hinch Cliff KW. Veterinary Medicine. A Text Book of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 10 edition, Saunders, London, Pp: 921-935, 2007.

Rawat N, Gilhare VR, Kushwaha KK, Hattimare DD, Khan FF, Shende RK, et al. Isolation and molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* associated with pneumonia of goats in Chhattisgarh. *Vet World* 2019; 12 (2): 331-336.

Regamey R. Les infections humaines a *B. bipolaris septicus* (pasteurelloses). Editions H. Huber, Bern, 1939.

Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 2008; 8 (2): 117-128.

Rimler R, Rebers P, Phillips M. Lipopolysaccharides of the Heddleston serotypes of *Pasteurella multocida*. *American J Vet Res.* 1984; 45 (4): 759-763.

Rimler RB, Rhoades KR. Hyaluronidase and chondroitinase activity of *Pasteurella multocida* serotype B:2 involved in hemorrhagic septicemia. *Vet Rec* 1994; 134, 67-68.

Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53, 4783-4788.

Rosenbusch CT, Merchant IA. A study of the hemorrhagic septicemia pasteurella. *J Bacteriol* 1939; 37, 69-89.

Ruffolo CG, Tennent JM, Michalski WP, Adler B. Identification, Purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 1997; 65, 339-343.

Saglam YS, Bozoğlu H, Baş AT. Erzurum ve çevresinde kuzu enzootik pnömonileri üzerinde bakteriyolojik ve patolojik incelemeler. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 1999; 10 (1): 1-17.

Sahay S, Natesan K, Prajapati A, Kalleshmurthy T, Shome BR, Rahman H, Shome R. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from ovine respiratory infection: A study from Karnataka, Southern India. *Vet World* 2020;13 (9): 1947-1954.

Samuel MD, Shaddock DJ, Goldberg DR, Johnson WP. Comparison of methods to detect *Pasteurella multocida* in carrier waterfowl. *J Wildl Dis* 2003; 39, 125-135.

Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbil Rev* 2004; 28, 519-542.

Shewen PE, Wilkie BN. Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can J Vet Res* 1988; 52, 30-36.

Singh K, Ritchey JW, Confer AW. *Mannheimia haemolytica*: Bacterial–host interactions in bovine pneumonia. *Vet Pathol* 2011; 48 (2): 338-348.

Smith GR. Isolation of two types of *Pasteurella haemolytica* from sheep. Nature 1959; 183, 1132-1133.

Sneath PHA. Status of nomenclatural types in the approved lists of bacterial names. Int J Syst Bacteriol 1982; 32, 459-460.

Snipes KP, Ghazikhanian GY, Hirsh DC. 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 Dis 1987; 31, 254-259.

Soike D, Schulze C, Kutzer P, Ewert B, Van Der Grinten E, Schliephake A, Ewers C, Bethe A, Rau J. Acute pasteurellosis in fallow deer, cattle and pigs in a region of Eastern Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2012; 125, 122-128.

Susmitha KV, Lakshmi Kavitha K, Srivani M, Ramadevi V. Phenotypic and genotypic analysis of antibiogram of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic sheep lungs. Int J Curr Microbiol App Sci 2020; 9 (9): 2913-2920.

Şentürk S. Sığırların Solunum sistemi Hastalık Kompleksi. BRD (Ceva), Dora Basım, S. 280-284, Bursa 2020.

Tabatabaei M, Abdollahi AF. Isolation and identification of *Mannheimia haemolytica* by culture and polymerase chain reaction from sheep's pulmonary samples in Shiraz, Iran. Vet World 2018;11 (5): 636-641.

Taunde PA, Argenta FF, Bianchi RM, De Cecco BS, Vielmo A, Lopes BC, et al. *Mannheimia haemolytica* pleuropneumonia in goats associated with shipping stress. Ciencia Rural 2019; 49 (1): 1-6.

Taylor JD, Fulton RW, Dabo SM, Lehenbauer TW, Confer AW. Comparison of genotypic and phenotypic characterization methods for *Pasteurella multocida* isolates from fatal cases of bovine respiratory disease. J Vet Diagn Invest, 2010; 22, 366-375.

