

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI SIĞIR PNÖMONİ ETKENLERİNİN TESPİTİ,  
KARAKTERİZASYONU VE PFGE YÖNTEMİ İLE  
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**Mahmut Niyazi MOĞULKOÇ  
Veteriner Hekim**

**MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Murat YILDIRIM**

**2020 – KIRIKKALE**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI SIĞIR PNÖMONİ ETKENLERİNİN TESPİTİ,  
KARAKTERİZASYONU VE PFGE YÖNTEMİ İLE  
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**Mahmut Niyazi MOĞULKOÇ  
Veteriner Hekim**

**MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Murat YILDIRIM**

**2020 – KIRIKKALE  
Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**



## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	
İçindekiler.....	I
Önsöz.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar.....	V
Şekiller.....	VI
Çizelgeler.....	VIII
<b>ÖZET.....</b>	<b>IX</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>XI</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Etiyoloji ve Semptomlar.....	1
1.2. Çevresel-Konak faktörleri.....	2
1.3. Viral Etkenler.....	2
1.4. Bakteriyel Etkenler.....	3
1.5. Prevalans ve Ekonomik Boyut.....	4
1.6. <i>Mycoplasma bovis</i> .....	5
1.6.1. Bulaşma ve İnkübasyon Periyodu.....	6
1.6.2. Patogenez.....	7
1.6.3. Örnekler.....	8
1.6.4. İzolasyon.....	9
1.6.5. İdentifikasyon.....	10
1.6.6. Real Time PZR.....	12
1.6.7. Suş Tiplendirme.....	14
1.6.8. Seroloji.....	15
1.6.9. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	16
1.6.10. Antimikrobiyal Direnç.....	17
1.6.11. Virülens Faktörleri.....	18
1.6.12. İmmun Yanıt.....	20
1.6.13. Hastalığın kontrolü.....	22
1.7 <i>Pasteurella multocida</i> .....	27
1.7.1. Taksonomi.....	27
1.7.2. İzolasyon.....	28
1.7.3. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri.....	29
1.7.4. Moleküler Teşhis.....	30

1.7.5. BRD ile İlişkisi .....	31
1.7.6. Virülens Faktörleri .....	32
1.7.7. Antimikrobiyal Direnç .....	39
1.7.8. Antimikrobiyal Direnç Epidemiyolojisi.....	40
1.8. <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	42
1.8.1. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri .....	44
1.8.2. Moleküler Teşhis.....	45
1.8.3. Virülens Faktörleri .....	46
1.8.4. Patogenez .....	50
1.8.5. Antimikrobiyal Direnç .....	52
1.8.6. Genetik Determinantlar.....	53
1.8.7. Yönetim.....	57
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>61</b>
2.1. Akciğer Örneklerinin Toplanması .....	61
2.2. Kültür .....	61
2.2.1. Kültür Aşamasında Kullanılan Besiyerleri ve Bileşimleri.....	62
2.3. Biyokimyasal Testler .....	64
2.4. DNA İzolasyonu .....	66
2.5. PZR .....	67
2.6. Real Time PZR .....	72
2.7. Sekans Analizi .....	74
2.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri .....	74
2.8.1. Disk Difüzyon Testi .....	74
2.8.2. Mikoplazma Antimikrobiyal Duyarlılık Belirleme.....	75
2.9. Pulsed Field Jel Elektforez (PFGE).....	79
2.9.1. PFGE Solüsyon Bileşimleri .....	79
2.9.2. <i>Mikoplazma</i> PFGE Protokolü .....	81
2.9.3. <i>Mannheimia</i> PFGE Protokolü.....	82
2.9.4. <i>Pasteurella</i> PFGE Protokolü.....	84
2.10 İstatistiksel Analiz.....	86
<b>3.BULGULAR.....</b>	<b>87</b>
3.1 Biyokimyasal Test Bulguları .....	87
3.2 Real Time PZR Bulguları .....	87
3.3. Konvansiyonel PZR Bulguları.....	88
3.3.1. <i>M. haemolytica</i> Serotip Bulguları .....	88
3.3.2. <i>M. haemolytica</i> Virülens Gen Bulguları .....	89

3.3.3. <i>M. haemolytica</i> Direnç Geni Bulguları .....	91
3.3.4. <i>P. multocida</i> Kapsül Gen Bulguları .....	92
3.3.5. <i>P. multocida</i> Virülens Gen Bulguları.....	93
3.3.6. <i>P. multocida</i> Direnç Geni Bulguları.....	99
3.4. PFGE Bulguları.....	102
3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Test Bulguları.....	103
3.5.1. <i>P. multocida</i> Antimikrobiyal Duyarlılık Bulguları .....	103
3.5.2. <i>M. haemolytica</i> Antimikrobiyal Duyarlılık Bulguları.....	104
3.5.3. <i>M. bovis</i> Antimikrobiyal Duyarlılık Bulguları.....	104
3.6. Sekans Analizi Sonuçları .....	105
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>106</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>128</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>155</b>

## Önsöz

Bu çalışmada sağlıklı ve pnömonik sığır akciğer örneklerinden klasik yöntemlerle izole edilen etkenler qPZR ile *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* yönünden araştırılacaktır. Ülkemizde BRD etkenlerinin qPCR ile araştırıldığı, moleküler yöntemlerle virülens genlerinin karakterize edildiği ayrıca bu etkenlerin PFGE ile genetik ilişkilerinin incelenmesine yönelik kapsamlı bir veri bulunmamaktadır. Tez kapsamında etkenlere ait virülens ve direnç gen profilleri ortaya konacaktır. Solunum problemine neden olan bu izolatlar PFGE ile tiplendirilerek ilk defa genetik ilişkisi araştırılacaktır. Buna ilaveten pnömoni etkenlerinin antimikrobiyal duyarlılıkları değerlendirilerek gereksiz antibiyotik kullanımı azaltılarak ekonomik kazanç sağlanmış olacak ve elde edilen veriler sayesinde literatüre katkı sağlanacaktır.

Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım başta danışman hocam Prof. Dr. Murat Yıldırım olmak üzere, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğretim Üyesi Sibel KIZIL, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nilgün ÜNAL, Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Murat KARAHAN ve Dr. Öğretim Üyesi Recep KALIN, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gökçen DİNÇ, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Özgül Gülaydın hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde üzerimde sonsuz emeği olan anne ve babama, ayrıca bu zorlu süreçte sabır, anlayış ve desteklerinden ötürü eşim ve kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım

## Simgeler ve Kısaltmalar

- AFLP : Amplifiye fragman uzunluk polimorfizmi  
CLSI : Klinik laboratuvar standartları enstitüsü  
CO<sub>2</sub> : Karbon dioksit  
DNA : Deoksiribo nükleik asit  
DS : Distile su  
FTS : Fizyolojik tuzlu su  
ELISA : Enzim bağılı immunsorbent deneyi  
H<sub>2</sub>S : Hidrojen sülfür  
IS : İnsersiyon sekans tiplendirme  
Lkt: : Lökotoksin  
LPS : Lipopolisakkaritler  
MİK : Minimum inhibitör konsantrasyon  
MgCl<sub>2</sub> : Magnezyum klorür  
MLST : Çok lokuslu sekans tiplendirme  
MLVA:Çok lokuslu değişken sayıda tandem tekrar analizi  
Omp : Dış membran proteini  
µM : Mikromolar  
µL : Mikrolitre  
PBS : Fosfat buffer saline  
PFGE : Pulsed field gel elektroforez  
pmol : Pikomol  
PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu  
qPZR : Real time PZR  
RAPD : Rastgele amplifiye polimorfik DNA  
RFLP : Restriksiyon fragman uzunlukları polimorfizimi  
SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez  
TLR : Toll benzeri reseptörler



TSI : Triple sugar iron

## Şekiller

**Şekil 2.1.** PFGE analizinde kullanılan enzimler ve ilgili enzimlerin 6 bp'lik palendromik tanıma bölgeleri

**Şekil 3.1.** *M. bovis* izolatlarının Real Time PZR'da analiz edilmesi sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileri

**Şekil 3.2.** *M. haemolytica* serotip spesifik genlerin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.3.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *gcp* ve *adH* virülens genlerinin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.4.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *lktC* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.5.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *tbp* ve *nmav* virülens genlerinin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.6.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *gs60* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.7.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *aphA* direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.8.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *bla<sub>rob</sub>* ve *tet(H)* direnç genlerinin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.9.** *P. multocida* saha izolatlarında *capA* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.10.** *P. multocida* saha izolatlarında *tadD* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.11.** *P. multocida* saha izolatlarında *ptfA* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.12.** *P. multocida* saha izolatlarında *pfha* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.13.***P. multocida* saha izolatlarında *oma87* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.14.***P. multocida* saha izolatlarında *ompA* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.15.***P. multocida* saha izolatlarında *nanB* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.16.***P. multocida* saha izolatlarında *nanH* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.17.***P. multocida* saha izolatlarında *toxA* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.18.***P. multocida* saha izolatlarında *hgbA* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.19.***P. multocida* saha izolatlarında *hgbB* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.20.***P. multocida* saha izolatlarında *tonB* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.21.***P. multocida* saha izolatlarında *ompH* virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.22.***P. multocida* saha izolatlarında *tetH* direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.23.***P. multocida* saha izolatlarında *tetB* direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.24.***P. multocida* saha izolatlarında *aphA1* direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.25.***P. multocida* saha izolatlarında *cat3a* direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.26.***P. multocida* saha izolatlarında *bla* direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü

**Şekil 3.27.***P. multocida* izolatlarının PFGE analiz ve dendogram sonuçları

**Şekil 3.28.***M. haemolytica* izolatlarının PFGE analiz ve dendogram sonuçları

**Şekil 3.29.***M. bovis* izolatlarının PFGE analiz ve dendogram sonuçları

## Çizelgeler

**Çizelge 1.1.** BRD ile ilişkili olan viral ve bakteriyel etkenler

**Çizelge1.2.***P. multocida* izolatlarında tanımlanan antimikrobiyal direnç genleri

**Çizelge1.3.***M. haemolytica* izolatlarında tespit edilen direnç genleri ve mekanizmaları

**Çizelge2.1.** 25 µl'lik total hacimde bir örnek için PZR mastermiks hazırlanması

**Çizelge 2.2.***M. haemolytica* izolatlarının serotip tayininde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

**Çizelge 2.3.***M. haemolytica* virulens genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

**Çizelge 2.4.***M. haemolytica* direnç genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

**Çizelge 2.5.***P. multocida* kapsül genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

**Çizelge 2.6.***P. multocida* izolatları virülens genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

**Çizelge 2.7.***P. multocida* izolatları direnç genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

**Çizelge2.8.** 25 örnek için qPZR mastermiks hazırlanması

**Çizelge 2.9.** qPZR'da kullanılan hedef etkenlere spesifik primer ve prob dizileri

**Çizelge 3.1.** *P. multocida* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık bulguları

**Çizelge 3.2.** *M. haemolytica* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık bulguları

**Çizelge 3.3.** *M. bovis* izolatlarının MİK değerleri (µg/ml)

## **Bazı Sığır Pnömoni Etkenlerinin Tespiti, Karakterizasyonu ve PFGE Yöntemi ile Genotiplendirilmesi**

### **ÖZET**

Sığırlarda dünya genelinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan solunum yolu hastalıkları etiolojisinde bakteriyel etkenler önemli rol oynamaktadır. Bakteriyel kökenli solunum yolu hastalığı etkenlerinin tanımlanmasında ve etkin yönetim metotlarının belirlenmesinde sistematik yaklaşım geliştirmek hastalıkla mücadelede önemli yer tutmaktadır. Sığır solunum yolu bakteriyel infeksiyonlarına neden olan en önemli etkenlerin büyük çoğunluğunu *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* ve *Mycoplasma bovis* oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında, sığırların solunum sistemi hastalıklarının en yaygın etkenlerinden olan bu bakterilerin prevalansının belirlenmesi, izolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının tespit edilmesi, izolatların virülens ve direnç profillerinin moleküler yöntemlerle karakterize edilmesi, PFGE ile izolatların genetik ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında 200 adet pnömonik sığır akciğerinden kültür sonrasında 9 adet *P. multocida* (%4.5), 8 adet *M. haemolytica* (%4) ve 22 adet *M. bovis* (%11) suşu qPZR ile tespit edilmiştir, 400 adet sağlıklı sığır akciğerinden ise ilgili etkenlerin izolasyonu sağlanamamıştır. *M. bovis* izolatları broth dilüsyon testi ile incelendiğinde ise izolatların gentamisin, tilosin ve oksitetrasiklin'e dirençli, enrofloksasin ve danofloksasin'e orta derecede duyarlı olduğu tespit edilmiştir. PFGE analizi ile Sivas

bölgesinde BRD vakalarından izole edilen majör etkenlerin birbirinden farklı izolatlar olduğu anlaşılmıştır. *M. bovis* izolasyon oranının *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolasyon oranlarına göre anlamlı olduğu ( $p<0.05$ ) tespit edilmiştir.

Çalışma sonunda Sivas ilindeki sığır pnömoni vakalarında bahsedilen etkenlerin rolüve direnç durumu ortaya konmuştur. *M. bovis* enfeksiyonları tedavisinde sadece antibiyotik kullanımının yeterli olamayacağı ve etkin mücadele için aşı uygulanması, stres faktörlerinin minimize edilmesi ve bulaşın azaltılması gerektiği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:**Direnç, PFGE, PZR,sığır, pnömoni

## **Detection, Characterization of Some Bovine Pneumonia Agents and Genotyping with PFGE**

### **SUMMARY**

Bacterial agents play significant roles in the aetiology of bovine respiratory disease which substantial economic losses occurring worldwide on cattle. To develop systematic approach has an important place on the fight against disease in identification of cattle respiratory disease bacterial agents and determination of efficient management practices. Most common bacterial causes of cattle respiratory disease are *P. multocida*, *M. haemolytica* and *M. bovis*.

In this thesis study; it was aimed that determination of prevalence of common bacterial agents responsible for bovine respiratory disease, determination of antimicrobial susceptibility status of strains, characterization of virulence and resistance profiles by molecular methods, to reveal the genetic relatedness of strains with PFGE method.

Within the study, following culture, 9 *P. multocida* (4.5%), 8 *M. haemolytica* (4%) and 22 *M. bovis* (11%) strains were detected with qPCR on 200 pneumonic lungs, no isolation of respective strains were performed upon healthy lungs. *M. bovis* isolates were examined with broth dilution test and it was determined that isolates were resistant to gentamycin, tylosin and oxytetracycline, moderate susceptible to enrofloxacin and danofloxacin. According to PFGE results, it was detected that major agents isolated from BRD cases were different from each other. Isolation rates

of *M. bovis* was statistically significant ( $p<0.05$ ) compared to isolation rates of *P. multocida* and *M. haemolytica*.

Consequently, the role and resistance status of respective agents on cattle pneumonia cases in Sivas province were unveiled. It was concluded that only antimicrobial usage is not sufficient on treatment of *M. bovis* infections and it will be essential to administer vaccination for effective struggling, to minimise of stress factors and to decrease of transmission.

**Key Words:**Cattle,PCR, PFGE, pneumonia, resistance



## 1.GİRİŞ

Sığırların solunum sistemi hastalığı [Bovine Respiratory Disease (BRD)]sığır yetiştiriciliği açısından günümüzde ekonomik yönden en önemli sağlık problemlerinden birisidir. BRD sayesinde şekillenen ekonomik kayıplar sığırlarda diğer hastalıkların maliyetini geçmiş durumdadır ve bu ekonomik kayıplar tedavi giderleri, üretim kaybı ve ölüm ile şekillenmektedir. BRD kontrol stratejileri işletme yönetimi, aşı ve antibiyotik uygulamaları ile sınırlı kalmaktadır (Highlander 2001). Antibiyotik kullanımı ise antimikrobiyal direnç gelişimi ve yayılması gibi endişelere yol açmaktadır. Birçok bakteriyel, paraziter ve viral etken BRD etiolojisinde rol almaktadır. Bakteriyel etkenlerden *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia haemolytica* ve *Pasteurella multocida* sığır pnömoni vakalarından sıklıkla izole edilen etkenlerin başında gelmektedir. Bu etkenlere karşı antimikrobiyal direnç gelişimi etkili antibiyotik kullanımı ve hastalığın etkin yönetimini zorunlu hale getirmektedir.

### 1.1.Etiyoloji ve Semptomlar

BRD etiolojisinde çeşitli faktörler yer almaktadır. Nakil gibi stres faktörleri, konak immun sisteminin zayıflaması ile beraber çevrede bol miktarda olan viral ve bakteriyel etkenlerin akciğere invaze olmasına imkan vermesi neticesinde BRD şekillenmektedir (Cusack ve ark. 2003). Vakaların çoğunda ilk olarak viral enfeksiyon başlamakta, devamında alt solunum sisteminde kolonize olan ve ciddi fibrinonekrotik pnömoniye sebep olan sekonder bir bakteriyel enfeksiyon şekillenmektedir. Sonucunda ise geçici hastalık tablosu, kronik pnömoni gelişimi veya hayvanın ölümü gerçekleşmektedir (Welsh ve ark. 2004).



İşletmeye ulaşmasını takiben kısa sürede içerisinde pnömoniden en fazla etkilenen grup buzağılardır. Akut salgın vakalarında 2-3 gün içerisinde ölüm şekillenmekte ve hayatta kalanlarda ise bu süreç kronik hale gelmektedir (Rice ve ark. 2007). Klinik semptomlar ateş, burun veya gözyaşı akıntısı, öksürük, solunum stresi, depresyon, letarji, kilo kaybı ve iştahsızlıktır. Ölümün esas sebebi akut fibrinöz plöropnömonidir. Enfeksiyonun süresi, dağılımı ve şiddeti, sığır sürüleri arasında farklılık göstermektedir ayrıca yaş, vücut ağırlığı, işletmedeki hayvan teması ve yapılan aşılama potansiyel risk faktörleridir (Wildman ve ark. 2008).

## **1.2.Çevresel-Konak faktörleri**

Sığırın BRD'ye predispoze hale gelmesinde çevresel stres faktörleri kilit rol oynamaktadır. Stresin immun sistemi zayıflattığı ve viral/bakteriyel enfeksiyonlara zemin hazırladığı bilinmektedir (Duff ve Galyean 2007). Sığır, işletmelerde çeşitli stres faktörlerine maruz kalmaktadır. Stres faktörleri genelde nakil ile alakalıdır ancak işletme yönetim uygulamaları da büyük rol oynamaktadır. Stres faktörleri doğada psikolojik veya fiziksel olabilir. Psikolojik stres faktörleri büyük ölçüde kalabalık barınma, nakil ve sütten kesme gibi olaylardan kaynaklanmaktadır. Açlık, susuzluk, yorgunluk, yaralanma, ısı değişikliği, yetersiz havalandırma, kastrasyon, aşılama ve boynuz kesme gibi uygulamalar ise yaygın görülen fiziksel stres faktörlerdir (Thomson ve White 2006). Stres, enfeksiyöz etkenlere maruz kalma riskinin yüksek olduğu yerlerdeki hayvanlarda immun sistemin zayıflaması neticesinde BRD oluşmasına zemin hazırlamaktadır.

## **1.3.Viral Etkenler**

Viral etkenler BRD enfeksiyonlarında immunsupresif etkiye sahiptirler ve diğer solunum sistemi patojenleri ile beraber sinerjik etki göstererek bakterilerin alt solunum sisteminde kolonize olmasına aracılık ederler (Loneragan ve ark. 2005).

BRD ile ilgili birçok viral etken ilişkilendirilmiştir (Çizelge1.1), başlıca BHV-1, BRSV ve PI-3 virusları literatürde önemli viral patojenlerdir (Apley 2006). Viral enfeksiyon mekanizmaları bu tezin konusu değildir ancak genel olarak bu viral etkenler nötrofil ve lenfosit fonksiyonu azalması, bakterilerin farinkste artışı, trakea epitel hücrelerinde siliar aktivite azalması ve akciğer kleransında azalma ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu faktörler konak savunma mekanizmalarının bozulmasına ve bakterinin alt solunum sistemine ulaşarak pnömoni tablosu şekillenmesine katkı sağlamaktadır.

**Çizelge 1.1.** BRD ile ilişkili olan viral ve bakteriyel etkenler

<b>Viral Etkenler</b>	<b>Bakteriyel Etkenler</b>
İnfeksiyöz sığır rhinotrakeit virusu (IBR)	<i>Mannheimia haemolytica</i>
Sığır herpesvirus (BHV-1, BHV-4)	<i>Pasteurella multocida</i>
Sığır viral diare virusu (BVDV)	<i>Histophilus somnus</i>
Sığır solunum sinsityal virusu (BRSV)	<i>Actinomyces pyogenes</i>
Parainfluenza 3 virusu (PI-3V)	<i>Mycoplasma bovis</i>
Sığır adenovirus	<i>Mycoplasma dispar</i>
Sığır rhinovirus	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
Sığır reovirus	<i>Chlamydia spp.</i>
Sığır calicivirus	<i>Ureaplasma diversum</i>
Sığır enterik coronavirus	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Sığır parvovirus	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sığır enterovirus	

#### **1.4.Bakteriyel Etkenler**

BRD ile ilişkili birçok bakteriyel patojen viral etkenlerle beraber tanımlanmıştır (Çizelge 1.1). BRD vakalarında *M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somnus* ve *M. bovis* etkenleri hasta veya ölmüş sığırlardan en sık izole edilen bakterilerdir (Thomson ve White 2006). Bu patojenlerin herbirinin BRD üzerine etkisi hala tartışma konusudur. Avrupa’da BRD semptomlu buzağı pnömoni vakalarının %25-33’ünden *M. bovis* sorumlu bulunmuştur (Gevaert 2006). *H. somnus* müşkülpesent olması nedeniyle postmortem akciğer dokusundan daha az oranda izole edilmektedir (Cusack ve ark. 2003). *H. somnus* kökenli pnömoniler *M. haemolytica* ve *P. multocida* kaynaklı pnömoniye kıyasla genelde daha subakut veya kronik karakterde olmaktadır (Hodgins ve ark. 2002). *P. multocida* ise akut - subakut fibrinöz pleropnömoni’den ziyade genelde subakut-kronik bronkopnömonilerle karakterizedir ve solunum problemlerindeki rolü buzağılarda daha belirgindir (Dabo ve ark. 2008). *M. haemolytica* ile kıyasla *P. multocida*’nın daha az virulent karakterde olduğu, deneysel enfeksiyon modellerinde primer pnömoni oluşması için daha fazla etkene gerek duyulduğu bildirilmiştir (Hodgins ve ark. 2002).

### **1.5.Prevalans ve Ekonomik Boyut**

Ekonomik açıdan bakıldığında BRD Kuzey Amerika’da açık besideki sığırları etkileyen en önemli hastalıkların başında gelmektedir (Griffin 1997). BRD hastalık ve ölümlerle ilişkili kayıpların başlıca nedenidir ve işletmeye alınan sığırlarda morbiditenin %75’ine ve mortalitenin %70’ine kadar sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Sığır işletmelerinde aylık ortalama mortalite oranının %0.128 ile %0.71 arasında olduğu ve prevalansın coğrafik konum ve mevsime bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Gagea ve ark. 2006). Amerika’da on iki eyalette 1994 ve 1999 yılları arasında %1.42 insidans oranı ile BRD kökenli ölüm kaybı artışı olduğu bildirilmiştir (Snowder ve ark. 2006). Bu oranın 2003 yılında ise %1.75’e ulaştığı rapor edilmiştir (Thomson ve White 2006).

BRD kökenli ekonomik kayıpların tam miktarını hesaplamak kolay değildir. Amerika’da yapılan hesaplamalarda yıllık 640 milyon ile 1 milyar dolar düzeyinde

ekonomik kayıp şekillendiği belirlenmiştir (Babcock ve ark. 2008).Ancak sığır başına 13-37 dolar tedavi masrafı da hesaba katıldığında bu değer yıllık 3 milyar dolar civarına çıkmaktadır (Snowder ve ark. 2006). Bu rakamların büyük olmasına rağmen sığır endüstrisinde BRD'nin gerçek maliyetinin daha az hesaplanması olasılığı bulunmaktadır. Bu değerler hesaplanırken temel olarak tedavi giderleri ve ölüm kayıpları baz alınmaktadır. Ancak BRD ile ilişkili artan işçilik giderleri, performans kayıpları ve karkas değerinin düşmesi gibi kolayca saptanamayan ekstra kayıplarda mevcuttur (Larson 2005).

### **1.6.Mycoplasma bovis**

*Mycoplasma bovis* ilk olarak 1961 yılında mastit vakasından izole edilmiştir ve 1976 yılında sığır pnömoni etkeni olarak tanımlanmıştır (Gourlay ve ark. 1976, Hale ve ark. 1962). O yıldan günümüze kadar *M. bovis* sığırlarda ve buzağılarda önemli bir patojen olarak kabul edilmektedir. Etken, sığırlarda ayrıca artitis, otitis media, tenosynovitis, mastitis, keratokonjunktivitis, dekubital apseler, metritis, abort ve infertilite, seminal vesikulitis ve menenjit vakalarından da izole edilmektedir (Caswel ve ark. 2008).

*M. bovis* ile ilgili kırk yılı aşkın sürede birçok çalışma yapılmıştır.Yinede bu patojenle mücadelede veri eksikliği hastalığın kontrol edilebilmesini sınırlamaktadır. İn vitro ortamlarda mikoplazmaların izolasyon ve manipülasyon güçlüğü, bazı sağlıklı sığır sürülerinde enfeksiyon prevalansının yüksek olması, doğal hastalık ve deneysel vakaları arasındaki uyumsuzluklar ve antikor titresini ile hastalık direnci arasında korelasyon olmaması sığır pnömonilerinde *M. bovis*'in rolünü belirlemeyi zorlaştırmaktadır. Etkenin genotipik farklılığının klinik önemi, virülens faktörleri ve enfeksiyonun nasıl doku hasarı oluşturduğu, immunolojik mekanizmalar ve etkin aşı geliştirilmesi potansiyeli, hastalığın gelişimindeki çevresel faktörler ve diğer patojenlerin rolü, etkenin BRD kompleksi içerisindeki önemi gibi konular açıklanmayı bekleyen önemli hususlardır (Caswel ve ark. 2008).