Taylor JD, Doyle DJ, Blackall PJ, Confer AW. Use of REP-PCR and 16s rRNA gene sequencing for comparison of *Mannheimia haemolytica* isolates obtained from fatal cases of bovine respiratory disease in the USA and australia. Aust Vet J 2014; 92, 15-23.

Tegtmeier C, Uttenthal A, Friis NF, Jensen NE, Jensen HE. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. Zentralb Vet Riehe B, 1999; 46, 693-700.

Teissier P, Gastinel G, Reilly J, Rivalier E. Contribution a l'étude des pasteurelloses a propos d'un cas de pasteurellose humaine. J Physiol Pathol Gen 1922; 20: 221-225, 241-255.

Tel OY, Keskin O. Koyun akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg 2010; 21, 31-34.

Tolera T, Wirtu A, Kumsa B, Zerabruk E, et al. Identification of serotypes *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* from cattle and sheep in central Ethiopia. Research Square, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.2.9508/v1>

Tomassini L, Gonzales B, Weiser GC, Sisco W. An ecologic study comparing distribution of *Pasteurella trehalosi* and *Mannheimia haemolytica* between Sierra Nevada bighorn sheep, White Mountain Bighorn Sheep, and Domestic Sheep. J Wildl Dis 2009; 45 (4): 930-940.

Topley WWC, Wilson GS. The principles of bacteriology and immunity, 1st ed., vol. 1. Arnold E, London, 1929.

Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J Clin Microbiol 1998; 36, 1096-100.

Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J Clin Microbiol 39, 924-929 (Erratum in J Clin Microbiol 2001; 2039, 2378).

Trevisan V. Il fungo del cholera asiatico. Questioni risolte Atti Acad. Fisio Med Stat Milano (Ser. 4) 1885; 3, 78-91.

Trevisan V. Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha contratta l'infezione rabbica. Rend R 1st Lomb Sci Let Ser II 1887; 20, 88-105.

Tsuji M, Matsumoto M. Pathogenesis of fowl cholera: Influence of encapsulation on the fate of *Pasteurella multocida* after intravenous inoculation into turkeys. Avian Dis 1989; 33, 238-247.

Ülgen M, Sönmez G, Aydın F. Kuzu pnömonieri üzerinde mikrobiyolojik ve histopatolojik incelemeler. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 1997; 9, 55-70.

Ülker H, Küçük D, Cantekin Z, Solmaz H. Hatay yöresinde kesimhanede kesilen sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. AVKAE Dergi 2012; 2 (9): 10-14.

Vasfi Marandi M, Mittal KR. Role of outer membrane protein H (OmpH)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. Infect Immun 1997; 65, 4502-4508.

Vu-Khac H, Trinh TTH, Nguyen TTG, Nguyen XT, Nguyen TT. Prevalence of virulence factor, antibiotic resistance, and serotype genes of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Vietnam, Veterinary World, 2020; 13 (5): 896-904.

Wijewardana TG, Wilson CF, Gilmour NJ, Poxton IR. Production of mouse monoclonal antibodies to *Pasteurella multocida* type A and the immunological properties of a protective anti-lipopolysaccharide antibody. J Med Microbiol 1990; 33 (4): 217-222.

Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida* toxin. Alouf JE, Popoff MR. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Academic Press is An Imprint of Elsevier, USA. Pp: 430-447, 2005.

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology. (6. Edition). Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 8. Pp: 459-46, 2006.

Yavrucu E. *Mannheimia haemolytica*'nın sığır epitel hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2008.

Younan M. Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype. Res Vet Sci 1995; 58-98.

Yüzbaşıgil AF. Kuzu pnömonilerinde patolojik ve bakteriyolojik incelemeler ile parainfluenza 3 (PI-3) virusunun etiyolojideki rolü. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 2010.

Zhao S, Qaiyumi S, Friedman S, Singh R, Foley SL, White DG, et al. Characterization of *Salmonella enterica* serotype newport isolated from humans and food animals. J Clin Microbiol 2003; 41 (12): 5366-5371.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