*M. bovis*, Mollicutes sınıfının *Mycoplasmataceae* familyasında yer alan bir patojendir (Waites 2007). *Mycoplasma* cinsi kendi kendine çoğalabilen en küçük yaşam formlarına sahip bakterileri temsil etmektedir ve yüzün üzerinde türü tanımlanmıştır. Mikoplazmaların çoğu fakültatif anaerobtur ve üç katmanlı hücre membranını sahiptir, fakat hücre duvarları yoktur. Hücre duvarının olmaması sebebiyle pleomorfik şekle sahiptirler.  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere dirençlidirler ve anilin boyalarıyla zayıf boyanırlar. Mikoplazma türlerinin küçük genom boyutuna sahip olmaları (580-1380 kb), konağa veya gerekli besin maddelerini ihtiva eden kompleks besiyerlerine ihtiyaç duymasını ve çevresel koşullarda sınırlı canlı kalabilmelerini sağlamaktadır. *M. bovis* genomu 1080 kb'dan oluşmaktadır ve G+C oranı %27-32 arasında değişkenlik göstermektedir. *M. bovis* ve *M. agalactiae* yakın ilişkili mikoplazma türleridir ve 16S rRNA sekansları %99 benzerlik göstermektedir (Mattsson ve ark. 1994). *M. bovis* insan patojeni olarak kabul görmemektedir sadece insanlarda lobar pnömonili bir hastanın salyasından izole edilen bir vakabildirilmiştir (Madoff ve ark. 1979).

### 1.6.1. Bulaşma ve İnkübasyon Periyodu

Mikoplazmaların çoğu solunum, sindirim, genital kanal ve meme bezi gibi mukozal yüzeylerde kommensal bulunabilen konak spesifik etkenlerdir. Çevresel şartlarda canlı kalabilmeleri sınırlıdır ve bulaşma olasılığı düşüktür. *M. bovis* güneş ışığına maruz kalmadığı takdirde çevrede günlerce, +4°C'de süte 2 ay, suda 2 ayın üzerinde canlı kalabilmektedir fakat yüksek sıcaklıklara daha hassastır. Etken 20°C'de 1-2 hafta, 37°C'de 1 hafta canlılığını sürdürebilmektedir. Çeşitli materyallerde canlı kalabilme süresi değişkenlik göstermektedir; gübrede 37 gün, pamukta 18 gün, samanda 13 gün, tahta ve paslanmaz çelikte 1-2 gün canlı kalabilmektedir. Isı uygulamaları, 65°C'de 2 dakika ve 70°C'de 1 dakika etkenin canlılığını yitirmesine neden olmaktadır (Butler ve ark. 2000).

*M. bovis* enfeksiyonu, enfekte süt ve hasta buzağuların yakın teması neticesinde bulaşmaktadır (Pfützner 1990). Hastalıktan ari sürülerle kıyaslandığında,

*M. bovis* mastitli sürülerdeki buzağılarda burun boşluğunda kolonizasyon daha yaygındır (Bennett ve Jasper 1977). Enfekte süt aspire edildiğinde buzağılarda pnömoni ve otitis media gelişiminde etkenin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Enfekte buzağılarla temas sekonder bir majör enfeksiyon kaynağıdır ve enfekte buzağuların işletmeye gelmesi sürülerin olası bulaşma metodudur (Nicholas 2004). Enfekte buzağular ile diğer buzağular bir araya geldiklerinde 24 saat içerisinde buzağılarda burundan *M. bovis* saçılımı olduğu ve temastan 7 gün sonrasında buzağuların çoğunda etkenin varlığı tespit edilmiştir (Pfützner 1990).

Doğal vakalarda inkübasyon periyodunu belirlemek güçtür çünkü, klinik olarak solunum sistemi hastalığı başlangıcı *M. bovis* enfeksiyonu sonucunu yada virüs, antibiyotik duyarlı bakteri gibi diğer belirlenemeyen patojenler klinik teşhise kadar inaktif hale getirilmesi sonucunda mı şekillendiği genelde belli değildir. Doğal enfekte buzağularla yapılan bir kohort çalışmada hasta buzağularla temastan iki hafta sonra solunum sistemi semptomları rapor edilmiştir (Adegboye ve ark. 1996). Deneysel enfeksiyon modellerinde solunum sistemi ve artrit belirtilerinin enfeksiyondan 8-10 gün (Stipkovits ve ark. 2000), solunum sistemi belirtilerinin 2-6 gün sonra olduğu bildirilmiştir (Pfützner 1990).

### **1.6.2.Patogenezi**

*M. bovis*'in kolonize olmasını, mukozal yüzeylerde persiste kalmasını, konak hücrelere invaze olmasını, afinite duyduğu bölgelere yayılmasını ve immun yanıtı kaçmasını sağlayan virülens faktörleri mevcuttur. *M. bovis*'in patojenite potansiyeli belli olmasına rağmen patogenezi moleküler mekanizmaların rolü tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Adhezyon, antijenik varyasyon, immunmodülasyon, sekonder metabolit üretimi ve biyofilm oluşumu patogenezi önemli olan virülens faktörleridir (Maunsell ve ark. 2011).

*M. bovis* enfeksiyonlarında ilk adım sığır trakebronşial epitel hücrelerine bağlanmadır. Bu bağlanma, bakteri yüzeyindeki immundominant protein olan Vsp

membran proteinleri, P26 ve pMB67 gibi proteinlerle beraber akciğerde kolonizasyonu kolaylaştırmaktadır. Hücre bağlanması suşlar arasında farklılık, in vitro pasaj ve patojenite ile korelasyon göstermektedir (Thomas ve ark. 2003). Solunum sisteminde kolonizasyon sonrasında *M. bovis* immun sistem hücrelerine saldırmakta ve bakterinin konakta farklı enfeksiyon bölgelerine ulaşmasını sağlamaktadır (Van Der Merwe ve ark. 2010).

Akciğerde kronik *M. bovis* enfeksiyonu geliştiğinde etken konak immun sisteminden kaçabileceği diğer organlara yayılmaktadır. Antijenik varyasyonun *M. bovis*'in immun sistemden sürekli kaçmada kullandığı bir yol olduğu düşünülmektedir (Bürki ve ark. 2015). *M. bovis* suşlarının değişken antijenik profilinden Vsp'ler sorumludur. Vsp genlerinde kromozomal rekombinasyon olaylarına zemin hazırlayan tekrarlı ve spesifik vsp inversiyon dizileri bulunmakta ve bu genlerdeki duplikasyon, inversiyon ve delesyon olayları neticesinde yüzey antijenleri kazanılmakta veya kaybedilmektedir.

Yüzey antijenlerini değiştirmenin yanı sıra *M. bovis*'in lenfosit apoptozunu indüklemeye, lenfosit proliferasyonu baskılama, nötrofillere bağlanarak oksidatif hasarı engelleme veya anti-enflamatuvar sitokin salgılayarak opsonizasyonu zayıflatma gibi immun sistemden kaçma mekanizmaları mevcuttur (Mulongo ve ark. 2014, Bürki ve ark. 2015).

*M. bovis* hidrojen peroksit gibi konak hücreye zarar veren sekonder metabolitler sentezlemektedir. Biyofilm oluşumu ise etkenin kurumaya ve ısı stresine direncini sağlamakla beraber etkenin persiste olmasına yol açmaktadır (McAuliffe ve ark. 2006).

### 1.6.3.Örnekler

Mikoplazmalar oldukça hassas mikroorganizmalardır, bu sebeple örneklerintoplanmasını takiben soğuk zincirde 24 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Saklama ve gönderme süresi 24 saati aşar ise etkenin canlılığını

koruması amacıyla örnekler transport medium'da veya -70°C'de dondurulmuş vaziyette gönderilmelidir. İncelenecek örneklerin 37°C'de su banyosunda hızlıca çözdürülmesi tavsiye edilmektedir (Murray ve Baron 2003). *M. bovis* izolasyonu amacıyla laboratuvara bronkoalveolar lavaj, pnömonik akciğer dokusu, synovial veya eklem sıvısı, mastitli süt, sperm, genital akıntı, prepisyum yıkantısı ve göz svab örnekleri gönderilebilir (Nicholas ve Ayling 2003). Svab yardımıyla örnekleme yapılacak ise dacron, kalsiyum alginat veya polyester svablar, inhibitör potansiyeli olan tahta saplı svablara göre tercih sebebi olmalıdır (Murray ve Baron 2003). Örnekleme yapılan svablar Stuart veya Eaton transport svabında laboratuvara ulaştırılmalıdır. Kültür sonucunda nazal svablar ile alt solunum sistemi etkenleri iyi korelasyon göstermediğinden dolayı akciğer enfeksiyonlarında canlı hayvanlardan bronkoalveolar lavaj örnekleri alınmalıdır (Thomas ve ark. 2002).

#### **1.6.4.İzolasyon**

*M. bovis* izolasyonu amacıyla ekimi yapılacak örnekler besiyerlerine ekilmeden homojenize edilmelidir. Sıvı örnekler santrifüj edilmeli ve peletten inokülasyon yapılmalıdır. Kontaminasyon şüphesi varsa örnekler 0.45 µm'lik filtrelerden geçirilerek ekim yapılmalıdır. Etkeni antikor, antibiyotik, bakteri ve diğer inhibitör maddelerin etkilerinden kurtarmak amacıyla bronkoalveolar lavaj sıvısı gibi örnekler brothda seri dilüe edilmeli ve herbir dilüsyondan ayrı ekim yapılmalıdır (Murray ve Baron 2003, Arcangioli ve ark. 2007).

Mikoplazmalar, besiyerlerinde üreyebilmekiçin sterole ihtiyaç duyarlar.Bu amaçla besiyerlerine serum ilavesi yapılır. *M. bovis* Eaton, pleuropnömoni-benzeri organizma (PPLO), N-agar veya broth, modifiye Friis, modifiye Hayflick ve diğer ticari mikoplazma besiyerlerinde üreyebilirler (Nicholas ve Baker 1998). Sıvı besiyerleri maya ekstraktı, tripton, %20 at serumu ve 500 µg/ml konsantrasyonda ampisilin içermeli ve *M. bovis* üretilmesi için 37°C'de 3-10 gün inkübe edilmelidir. Saha izolatlarını saflaştırmak amacıyla sıvı kültürler 220-450 nm por çaplı filtrelerden geçirilip mikrokoloniler uzaklaştırılarak filtrasyon-klonlama tekniği



kullanılmalıdır. Sonrasında filtrat brothda seri dilüe edilmeli ( $10^{-1} - 10^{-4}$ ) ve 2-4 gün içerisinde koloni oluşacak olan agara ekimler yapılmalıdır. Agar yüzeyindeki tek koloniler pastör pipeti veya iğne yardımıyla alınarak brotha pasajlanmalıdır. Saf kültür elde edilebilmesi için tavsiye edilen klasik metot izolatların üç defa filtrasyonla pasajlanmasıdır (Tully 1983).

Brothlar ve agarlar 37°C'de %5-10 düzeyinde CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmelidir (Murray ve Baron 2003). Hazırlanan her besiyeri partisine ait besiyerleri ve suplementler *M. bovis* PG45 gibi uluslararası referans suş ile test edilmeli, referans suşların ürediğinden ve besiyerinde inhibitör madde olmadığından emin olunmalıdır. Kronik vakalarda antibiyotik ve kontaminant gibi inhibitör maddeler dolayısıyla *M. bovis* izolasyonunun zorlaştığı bildirilmiştir (Ayling ve ark. 2005). İdentifikasyon aşamasına geçmeden önce saf kültür elde edildiğinden emin olunmalıdır.

### **1.6.5.İdentifikasyon**

*M. bovis* kolonileri cins bazında Dienes boyama ve biyokimyasal metotlarla identifiye edilmekte, fakat tür bazında identifikasyon ELISA veya PZR metotlarıyla yapılmaktadır. Agar yüzeyindeki koloniler stereomikroskopta 20-60x büyütmeyle incelenmektedir. *M. bovis* kolonilerinin çıplak gözle görülebilmesi için 2-5 gün gereklidir, bu süre besiyeri kalitesine bağlıdır ve uygun besiyerlerinde çoğu saha suşlarının 20 saatten kısa sürede üreme gösterdiği rapor edilmiştir (Tully 1983, Nicholas ve Ayling 2003). *M. bovis* kolonileri agarda genelde tipik sahanda yumurta görünümü vermektedir ayrıca Eaton medium gibi agarlarda film ve leke oluşturmaktadır (Nicholas ve Baker 1998). Koloniler 0.1-0.5 mm çapındadır, koyu renklidir ve hale oluşumu yoktur (Stalheim ve Proctor 1976). Hava kabarcıkları, su veya yağ damlacıkları agar yüzeyinde mikoplazma kolonileri ile karışabilir. Dienes boyası, ticari olarak satılan metilen mavisi kolonilerin gözlemlenebilmesini kolaylaştırmakta ve mikoplazmaları artıklardan ve L-formundaki kolonilerden ayırt etmede fayda sağlamaktadır. Mikoplazma kolonileri Dienes boyası ile mavi renkte

boyanırlar ve aldığı boyayı tutarlar, L-formundaki bakteri kolonileri ise aldığı boyayı salarlar. Kolonilerin orta kısmındaki agarın derinine doğru uzanan kısmı koyu mavi renkte boyanırken, koloninin periferde kalan kısmı açık mavi renkte boyanır (Francoz ve ark. 2005).

Mikoplazma hücreleri 0.2-0.3 µm çapa sahiptir bu sebeple ışık mikroskopunda incelenmesi oldukça güçtür. Hücre duvarının olmaması Gram boyama ile boyanmasını zorlaştırır, Giemsa boyası ile boyanır ancak küçük boyuta sahip olmaları incelenmesini zorlaştırmaktadır (Murray ve Baron 2003). Akridine orange boyama mikoplazma hücrelerinin incelenmesinde ve sayımında yarar sağlamaktadır fakat bu boya mikoplazmalara spesifik bir boyama yöntemi değildir (Jasper ve ark. 1984).

Glukoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi, üreaz aktivitesi, film oluşumu ve tetrazolium redüksiyon testleri *M. bovis*'i diğer mikoplazmalar veya üreaplazmalardan ayırt etmede kullanılan biyokimyasal testlerdir (Poveda, 1998). Biyokimyasal testler *M. bovis* ve *M. agalactiae*' yı ayırt etmede yetersiz kalmaktadır; iki türde glukozu fermente veya arjinini hidrolize etmez, laktat ve piruvat gibi organik asit kullanırlar, brothda türbidite olmadığında brotha turuncu renk verirler, etanolü okside edemezler, lipolitik aktiviteleri neticesinde besiyerlerinde film ve spot oluştururlar (Khan ve ark. 2005).

Üreme inhibisyon, film inhibisyon, floresan antikor ve metabolik inhibisyon gibi hiperimmün tavşan serumu kullanılan antikor temelli testler *M. bovis* tespitinde kullanılmaktadır (Poveda ve Nicholas 1998). Bu metotların uygulanması zaman almaktadır ve antiserum ticari olarak satılmadığından dolayı üretilmesi yoğun işçilik gerektirmektedir. Monoklonal antikor kullanılarak hazırlanan sandviç ELISA tekniği *M. bovis*'i doğrulama amacıyla kullanılmakta ve ticari olarak satılmaktadır. Mikoplazmalar ayrıca referans suş PG45'e özgü poliklonal antiserumdan hazırlanan dot immun bağlama metoduyla belirlenebilmektedir (Arcangioli ve ark. 2007). Monoklonal antikor tabanlı ELISA ve antijen-capture ELISA süt örneklerinden *M. bovis* tespiti amacıyla geliştirilmiştir (Heller ve ark. 1993). *M. bovis*'i tespit edebilen diğer metotlar ise; immunperoksidaz (Gourlay ve ark. 1989) ve akış sitometri (Assuncao ve ark. 2006) metotlarıdır. Çoğu immunolojik tekniğe zenginleştirme

aşaması ilave edildiğinde metodun sensitivitesi artırılabilir (Heller ve ark. 1993).

Mikoplazma türlerinin tanımlanmasında kültüre kıyasla verimlilik, sensitivite ve spesifitenin yüksek olduğu PZR metodu laboratuvar teşhisinde kullanılmaktadır. *M. bovis* tespiti amacıyla doksanlı yıllarda konvansiyonel PZR’da hedef gen olarak 16s rRNA kullanılmaktaydı (Hotzel ve ark. 1996). 16s rRNA geni tüm bakterilerde bulunması ve zamanla fonksiyonunun değişmemesi gibi sebeplerle bakteri tanımlamada en yaygın kullanılan genlerden biridir (Janda ve Abbott 2007). Ancak *M. bovis*’in 16s rRNA genini hedef alan PZR uygulamalarında spesifite çoğu mikoplazma türleri için yeterli olurken *M. agalactiae* ile çapraz amplifikasyon olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde daha spesifik genler PZR’da çoğaltılarak bu iki mikoplazma türü birbirinden ayırt edilmektedir (Bashiruddin ve ark. 2005).

McAuliffe ve ark. (2005) ise 16s rRNA genleri amplifiye edilmesini takiben denatüre edici jel elektroforez (DGGE) kullanarak veteriner ve insan hekimliği açısından önemli olan 67 mikoplazma türünü miks kültürden identifiye etmiştir.

#### **1.6.6.Real Time PZR**

PZR teknikleri etkinliğini ispatlamış olmasına rağmen konvansiyonel PZR’da siklusların sonunda amplikon belirlenmektedir. Amplifiye edilen DNA’nın görüntülenebilmesi için jel elektroforez aşamasına ihtiyaç duyulmaktadır buda ekstra süre ve işçilik gerektirmektedir. Real time PZR (qPZR)’da ise amplifikasyon eş zamanlı olarak görüntülenebilmekte ayrıca teknolojisi gereği jel elektroforez ve görüntüleme ekipmanlarına ihtiyaç duyulmamaktadır. Teknolojisinin gelişimiyle beraber günümüzde qPZR ile mikoplazma tespiti de yapılmaktadır. SYBR Green ve floresan prob yöntemleri qPZR’da kullanılan başlıca tespit metotlarıdır.

SYBR green çift zincirli DNA’ya bağlanan bir siyanin boyadır ve belirli bir dalga boyunda uyarıldığında yeşil renkli ışık saçmaktadır. PZR siklusları ilerlediğinde, hedef çift zincirli DNA amplifiye olduğunda orantısız olarak boyadan

saçılan ışık miktarı artmakta ve amplikon eş zamanlı olarak tespit edilebilmektedir (Wong 2013). SYBR Green, hedef diziyeye spesifik değildir ve tüm çift zincirli DNA'ya bağlanır busebeple prob temelli qPZR ile kıyaslandığında arka plandaki sinyal artmakta ve spesifitesi düşük olmaktadır. SYBR green temelli analizlerde analiz spesifitesini artırmak amacıyla amplifikasyon sonrasında erime eğrisi analizi yapılarak farklı türde mikoplazmalar ayırt edilmektedir. Kültürle kıyaslandığında SYBR green tespit metodunun anlamlı derecede daha duyarlı olmadığı ancak farklı türdeki etkenleri tespit edilebilmesine imkan sağladığı belirlenmiştir (Parker ve ark. 2018)

qPZR analizlerinde spesifiteyi artırmak amacıyla floresan raportör prob metodu geliştirilmiştir. Bu metotta hidroliz probu kullanılmaktadır ve primer hibridizasyonuna ilaveten primer bağlanma bölgeleri arasında bir hedef bölgeye prob bağlanmaktadır. Probun 5' ucuna floresan boya, 3' ucuna ise baskılayıcı bağlanmış vaziyettedir. Probun iki ucu birbirine yakın olduğu durumda baskılayıcı kısmı floresan yayılmasını engellemektedir. Amplifikasyon aşamasında probun hedef diziyeye bağlanmasını takiben Taq polimeraz'ın ekzonükleaz aktivitesi ile prob bütünlüğü bozulmaktadır. Prob parçalandığında floresan boya açığa çıkmakta ve belirli bir dalga boyunda ışımaya yapmaktadır. Bu sebeple floresan boya miktarındaki artış hedef amplifikasyon ile doğru orantılı olmaktadır. Spesifitesi yüksek olması dolayısıyla *M. bovis*'i qPZR'da tespit etmek amacıyla çeşitli prob temelli metotlar geliştirilmiştir (Cai ve ark. 2005, Clothier ve ark. 2010, Rossetti ve ark. 2010, Sachse ve ark. 2010, Boonyayatra ve ark. 2012). Prob temelli metotlarda 16S rRNA geni hedef olarak seçildiğinde hala *M. agalactiae* çapraz amplifikasyonu olmaktadır (Cai ve ark. 2005). Bu durum alternatif hedef gen belirleme ihtiyacını ortaya koymaktadır.

PZR'da *uvrC* geni dahi iyi bir hedef gen olarak saptanmıştır ve *M. agalactiae*'de dahil olmak üzere diğer mikoplazma türleri ile çapraz amplifikasyon vermemektedir. *uvrC* geni DNA onarımında gerekli olan bir enzim olan deoksiribodiprimidin fotolyaz'ı kodlayan stabil bir gendir. qPZR ile yapılan validasyon çalışmalarında akciğer, süt, eklem sıvısı, burun svabı, bronkoalveolar lavaj sıvısı, trakeal yıkama sıvısı ve kulak svablarında *M. bovis* tespit edilmektedir (Clothier ve ark. 2010). Saf kültürde, akciğer ve süt örneklerinde tespit limiti sırasıyla  $2.4 \times 10^1$ ,  $2.4 \times 10^2$ ,  $2.4 \times 10^2$  kob/ml tespit edilmiştir.

*M. bovis* spesifik problarda hedef gen olarak *oppD* geni de PZR uygulamalarında spesifiteyi artırmak amacıyla kullanılmıştır ve *M. agalactiae* ile çapraz amplifikasyon vermediği tespit edilmiştir. *oppD* geni ABC-transporter familyasının bir üyesidir ve oligopeptide permeaz kodlamaktadır. Oligopeptide permeaz kısa peptidlerin bakteri hücre membranına geçişini kolaylaştırmaktadır. *M. bovis*'i tespit etmek amacıyla bu gen bölgesi süt örnekleri ve burun svablarında valide edilmiştir ve tespit limiti 100 cfu/ml olarak belirlenmiştir (Sachse ve ark. 2010).

Başka bir çalışmada ise 268 sığır kökenli mikoplazma izolatu *M. bovis*'te dahil üç mikoplazma türü yönünden prob temelli PZR ile incelenmiştir. *M. bovis* hedef geni olarak translasyon aşamasında gerekli olan uzama faktörü G'yi kodlayan *fusA* geni hedef dizi olarak seçilmiştir. Metodun sensitivitesi %98.5 tespit edilmiştir (Boonyayatra ve ark. 2012)

### **1.6.7.Suş Tiplendirme**

Tiplendirme sistemlerinin *M. bovis* enfeksiyonu epidemiyolosinde sürülerde ve büyük populasyonlarda yeni bir bakış açısı getirmesi beklenmektedir. Yeni kontrol stratejileri belirlenmesi moleküler tiplendirme metotları sayesinde yapılabilmektedir (Nicholas ve ark. 2016). Sodium dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) gibi geleneksel tiplendirme sistemleri farklı ağırlıklarda proteinleri tespit edebilmesine rağmen suşlar arasında yeterli düzeyde ayırım yapmaya olanak sağlayamamıştır. Günümüzde moleküler metotlar sayesinde daha iyi ayırım gücü elde edilebilmektedir. Rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD), amplifiye fragman uzunluk polimorfizmi (AFLP), pulsed field jel elektroforez (PFGE), insersiyon sekans tiplendirme (IS), çok lokuslu sekans tiplendirme (MLST), çok lokuslu değişken sayıda tandem tekrar analizi (MLVA) gibi metotlar *M. bovis* izolatlarını karşılaştırmada kullanılmaktadır

PFGE metodunda bakteri kromozomu restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmekte ve farklı büyüklükteki DNA fragmanları agaroz jelde yürütülerek suşlara ait band paternleri elde edilmektedir. Bazı *M. bovis* salgını vakalarında PFGE metodu suşları kıyaslamak için kullanılmıştır (Arcangioli ve ark. 2012). PFGE metoduyla İngiltere’de yapılan bir çalışmada *SmaI* enzimi kullanıldığında 43 izolattan 23 farklı profil ortaya konmuştur (McAuliffe ve ark. 2004). PFGE metodunun RAPD ve AFLP metotları ile uyumu genotipe göre değişkenlik göstermekle birlikte grup A izolatlarında %77-85 arasında, grup B izolatlarında ise daha az olmaktadır. Vsp ekspresyonu ile AFLP, RAPD ve PFGE metotları arasında ilişki bulunamamıştır buda Vsp lokusunda meydana gelen rekombinasyonun moleküler tiplendirme metotlarında değişkenliğe neden olmadığını göstermektedir. RAPD ve AFLP metotlarına kıyasla PFGE metodu ayırım gücünün yüksek olması ile ön plana çıkmaktadır fakat yapılışının uzun sürmesi, yoğun emek gerektirmesi ve tüm izolatların tiplendirilememesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.

### **1.6.8.Seroloji**

*M. bovis*’e maruz kalan hayvanları belirlemede seroloji etkili bir metottur ve kronik vakalarda veya antibiyotik tedavisi uygulananlar gibi etkenin üremesini engelleyen durumlarda seroloji kültürden daha duyarlı olabilmektedir. *M. bovis*, antikor cevabı sağlayan lipid ve protein antijenlere sahiptir ve antikor seviyeleri aylarca yüksek seviyede kalabilmektedir (Nicholas ve Ayling 2003). Seroloji, enfeksiyondan arı sığır sürülerini belirlemede faydalıdır fakat çoğu populasyondaki yüksek seropozitiflik rutin teşhiste kullanımını sınırlamaktadır ve antikor titreleri ile hastalığa dayanıklılık arasında bir korelasyon saptanamamıştır.

İndirekt hemaglutinasyon, film inhibisyon ve indirekt ELISA gibi çeşitli serolojik testler geliştirilmiştir. Serolojik testlerde kullanılan indirekt ELISA metodunda tüm hücre antijeni veya işlem görmüş antijen pleyt tabanına kaplanmıştır ve üretilen kitler çeşitli ticari firmalar tarafından satışa sunulmuştur. ELISA testi *M. bovis* enfeksiyonunun seroprevalansını değerlendirmede ve hastalıktan

ari sürü oluşturma sürecinde *M. bovis* ari sığır seçme kısmında kullanılmaktadır (Grandve ark. 2002). Süt örneklerinde *M. bovis* antikorlarını belirlemede ELISA testi kullanılmaktadır ve bu sayede enfekte meme loblarının tespit edilmesi mümkün olmaktadır (Byrne ve ark. 2000). Kompetatif ELISA testinde ise hedef antijen olarak *M. bovis* tüm hücre lizatu ve monoklonal bloke edici antikor kullanılarak serumdaki antikorlar yüksek sensitivite ve spesifite ile tespit edilebilmektedir (Ghadersohi ve ark. 2005).

Diğer ELISA'lar da ise *M. bovis* proteinlerine spesifik antikorlar saptanabilmektedir ve bu kitlerde hedef antijen olarak rekombinant VspA (Brank ve ark. 1999) ve *M. agalactiae*'nın P48 membran lipoprotein homologu kullanılmaktadır. P48 proteinine karşı sentezlenen antikor, test edilen tüm *M. bovis* izolatlarını identifiye etmiş ve *M. bovis* P48 ELISA'nın spesifik bir enfeksiyon belirteci olarak yararlı olabileceği kanısına varılmıştır (Robino ve ark. 2005).

### **1.6.9. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri**

Mikoplazmaların antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemede çeşitli metotlar kullanılmıştır. Eski çalışmalarda agar dilüsyon yöntemi tercih edilmiştir (Bebear ve ark. 1997). Fakat bu metot az sayıda izolatu test etmede pratik olmaması, mikoplazmaların yavaş üremesi neticesinde kullanışlı olmaması ve MİK değeri ile zon çapları arasında korelasyon olmaması sebebiyle pratikte pek tercih edilmemektedir. Günümüzde en yaygın kullanılan metot broth dilüsyon metodudur. Broth dilüsyon metodu ekonomik olması ve aynı pleytte farklı antibiyotiklerle çalışılmasına olanak tanınması sebebiyle pratikte sıklıkla kullanılmaktadır. Broth dilüsyon testinin "Sensititer" versiyonunda ise antimikrobiyal etkenler pleyte önceden kaplanmış vaziyettedir ve antibiyotik hazırlama-sulandırma aşamalarında zamandan tasarruf sağlamaktadır. E-test metodu ise kullanım kolaylığı, inokulum yoğunluğundan daha az etkilenmesi ve MİK değerinin stabil olarak saptanabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Bu metotlar *M. bovis* izolatlarının antimikrobiyal

duyarlılıklarını belirlemede çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Kobayashi ve ark. 1996, Hannan 2000).

Hangi metot kullanırsa kullanılsın, mikoplazmaların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemede evrensel bir rehber mevcut değildir. Referans MİK değerlerinin belirlenmemiş olması nedeniyle farklı antimikrobiyal maddelerin duyarlılık değerlendirmesi Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) değerleri baz alınarak yapılmaktadır. Japonyada MİK değerleri insan patojenleri (Hirose ve ark. 2003) baz alınarak tetrasiklin, makrolid, aminoglikozid ve florokinolonlar için sırasıyla 1.0, 0.5–2.0, 2.0–4.0 ve 1.0–2.0 kabul edilmektedir (Japonya kemoterapi derneği, 1994). Hayvanlardan izole edilen mikoplazmaların MİK değerleri belirlenirken CLSI kriterleri yanı sıra yapılan çalışmalardaki MİK değerleri de referans in vitro aktivite değerleri olarak yorumlanmalıdır (Rosenbusch ve ark. 2005).

#### **1.6.10. Antimikrobiyal Direnç**

*M. bovis* izolatlarının antimikrobiyal direnci Avrupa (Wachowski ve Kirchhoff 1986, ter Laak ve ark. 1993, Ayling ve ark. 2000, Nicholas ve Ayling 2003), Kanada (Francoz ve ark. 2005), Amerika (Rosenbusch ve ark. 2005), İtalya (Mazzolini ve ark. 1997) ve Japonya'da (Hirose ve ark. 2003) çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir. Avrupa ve Amerikada'ki çalışmalarda yüksek düzeyde tilmikosin, eritromisin, ampisilin ve seftiofur, orta düzeyde oksitetrasiklin, düşük düzeyde olsa enrofloksasin, florfenikol ve spektinomisin direnci tespit edilmiştir (Rosenbusch ve ark. 2005). Amerika izolatları ile karşılaştırıldığında Hollanda ve İngiltere izolatlarında oksitetrasiklin ve klortetrasiklin direncinin yaygın olması, İngiltere izolatlarında florfenikol direncinin tespit edilmesi izolatlar arasındaki esas farklılığı teşkil etmektedir. Kanada'da yapılan bir çalışmada enrofloksasin duyarlı bulunmuş, tetrasiklin, spektinomisin, azithromisin ve klindamisine kazanılmış direnç tespit edilmiştir (Francoz ve ark. 2005). Japonya'daki farklı bir çalışmada; tüm *M. bovis* izolatları tiamuline duyarlı saptanmış fakat eritromisin etkinliği tespit edilememiştir.



*M. bovis* izolatları referans suşlarla kıyasla spiramisin, oksitetrasiklin ve tylosine daha az duyarlı bulunmuş ve bu antimikrobiyallere olan direncin Japonya'da saha izolatlarında saptanabileceği sonucuna varılmıştır (Hirose ve ark. 2003). Hirose ve ark. çalışmasında elde edilen MİK sonuçları daha önce Japonya'da yapılan çalışmalara göre daha yüksek bulunmuştur (Katoh ve ark. 1996).

### 1.6.11. Virülens Faktörleri

Birçok mikoplazma türü konaklarında amino asit, nükleotit, yağ asitleri ve sterol gibi besin sağlayan mukozal yüzeylere adapte olarak canlılığını korumaktadır. Mikoplazmalarda besin gereksinimi, biyosentez, bakterinin konakçı hücreye tutunma ve immun cevaptan kaçma mekanizmaları daha iyi tanımlanmıştır ancak virülensin çoğu diğer özellikleri tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Değişken yüzey lipoproteinleri (Vsp)*M. bovis*'in en iyi karakterize edilen virülens faktörleridir. Bunlar bakterinin fenotipik değişkenliğine katkı sağlayan, bakterinin konak hücresine tutunmasında önemli rol oynayan, bakterinin protein ekspresyonu düzenlemesini anlamaya yardımcı olan immun dominant yüzey antijenleridir. *M. bovis*'te beş değişken yüzey antijeni tanımlanmıştır bunlar; VspA, VspB, VspC, VspF ve VspO dur (Sachse ve ark. 2000). Eksprese edilen proteinlerdeki faz ve boyut varyasyonu karakteristik özellikleridir. *M. bovis*'in çoğu veya tüm suşları Vsp proteinleri eksprese ederler; en çok eksprese olanlar VspB, VspO ve VspF iken VspA ve VspC daha az eksprese olurlar. Farklı Vsp kombinasyonları belirlenmiştir, yapılan bir çalışmada VspBO, VspB ve VspBF en yaygın bulunan kombinasyonlardır (McAuliffe ve ark. 2004). Vsp ekspresyonu, band paternleri ve antijenik heterojenite bakteri suşunun sabit bir özelliği değildir ancak vsp genlerinde rekombinasyon ve değişken düzeyde ekspresyonu ifade etmektedir (Rosengarten ve ark. 1994). İn vitro pasajlamalarda Vsp ekspresyonunun değiştiği, vsp protein ekspresyon profilinin genotip ile korelasyon göstermediği rapor edilmiştir (McAuliffe ve ark. 2004).

Vsp'ler en az 13 farklı vsp geni tarafından kodlanmaktadır. N ucu konservatiftir ve görevi bakteri membranına protein ilavesini sağlamaktır. Vsp proteinleri 6-87 amino asit'ten oluşan tekrarlı dizilerden oluşmaktadır (Sachse ve ark. 2000).

Vsp proteinlerindeki fenotipik değişkenlik vsp gen lokusundaki rekombinasyon olayları ve izolatlar arasındaki vsp genleri repertuar varyasyonu ile açıklanmaktadır. *M. bovis* izolatlarının ekprese edilen vsp genleri farklılık göstermektedir (Poumarat ve ark. 1999). Ayrıca vsp lokusundaki tekrarlı dizilerin delesyon ve insersiyon gibi rekombinasyon olayları kodlanan proteinde boyut ve antijenik değişkenlik ile sonuçlanırken bölge spesifik DNA inversiyonları ise karakteristik faz varyasyonu meydana getirmekte, kimerik Vsp proteinleri ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır (Flitman-Tene ve ark. 2003). Vsp proteinlerinin hastalık gelişimindeki rolü çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir bunlar; konakçı antikor yanıtından kaçma, mukozal yüzeylerde kolonizasyon, konak hücrelere bağlanma, lenfosit balastogenez ve sitokin sekresyonu baskılanmasıdır (Vanden Bush ve Rosenbusch 2004).

Vsp ile ilişkili olmayan diğer yüzey proteinlerinin konakçı hücreye adezyonda rolü olduğu gösterilmiştir. pMB67 enfeksiyon sürecinde üretilen antikorlar tarafından algılanan bir immunojenik proteindir. pMB67 Vsp'ler gibi in vitro koşullarda faz ve şekil değiştirme özelliğine sahiptir (Behrens ve ark. 1996). P26 antijeni 32kDa ağırlığında hidrofilik proteindir ve yarışmalı adezyon testinde önemli bir adezin olduğu gösterilmiştir. *M. bovis*'in konak hücrelere bağlanmasında gerekli bir faktör 28 kDa'luk bir proteindir (Sachse ve ark. 1996). *M. agalactiae*'da bulunan 40 kDa'luk bir proteinin adezin olduğu bildirilmiş ancak *M. bovis*'te pseudogen olarak tanımlanmıştır (Thomas ve ark. 2004).

Adezyon haricindeki diğer virülens faktörleri daha az çalışılmıştır. Bunlar polisakkarid toksin, diğer polisakkaritler, hidrojen peroksit, ısı şok proteinleri ve biyofilm oluşumdur. *M. bovis*'in 73 kDa'luk, ısıya dayanıklı, meme bezinde yangısal cevabı stimüle eden bir kompleks polisakkarid yapıda toksin üretimi bildirilmiştir (Geary ve ark. 1981). Sonraki bir çalışmada ise bu bulgu elde edilememiş ve *M. bovis*'te toksin üretimi ve önemi doğrulanamamıştır (Thomas ve

ark. 1986). *M. bovis*'in sahip olduğu diğer polisakkaritlerin ise diagnostik amaçlı potansiyeli olup patogeneezdeki rolü bilinmemektedir (Brooks ve ark. 2004).

Bazı mikoplazmalar hidrojen peroksit üretmektedir ve hidrojen peroksitin demirle reaksiyona girerek hücre membranında oksidatif hasar oluşturan hidroksil radikallerin oluşmasında rol aldığı düşünölmektedir. *M. bovis* suşlarının hidrojen peroksit üretiminde değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir ve üretimin in vitro pasajlar neticesinde azaldığı bildirilmiştir (Khan ve ark. 2005).

Mikoplazmalarda ısı şok proteinleri bulunmaktadır ve hsp60 genleri *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. arthritidis* ve *M. hyopneumoniae* türlerinde tanımlanmıştır. Sekans analizleri neticesinde bu genler arasında homolojinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Hsp60 füzyon proteinleri ve konvalesen serum örneklerinin Western Blot analizlerinde doğal enfeksiyonlarda mikoplazma hsp60'ın immunojenik karakterde olduğu ifade edilmiştir (Scherin ve ark. 2002), ancak bu cevabın koruyucu etkisi olduğuna veya proteinlerin virülensi etkilediğine dair kanıt saptanamamıştır.

Biyofilmler antimikrobiyal direncin yanı sıra genelde kurumaya ve ısıya dirençle ilişkilendirilmiştir. Mikoplazmalarda diğer bakteri türlerinde biyofilm oluşumu ile sorumlu olan genler olmamasına rağmen biyofilm oluşumu mevcuttur. Çalışmalarda Mikoplazmaların farklılaşmış yapıda kanal ve yığınlarla biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. *M. bovis*'te biyofilm oluşumunun suşa bağlı olduğu ve bazı vsp profilleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. VspF eksprese eden suşların zayıf biyofilm oluşturduğu, VspO veya VspB eksprese eden suşların ise bol miktarda biyofilm oluşturduğu rapor edilmiştir. Planktonik *M. bovis* hücrelerinde oksitetrasiklin biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir. Çevresel koşullarda *M. bovis*'in biyofilmde 30 saatin üzerinde canlı kaldığı bildirilmiştir (McAuliffe ve ark. 2006).

### **1.6.12.İmmun Yanıt**

*M. bovis* enfeksiyonlarının kontrolünde aşılamanın potansiyel rolü olması sebebiyle immun yanıt çalışmaları önemli bir ilgi odağı olmuştur. Seronegatif buzağular endemik *M.bovis* pnömonili buzağı grubuna katıldığında yeni katılan buzağular en az 29-35 gün süreyle seronegatif kalmışlar ancak 59-63 gün sonra serumda *M. bovis* antikor tespit edilmiştir (Nagatomo ve ark. 1996). Bu bulgu sürü içerisinde enfeksiyonun oldukça yavaş seyirli olduğunu, serum antikor seviyelerinin geç şekillendiğini göstermektedir. Doğal enfekte buzağuların serumlarında *M.bovis* spesifik IgM ve IgG şekillenmekte, IgA ise düşük miktarda olsada tespit edilebilecek düzeyde bulunmakta, nazal sekresyonlarda ve bronkoalveolar lavaj örneklerinde düşük seviyede *M. bovis* spesifik IgM - IgG ve seruma göre daha fazla IgA bulunmaktadır (Boothby ve ark. 1983). *M. bovis* antikor yarılanma ömrünün 20 gün olduğu tespit edilmiştir (Tschopp ve ark. 2001). Doğal enfekte buzağularda gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ve *M. bovis* kaynaklı lenfosit proliferasyonu baskılanması gibi hücresel immun yanıtların minimal düzeyde şekillendiği belirlenmiş (Boothby ve ark. 1983), ancak hücresel bağışıklık güncel metotlar ile çalışılmamıştır.

Deneysel enfeksiyonlarda immun yanıt daha iyi karakterize edilmiştir. Trake veya burun içi yolla 12 haftalık buzağulara inokulasyon yapıldığında enfeksiyondan 7 gün sonrasında tespit edilebilir seviyede IgG1 sekresyonu saptanmış ve oluşan bu yanıt enfeksiyon sonrasında 63 gün kadar artmaya devam etmiştir (Vanden Bush ve Rosenbusch 2003). Benzer olarak, ELISA ile yapılan başka bir çalışmada enfeksiyon sonrası 5'inci günde antikor saptanamamış, ancak enfeksiyondan 12 gün sonra antikor saptanabilmiştir (Nicholas ve ark. 2002). Deneysel enfeksiyonu takiben buzağuların serumunda IgM enfeksiyon sonrası 7'inci günde tespit edilmiş, 14'üncü günde maksimum seviyeye ulaşmış, serum IgG1 ise 1 hafta sonrasında buzağuların %50'sinde, iki hafta sonrasında hepsinde saptanmış, serum IgG2 ise 1 hafta sonrasında tespit edilememiş ancak 2 hafta sonra %80'ninde saptanmıştır (Howard ve ark. 1986).

Antikor cevabın antijene özgünlüğü çeşitli çalışmalarda tanımlanmıştır. Değişken yüzey lipoproteinler immun dominant antijenlerdir ve 3-7 amino asitlik epitoplara içermektedirler (Sachse ve ark. 2000). Antikor cevabı hedefleyen diğer

yüzey proteinleri Vsp familyasından farklı değişken protein olan pMB67 ve P48 yüzey lipoproteini'dir (Robino ve ark. 2005).

Deneysel enfekte buzağılarda CD8+ T hücrelerinin aktive olduğu, lenfosit blastogenez ve IL-2 reseptörü (CD25) ekspresyonu artışına bağlı olarak gd-T ve CD+4 T hücrelerinin daha az aktive olduğu ifade edilmiştir. IFN-γ üreten hücreler IL-4 üreten hücreler gibi benzer sayıda şekillenmiş ve antijen spesifik serum antikor cevabında IgG1'de artış şekillenmiş, IgG2 ise minimal seviyede kalmıştır (Vanden Bush ve Rosenbusch 2003).

*M. bovis* enfeksiyonları immunité çalışmalarında efektör mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Bakterinin havayolları, alveoller ve solunum epitel hücreleri ile olan ilişkisinde hücre dışı lokasyonu baz alındığında etkili antikor cevabının tutunmayı, bakteri opsonizasyonunu veya komplement aracılı öldürmeyi aktive etmesini engellediği düşünülmektedir. İmmunize donörde IgG1-IgG2 bulunduğu veya konvansiyonel olarak sığır yetiştiriciliği yapıldığında serumda bulunması neticesinde *M. bovis* komplementi klasik yolla aktive ettiğinde doza bağımlı olarak *M. bovis* ölmektedir. IgG1 komplement aracılı öldürmede IgG2'ye göre daha etkili bulunmuştur.

### **1.6.13.Hastalığın kontrolü**

#### **1.6.13.1.Aşılama**

Antimikrobiyal tedavilerle *M. bovis* enfeksiyonunun kontrolünde zorluklar yaşanması dikkati aşılama yoluyla kontrol üzerine yoğunlaştırmıştır. Yapılan çalışmalarda enfeksiyonun önlenmesi ve kontrol altına alınmasında aşılamanın katkı sağlaması hedeflenmiştir.

*M. bovis*'in yüzey proteinlerini değiştirerek ve immunmodülatör etki göstererek immun yanıtı kaçması buzağılarda *M. bovis* ilişkili hastalıklarda aşılamanın neden tam olarak koruma sağlayamadığını kısmen açıklamaktadır.

Deneysel çalışmalarda bazı vakalarda *M. bovis* aşısı etkinliği umut verici olmakla beraber (Nicholas ve ark. 2002), aşuların saha denemelerinde etkisiz olduğu veya hastalığı daha da şiddetlendirdiği bildirilmiştir (Soehnen ve ark. 2011). Saha şartlarında aşuların sınırlı etkinliği bildirilmesine rağmen bazı bakterin temelli aşular Amerika ve İngiltere’de *M. bovis* enfeksiyonlarının pnömonik formunda kullanılmak üzere satışı sunulmuştur (Nicholas ve ark. 2016). Ticari aşuların etkinlik düzeyi ile ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. Amerika’da Mycomune aşısı yetişkin sığırlarda *M. bovis* ilişkili mastitis vakalarının şiddetini ve süresini azaltmak amacıyla lisans almıştır. *M. bovis* ilişkili solunum sistemi hastalıklarında bakterin aşular mevcuttur bunlar; Pulmo-Guard, Mycomune R ve Myco-Bac aşularıdır. Bakterin aşının Florida’da endemik bölgede enfekte süt sığırlarında burunda kolonizasyonu engellemede etkisiz olduğu bildirilmiştir (Maunsell ve Donovan 2009)

*M. bovis* aşularında kullanılan adjuvanttipi aşının etkinliğini etkilemektedir. Emülsiyon, lipozom, antijen sunan hücreleri ve lipopolisakkaritleri hedef alan mikropartiküller, monofosforil lipid, saponin ve immun stimulatör sitokinler veteriner hekimliği sahasında kullanılan adjuvantlardır. İmmun yanıtın sadece adjuvant mı sorumlu yada aşı kaynaklı olup olmadığı belirlenmelidir. *M. bovis* aşı çalışmalarında saponin gibi adjuvantların kullanılmasının daha uygun olacağı ve başarı sağladığı bildirilmiştir. Bu aşının güvenli, immunojenik ve koruyucu etkisi *M. bovis* virulent suşları ile epruvasyon yapılan buzağılarda gösterilmiştir. Saponinli aşı denemelerinde aşılammış kontrol grubuna göre aşılana grupta kilo kaybını azaltmada aşının başarılı olduğu bildirilmiştir (Nicholas ve ark. 2002)

### **1.6.13.2.Yönetim**

*M. bovis*’e yönelik etkili bir aşı bulunmadığından dolayı bu patojenin sebep olduğu hastalıkların kontrolünde yönetim uygulamaları ön plana çıkmaktadır (Caswell ve Archambault 2008).

*M. bovis* enfeksiyonlarını önlemenin en etkili kontrol stratejisi sığırları işletmeye almadan önce test etmek ve karantina uygulayarak kapalı sürü oluşturmaktır. Bu tarz biyogüvenlik uygulamalarının pratik olmadığı açık sürülerde ise strateji; sığırların iyi beslenmesi, aşılama yoluyla diğer solunum sistemi patojenlerinin kontrol altına alınması, iyi havalandırma gibi uygulamalarla solunum ve immün sistemi güçlendirilerek hayvanların daha sağlıklı olması stratejisi üzerine yoğunlaşmaktadır. Ayrıca aşırı kalabalık barındırma ve soğuk stresi gibi stres durumları minimize edilmeye çalışılmalıdır (Maunsell ve Donovan 2009).

*M. bovis* enfekte sürülerde sütün pastörize edilmesi, kolostrum havuzundan kaçınılması ve kullanılan ekipmanların dezenfekte edilmesi gibi yöntemlerle etkene maruz kalma kontrol altına alınmalıdır. Klinik semptom gösteren buzağuların sağlam buzağulardan ayrı tutulması ve all-in, all-out prensibinin uygulaması önerilmektedir. Klinik semptom gösteren sığırlara etkili antibiyotiklerin çabucak uygulanması da önerilen bir kontrol stratejisidir ancak antibiyotiklerin metaflaktik amaçlı olarak kullanılması genelde arzu edilmemektedir. Hayvan refahı ön planda olduğu durumlarda ise sığırların sürüden çıkarılması tavsiye edilmektedir (Maunsell ve Donovan 2009).

### **1.6.13.3.Tedavi**

Yönetim uygulamalarının yanında *M. bovis* enfeksiyonu kontrolü amacıyla hastalığın erken dönemlerinde antimikrobiyal uygulamalara başvurulmaktadır. Mikoplazmaların hücre duvarları yoktur, folik asit sentezleyemezler ve bu nedenlerle B-laktam ve sülfonamidlere doğal dirençlidirler. Ayrıca mikoplazmalar tedavi esnasında antimikrobiyal etken uygulama sayısı sınırlı olan polimiksin, trimetoprim, nalidiksik asit ve rifampin gibi antibiyotiklere de doğal direnç gösterirler. Başlıca protein veya nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotik grupları *M. bovis*'e etkilidir ancak uygulanacak olan lisanslı antibiyotik azdır ve artan oranda direnç gelişimi tespit edilmektedir (Lysnyansky ve Ayling 2016).

Antibiyotik tedavisi mastitis vakalarında genelde sonuç vermemektedir fakat pnömoni vakalarında bazı durumlarda tedaviye cevap alınmaktadır ve ekonomik kayıpların önüne geçilmektedir (Nicholas ve ark. 2016). Rutin uygulamada antimikrobiallerin potansiyel in vivo etkinliği in vitro duyarlılık testlerinde değerlendirilmekte ve MİK değerleri belirlenmektedir. Fakat in vitro antimikrobiyal test sonuçları yorumlanırken hedef organdaki uygulanan antibiyotik yoğunluğu ve biyofilm oluşumunun tedavi etkinliğini etkilemesi gibi in vivo faktörler de hesaba katılmalıdır (McAuliffe ve ark. 2006). Hayvanlardan izole edilen mikoplazma türlerinde in vitro antimikrobiyal duyarlılık rehberi yayınlanmıştır ancak standart kalite kontrol suşları ve sınır değerleri bulunamaması duyarlılık yorumlamayı güçleştirmektedir. Mikoplazmaların antimikrobiyal aktivitelerini saptamadan önce izolasyon aşamalarının uzun sürmesi nedeniyle genelde ampirik tedaviye başlanması tedavide başarısızlıkla sonuçlanabilmekte ve kritik önemli antimikrobiyallere karşı direnç gelişebilmektedir (Lysnyansky ve Ayling 2016).

*M. bovis* enfeksiyonlarının kontrolünde erken teşhis önemlidir ve tedavide florokinonlar, tetrasiklinler, makrolidler ve florfenikol gibi antimikrobiyal uygulaması önerilmektedir (Apley ve Coetzee 2013).

Florokinolon'lar bakteride DNA sentezini engelleyen topoizomerezlara etki ederek mikoplazmasidal etki gösterirler. Florokinonlar sığır mikoplazma tedavisinde etkili ajan olarak kabul edilirken bazı ülkelerde MİK değerinin yüksek ( $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$ ) olduğu bildirilmiştir (Gerchman ve ark. 2009). Florokinonların in vivo kullanımı tartışmalıdır. Deneysel uygulamalarda *M. bovis* pnömonili buzağılarda enrofloksasin oral yolla kullanıldığında klinik semptomları hafiflettiği ve marbofloksasin'in solunum sistemi hastalıklarında etkili olduğu rapor edilmiştir (Stipkovits ve ark. 2005). Mikoplazmalarda florokinolon direnç gelişimi genelde kinolon direnci belirleyen bölgelerdeki topoizomerez kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır ancak efluks pompası fazla eksprese olduğunda ilacın etkinliğinin azaldığı da bildirilmiştir (Lysnyansky ve Ayling 2016).

Tetrasiklin'ler ve spektinomisin ribozomun 30S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini engellerler. Bu antibiyotiklere karşı bazı ülkelerde direnç artışı bildirilmiştir (Ayling ve ark. 2014, Gautier-Bouchardon ve ark. 2014). Klinik



kullanımında oksitetrasiklin uygulamasının buzağılarda *M. bovis* ilişkili pnömoni vakalarında fayda sağladığı, otitis media ve interna tedavisinde tavsiye edilen antibiyotik olduğu rapor edilmiştir (Bertone ve ark. 2015). Buzağılarda *M. bovis* ilişkili pnömoni vakalarında spektinomisin kullanımının klinik seyri değiştirmedeği ancak akciğerdeki bakteri sayısını azalttığı bildirilmiştir (Poumarat ve ark. 2001). Patojenik mikoplazmalarda tetrasiklin ve spektinomisin direnci 16S rRNA geni tetrasiklin veya spektinomisin bağlama bölgelerindeki nokta mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.

Makrolid ve linkozamid'ler ribozomun 50S alt ünitesine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Makrolid'ler akciğerde iyi dağılım gösterirler ve fagositik hücelere penetre olabilmeleri solunum sistemi ve hücre içi enfeksiyonları tedavisinde kullanılmalarına imkan vermektedir (Reeve-Johnson 1999). Günümüzde 23SrRNA makrolid bağlanma bölgelerindeki bir veya daha fazla sayıda nokta mutasyonları sonucundan çoğu ülkede makrolidlerin *M. bovis* tedavisinde etkinliğini yitirdiği rapor edilmiştir (Kong ve ark. 2016).

Solunum sistemi vakalarında tilmikosinin klinik etkinliği önceki çalışmalarda gösterilmiştir ancak sonrasında *M. bovis* ilişkili hastalıklarda fazla antibiyotik kullanımına bağlı olarak kazanılmış direnç yayılımı sayesinde tedavide etkisiz olduğu rapor edilmiştir (Hendrick ve ark. 2013). Yeni bir yarı sentetik makrolid olan tulathromisin buzağılarda *M. bovis* ilişkili solunum sistemi vakalarının önlenmesi ve tedavisinde oldukça etkilidir. Tulathromisin'in yavaş eliminasyonu ve akciğerde iyi dağılması sayesinde etkinliği suşların MİK değerinden bağımsızdır (1 veya >64 µg/ml) (Godinho ve ark. 2005).

Veteriner sahada mikoplazmastatik etkili olan pleuromutilin ve florfenikol yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antimikrobiyaller ribozomun 50S alt ünitesine bağlanarak etki gösterirler. Yapılan çalışmalarda pleuromutilin MİK değerini düşük olduğu, florfenikol MİK değerlerinin ise hafif artış gösterdiği rapor edilmiştir (Lysnyansky ve Ayling 2016). Klinik kullanımda florfenikol, kısmen mikoplazmalar ile ilişkili solunum yolu hastalıklarının tedavisinde etkili bulunmuştur (Godinho ve ark. 2005).

## 1.7 *Pasteurella multocida*

### 1.7.1. Taksonomi

*Pasteurella* ilk olarak 1881 yılında Pasteur tarafından Tavuk kolerası etkeni olarak izole edilmiş ve günümüze kadar taksonomisi ve isimlendirmesi çokça değişmiştir. Yaklaşık yarım asır boyunca biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine göre *Pasteurella septica*, 1939 yılında ise *Pasteurella multocida* olarak isimlendirilmiştir (Fajfar-Whetstone ve ark. 1995). Sonrasında *Pasteurella* cinsi üyeleri şeker ve fermentasyon testlerine göre on bir türe, *Pasteurella multocida* ise *multocida*, *septica* ve *gallicida* olmak üzere üç alt türe ayrılmıştır. *P. multocida* subsp. *multocida*'yı *P. multocida* subsp. *septica*'dan ayırt etmede M13 fingerprint moleküler tekniği ve alfa glukosidaz aktivitesinden faydalanılmaktadır (Hunt Gerardo ve ark. 2001). *Pasteurella* cinsinin en önemli patojenik üyesi olan *P. multocida* subsp. *multocida*'nın vahşi ve evcil hayvan türlerini kapsayan geniş bir konak spektrumu vardır. *P. multocida* subsp. *gallicida* ve *septica* alt türleri ise sırasıyla tavuklardan ve evcil petlerden izole edilmektedir. Kaplan ısırıklarıyla ilişkili olan dördüncü bir alt tür (*tigris*) ise fenotipik özellikleri ve 16S rRNA sekans karşılaştırması sonucunda önerilmiştir (Capitini ve ark. 2002).

*P. multocida* birçok hayvan türünde çeşitli hastalık sendromları ile ilişkili olarak primer veya sekonder patojen olarak kabul edilmektedir. Primer veya hastalık gelişiminde esas sorumlu patojen olarak sığır ve mandalarda hemorajik septisemi, kanatlılarda kolera, domuzlarda ise atropik rinitis vakalarından sorumlu olmakta, sekonder patojen olarak ise hastalığın gelişimi için gerekli olan diğer faktörler ile beraber hastalık tablosunu şiddetlendirmektedir. Sekonder patojen olarak sığırlarda BRD veya domuz solunum sistemi hastalığı gibi alt solunum sistemi hastalıkları *P. multocida*'nın sebep olduğu başlıca hastalıklardandır (Wilkie ve ark. 2012).

*P. multocida*'nın kapsül yapısı ve lipopolisakkarid (LPS) bileşimi bakterinin serogrurlara ve serotiplere göre sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. *P. multocida*'nın beş kapsül grubunu (A, B, D, E ve F) ve 16 somatik serotipini (1–

16) belirlemede pasif hemaglutinasyon, agar jel immün difüzyon testleri ve PZR kullanılmaktadır.

Serogrup A ve D kanatlılarda Tavuk kolerası etkenidir. Serogrup F suşları hasta kanatlılardan özellikle hindilerde sıklıkla izole edilmektedir (Catry ve ark. 2005). Domuzlarda atropik rinitis ve pnömoni A ve D serogruplarının toksijenik suşları ile ilişkili bulunmuştur. Sığır pastörellozu hastalık semptomlarına bağlı olarak farklı coğrafya ve etiyojolojiye göre iki şekilde görülmektedir. Tropikal bölgelerde *P. multocida* B ve E kapsüler tipleri manda ve sığırlarda hemorajik septisemiden sorumlu iken hastalık batılı ülkelerde solunum sistemi problemi şeklinde görülmektedir (Catry ve ark. 2002). Dünya genelinde *P. multocida* A grubu izolatları BRD'nin esas etkenleri arasındadır.

### 1.7.2. İzolasyon

*P. multocida* nutrient agar, kanlı ve çikolata agar gibi temel laboratuvar besiyerlerinde üreyebilmektedir. Ayrıca dekstroz nişasta agar veya triptik soya agar ilk izolasyonda tavsiye edilmektedir (Christensen ve Bisgaard 2000). Agarda %5-10 düzeyinde sığır veya koyun kanı kullanıldığında izolasyonda yeterli üreme sağlanmaktadır.

*P. multocida* izolasyonu amacıyla alınacak örnekler hastalığa özgüdür. Üst solunum yolları veya taşıyıcılıkla ilgili *P. multocida* izolasyonunda en uygun örnekler nazofarink svablar veya tonsiller dokudur. Hemorajik septisemi ve Kanatlı kolerası gibi septisemik durumlarda yeni ölmüş hayvanlardan alınan kalp kanı veya iç organlar saf kültür elde etmek amacıyla tercih edilmektedir (Glisson ve ark. 2003). Gelişmiş ülkelerin kırsal kesimlerinde septisemi vakalarında taze doku örneğine ulaşamazsa kemik iliği veya beyin dokusu inokulasyon amaçlı kullanılabilir.

*P. multocida* ilk izolasyonda konakçı mikroflorasındaki diğer bakterilerin aşırı üremesi durumlarında baskılanabilir. Selektif besiyerleri ile bu durum aşılabilir ancak selektif besiyerleri kullanıldığında saf ve kontamine örneklerdeki izolasyon

oranı düşmektedir (Moore ve ark. 1994). Klindamisin, gentamisin, neomisin, amikasin, vankomisin, basitrasin ve kanamisin gibi antimikrobiyaller tekli veya kombinasyon şeklinde besiyerlerine katılarak *Pasteurella* izolasyonu için selektif besiyerleri elde edilmiştir. Ancak izolasyonda değişken sonuçlar alınmıştır sebebinin ise konakçı mikroflorasının besiyeri seçiciliğini etkileyebileceği bildirilmiştir (Muhairwa ve ark. 2001).

### 1.7.3. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

Klinik örneklerden *P. multocida* tespitinde her ne kadar PZR gibi hızlı alternatif yöntemler kullanılsada standart fenotipik identifikasyon yöntemleri kesin teşhiste önemini korumaktadır. İzolasyonu takiben *P. multocida*'nın olası identifikasyonu kanlı agardaki yuvarlak, gri renkli, hemolitik olmayan, mukoid veya mukoid olmayan tatlımsı kokuya sahip kolonilerin karakteristiğine göre değerlendirilmektedir. Ancak *P. multocida* kolonilerinde konakla ilişkili olarak koloni morfolojisinde değişimlere rastlanmaktadır. Mukoid koloniler genelde sığır, domuz ve tavşanlarda pnömonik lezyonlardan, mukoid olmayan karakterdeki koloniler ise genelde kanatlılardan izole edilmektedir. Doku ve kandan yapılan preparatların Giemsa boyanmasında bipolar mikroskobik görüntü tipiktir. Seri pasajlar sonunda kapsüler materyal azalmakta ve kapsülsüz mutant suşlar ortaya çıkmaktadır.

Birçok biyokimyasal test *P. multocida*'nın kesin identifikasyonunda kullanılmaktadır ancak çoğu laboratuvarında bu testler nadiren uygulanmaktadır (Christensen ve ark. 2007). *P. multocida*'nın olası tespiti genelde hastalık sendromu ve konak ilişkisi, üreme karakteristiği, koloni morfolojisi, kokusu, bipolar boyanma, oksidaz ve katalaz testlerinde pozitif reaksiyon, MacConkey agarda üreme olmaması ve indol testi sonucu değerlendirilerek yapılmaktadır. İdentifikasyonda en hızlı metot bahsedilen fenotipik metotlarla genotipik testlerin kombine edilmesidir.

#### 1.7.4. Moleküler Teşhis

Kültür koşullarının morfoloji, şeker fermentasyon testleri ve serolojik özellikleri etkileyebilmesi sebebiyle *Pasteurella* türlerinin suş tanımlamasında fenotipik metotlar epidemiyolojik çalışmalarda güvenilir ve stabil bir yöntem değildir (Hunt ve ark. 2000). Moleküler metotlar ise bu dezavantajları ortadan kaldırmakta ve hızlı tespit, teşhisin güvenilirliği, tür içi genetik ilişkilerin anlaşılabilmesi gibi üstün yanları bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda özellikle virulent suşların ve kökeninin belirlenmesi açısından alt tiplendirme önemlidir. Antimikrobiyal direnç ile ilgili olarak direnç genlerinin horizontal ve klonal ilişkisini ayırt etmede, uluslararası ölçekte dirençli suşların ilişkisinin belirlenmesinde moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır (Aarts ve ark. 2001). İdeal tiplendirme yönteminin; belirli tür içerisindeki tüm mikroorganizmaların tiplendirilebilmesi, ayırım gücünün ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, maliyeti düşük, verilerin kolay yorumlanabilir, farklı laboratuvarlar arasında veri alışverişine olanak sağlaması arzu edilen özellikleridir.

*Pasteurella* türlerinin tanımlanmasında 16S rRNA sekans yöntemi taksonomik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu yöntem iyi laboratuvar ekipmanı ve tecrübe istemesi sebebiyle günümüzde en sık kullanılan alternatif yöntemler tür spesifik PZR ve moleküler fingerprint yöntemleridir. PZR’da çeşitli çalışmalarda farklı genler hedef dizi olarak kullanılmıştır. *toxA* gen (Nagai ve ark.1994) , *psl* gen (Kasten ve ark. 1997), tRNA-intergenic spacer (Cattray ve ark. 2004), 16S rRNA (Corney ve ark. 2007) ve KMT1 gen (Townsend ve ark. 1998) bölgelerine spesifik primerler diagnostik amaçlı klinik örneklerden *P. multocida*’yı tespit etmek üzere kullanılmıştır. *P. multocida*’nın *cap* lokusuna spesifik beş farklı kapsüler tipini belirleyen bir multipleks PZR metodu geliştirilmiştir (Townsend ve ark. 2001). PFGE, lokus spesifik RFLP, RAPD, Rep-PZR ve AFLP gibi moleküler fingerprint metodlarında bakteri suşlarına özgü bantlar elde edilmekte ve bu metotlar tiplendirme aşamalarında kullanılmaktadır.

### 1.7.5. BRD ile İlişkisi

Neonatal buzağı (enzootik) pnömonisi ve besi sığırı pnömonisi (shipping fever) dahil olmak üzere BRD kompleksini tanımlayan klinik sendromlarla ilişkili primer bakteriyel patojenlerden birinin *P. multocida* olduğu açıktır (Welsh ve ark. 2004). İki klinik sendrom da multifaktöriyeldir ve hastalığın gelişiminde birçok enfeksiyöz etkenler ve enfeksiyöz olmayan sebepler de yer almaktadır.

Buzağılarda solunum sistemi problemlerinde *P. multocida* ile ilişkili güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Bunlar akciğer dokusundan (Hirose ve ark. 2003), nazofaringeal (Catry ve ark. 2006) ve trakeal svablardan (Virtala ve ark. 2000) etkenin kültür sonuçlarıdır. *P. multocida*'nın buzağı pnömonisindeki önemi shipping fever'a göre daha belirgindir. Sütçü buzağılarda yapılan çalışmaların çoğunda *M. haemolytica*'ya göre *P. multocida* prevalansı yüksek bulunmuştur (Virtala ve ark. 2000, Nikunen ve ark. 2007). Solunum sistemi problemi olan 84 buzağıda yapılan bir çalışmada buzağılarda *P. multocida* bulunması ile serum akut faz proteinleri (fibrinojen, haptogloblin, serum amyloid-A, LPS-bağlayan protein ve a1-asit glikoprotein) arasında önemli bir ilişki tespit edilmiştir ve *P. multocida*'nın solunum sistemi problemi olan buzağılarda etkili bir patojenik rolü olduğu belirtilmiştir (Nikunen ve ark. 2007). Bakteriyel, mikoplazmal ve viral etkenlerin araştırıldığı bir çalışmada ise 280 farklı süt sığırı işletmesindeki 396 buzağı incelendiğinde *P. multocida*'nın en sık izole edilen etken olduğu ve sağlıklı, süpheli ve hastalıklı buzağılarda sırasıyla %26.4, % 32.6 ve % 42.3 oranında trakebronşiyal lavaj örneklerinden izole edildiği bildirilmiştir (Autio ve ark. 2007). Ancak etkenin izole edilmesi hastalık olduğu anlamını taşımamaktadır. Bir çalışmada kontrol gurubundaki buzağılarda *P. multocida* serokonversiyonu, etkenin doğada bulunduğunu ve hastalıkta birçok faktörün rol aldığını doğrulamaktadır (Virtala ve ark. 1996).

*P. multocida*'nın shipping fever'daki rolü birçok metotla belirlenmiştir. Etken ölümcül vakalarda akciğerlerden çeşitli çalışmalarda izole edilmiştir (Watts ve ark. 1994, Fulton ve ark. 2000, Welsh ve ark. 2004, Gagea ve ark. 2006). Shipping fever vakalarında *M. haemolytica* sıklıkla izole edilmektedir ancak işletmelerdeki ölümcül

solunum sistemi vakalarında *P. multocida*'nın rolünün arttığı rapor edilmiştir. Bu artıştaki potansiyel sebepler ise patojenler arasındaki virülens değişimi, antimikrobiyal maddelerin etkinliği ve hasta hayvanların yönetimidir (Welsh ve ark. 2004). *P. multocida* hasta hayvanların burun, nazofaringeal, bronkoalveolar lavaj ve transtrakeal örneklerinden izole edilmektedir. Solunum sistemi hastalıklarında bronkoalveolar lavaj örneklerinin %40'ında *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (Allen ve ark. 1992). Ancak nazal farinks bölgesinde *P. multocida* izolasyonunun hastalık olduğu anlamına gelmediği, benzer şekilde buzağılarda yüksek oranda serolojik cevap oluşumunun da hastalığın göstergesi olmadığı rapor edilmiştir (Virtala ve ark. 2000). Bu bulgular *P. multocida*'nın sağlıklı ve hasta buzağılarda bulunabileceğini, etkene maruz kalan veya etkeni taşıyan tüm buzağılarda pnömoni tablosunun şekillenmeyeceğini göstermektedir. Bununla birlikte hasta buzağuların burun delikleri, trakea ve bronşiyollerinde etkenin bulunması etkenin hastalıkta rolü olduğu anlamını taşımaktadır.

BRD vakalarında *P. multocida* serotipi ve serogrup özgünlüğü sınırlı olmakla birlikte BRD vakalarında *P. multocida* serogrup A suşlarının en sık izole edildiği rapor edilmiştir (Nikunen ve ark. 2007). Pnömonik lezyonlu akciğerlerde *P. multocida* izolatlarının %61'inin serogrup A, %25'inin ise serogrup D olduğu, en yaygın serotipinin ise 3 olduğu bildirilmiştir (Blanco-Viera ve ark. 1995). Hindistan'da farklı hayvan türlerinden izole edilen *P. multocida* izolatlarında A:3 serotipinin en yaygın olduğu ifade edilmiştir (Kumar ve ark. 2004). Diğer çalışmalarda ise pnömoni vakalarından elde edilen izolatların %80'ni serotip A:3 (Dabo ve ark. 1997), başka bir çalışmada ise izolatların %92'si serogrup A bulunmuştur (Ewers ve ark. 2006).

### **1.7.6. Virülens Faktörleri**

#### **1.7.6.1. Adezyon ve Kolonizasyon Faktörleri**

Bakteriyel enfeksiyonlarda konakta tutunma birincil önkoşuldur ve tutunmada rol alan ligandlar potansiyel virülens faktörleridir. Çeşitli çalışmalarda, farklı *P. multocida* izolatlarının farklı hücre tiplerine, dokularına veya organlarına adezyonu incelenmiş ve serogruplara özgü konakçı tercihi ve patojenite araştırılmıştır (Borrathybay ve ark. 2003, Ali ve ark. 2004a). Adezyon mediatörü olarak *P. multocida* serotip A'da fimbria rapor edilmiştir (Ruffolo ve ark. 1997). *P. multocida* serotip A'nın fimbria ile in vivo ve in vitro şartlarda HeLa ve tavşan faringeal hücrelere bağlandığı bildirilmiştir (Glorioso ve ark. 1982). *P. multocida* serogrup A, B, D ve B:2'nin tip IV fimbria'ya (*ptfA*) sahip olduğu bildirilmiştir ve izolatlar arasında sekans karşılaştırılması sonucunda farklılıklar tespit edilmiştir (Doughty ve ark. 2000). *P. multocida* serotip A izolatlarında adezyon faktörü olan lipoprotein B'nin (*plpB*) fare ve kanatlı çalışmalarında çapraz koruma sağladığı rapor edilmiştir (Harper ve ark. 2006).

Pilus veya tip IV fimbria Gram negatif bakterilerde yaygın olarak bulunmaktadır ayrıca Gram pozitif bakterilerde de rastlanmaktadır. Yaklaşık 29kDa'luk fimbria alt ünitelerden oluşan uzun filamentler konakçı hücreye bağlanmayı kolaylaştırmaktadır. Başlangıçta epitel hücrelerinde yapışma meydana gelir ve bu aşama konakta kolonizasyon ve sonraki enfeksiyonlar için önemlidir. Epitelyal hücreler hemopoetik immun hücrelerin bir parçası olmasa da antimikrobiyal peptid üreterek ve doğal bağışıklık reseptörlerini uyararak etkili savunma mekanizmalarında fiziksel bariyer işlevi görürler (Marques and Boneca 2011). Tip I fimbria'nın makrofajlarda eksprese edilen TLR4 proteinlerince tanındığı bildirilmiştir (Mossman ve ark. 2008) ancak tip IV fimbria ve doğal bağışıklık yanıtı hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

Pilus konakta kolonizasyonu kolaylaştıran önemli bir virülens faktörüdür diğer taraftan tip IV fimbria çeşitli bakterilere ait aşı çalışmalarında immnojenik hedef olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır. *P. multocida*'nın 15 kDa'luk fimbrial alt ünite proteini diğer fimbrial proteinlere benzerliği yüksektir (Doughty ve ark. 2000). Bu protein A, B ve D serotiplerinde bulunmaktadır ve virülens artışı ile ilişkilidir (Harper ve ark. 2006). *P. multocida* suşlarında C-terminal kısmı farklılığı bulunması sebebiyle aşı geliştirilmesi güçleşmektedir (Doughty ve ark. 2000).



*P. multocida*'nın sığır hücrelerine adezyondaki ve sığır solunum sistemi enfeksiyonlarında tutunmadaki bakteriyel faktörler tam olarak anlaşılamamıştır. *Pasteurellaceae* familyası da dahil çoğu patojenler adezyon ve kolonizasyonda konak hücre dışı matriks molekülleri kullanırlar. *P. multocida*'nın geniş konakçı aralığı, çoklu hayvan türleri ve doku tiplerine özgü konak hücre yüzey bileşenlerini algılamasını gerektirmektedir. *P. multocida*'nın hücre dışı matriks moleküllerine bağlanmasının araştırıldığı bir çalışmada sığır kökenli izolatların fibronektin dahil olmak üzere bazı hücre dışı moleküllere bağlandığı bildirilmiştir (Dabo ve ark. 2005). *P. multocida*'da tanımlanan fibronektin bağlayan proteinler *ompA*, *tonB* bağımlı reseptör olan hemogloblin bağlayıcı protein *hgbA*, transferrin bağlayan protein A ve Pm10769'dur (Dabo ve ark. 2003).

Nörominidaz (sialidaz) *P. multocida* suşlarında yaygındır ve in vivo şartlarda sığır pnömoni vakalarından izole edilen *P. multocida* A:3 suşlarında eksprese edilmektedir (Ewers ve ark. 2006). *P. multocida*'da nörominidazın fonksiyonu ile ilgili olarak bakterinin tutunmasına, kolonize ve persiste olmasına katkı sağladığı bildirilmiştir (Mizan ve ark. 2000). Sığır kökenli *P. multocida* suşlarında iki adet sialid (*nanB* ve *nanH*) genleri saptanmıştır (Mizan ve ark. 2000). Pm70 sekans çalışmalarında sialometabolik gen ürünleri belirlenmiş ve bakteriyi konak doğal bağışıklık mekanizmalarından koruyarak persiste hale gelmesinde sialik asitin virülens için gerekli olduğu bildirilmiştir (Harper ve ark. 2006).

Bakteriyel tutunmada görevli *P. multocida* genlerini özellikle enfeksiyonun erken aşamasında belirlemek *P. multocida*'nın moleküler patogenezi anlamada yardımcı olabilir. Çevresel sinyallerin değişiminden kaynaklı konak-patojen etkileşimi farklılığı *P. multocida*'nın komensal ve patojenik arasındaki farkların olası sebebidir. *P. multocida*'nın patojenik ve komensal arası moleküler farkları iyi anlaşılamamıştır ancak mekanizmalar açıkça *P. multocida*'nın TLR sinyalleri vasıtasıyla yangısal cevap oluşturma kabiliyeti olduğunu göstermektedir. TLR sinyali doğal bağışıklıkta önemlidir ve bakterinin tanınması, etkisiz hale getirilmesi, adoptif bağışıklığın aktivasyonu vasıtasıyla enfeksiyonlarda ilk defans hattı olarak işlev görmektedir. Proyangısal sitokinlerin salgılanmasında artan sayıda bakteriyel adezinlerin TLR'ye bağımlı olduğu rapor edilmiştir (Fischer ve ark. 2006) ve

gelecekteki potansiyel aşı çalışmaları proenflamatuvar *P. multocida* adezinlerinin tanımlanması üzerine odaklanmaktadır.

#### 1.7.6.2. Lipopolisakkaritler

*P. multocida* lipopolisakkaritleri çoğu Gram negatif bakterilerde bulunan, polimerik somatik antijeni olmayan R-tipi lipopolisakkaritlere biyolojik ve kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedir. Bu moleküller klasik endotoksik şok belirtilerinin sebebidir.

Saflaştırılmış *P. multocida* lipopolisakkaritlerinin antijenik karakteri güçlüdür ve yaygın vasküler değişimler yapabilme kabiliyeti vardır ancak immunojenik yönleri zayıftır. Genelde *P. multocida* lipopolisakkaritleri proteinlerle kompleks yapı oluşturduğunda immunojenik veya koruyucu hale gelirler (Ryu ve Kim 2000). Bir çalışmada *P. multocida* tip A:3 lipopolisakkarit-protein kompleksi ile fareler aşılandığında koruma düzeyi saptandığı ancak lipopolisakkaritler veya protein tek başına kullanıldığında yeterli koruma sağlamadığı bildirilmiştir. Ayrıca lipopolisakkarit-protein kompleksinin hücresel ve humoral bağışıklığı uyardığı da rapor edilmiştir (Ryu ve Kim 2000).

Lipopolisakkaritler *P. multocida* enfeksiyonlarında konak savunma uyarıcısı olarak görev alırlar (Galdiero ve ark. 2000). Saf *P. multocida* lipopolisakkaritleri farelerde konak savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan bazı yangısal ve immunregülatör sitokinlerin salınmasını ve ekspresyonunu uyarmaktadırlar (Iovane ve ark. 1998). *P. multocida* lipopolisakkaritlerinin nötrofil adezyonunda ve sığır endotelial hücre katmanlarına göç etmesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Galdiero ve ark. 2000). Başka bir çalışmada ise *P. multocida* serotip A lipopolisakkaritlerinin tavuklarda humoral ve hücresel bağışıklığı güçlendirdiği rapor edilmiştir (Maslog ve ark. 1999).

### 1.7.6.3. Kapsül

*P. multocida* patogenezinde virülens belirleyicisi olan kapsülün önemi bellidir ancak çalışmalarda daha çok kanatlı kolerası ve hemorajik septisemi vakalarından izole edilen *P. multocida* kapsüller A ve B tipi üzerinde durulmuştur (Harper ve ark. 2006). Farelerde yapılan virülens çalışmalarında serotip A mutantlar kapsüllü saha suşları ile kıyaslandığında virülensinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Chung ve ark. 2001). Septisemik fare modeli çalışmasında sığır kökenli *P. multocida* izolatının hyaluronan sentetaz genine transpozon insersiyonu yapıldığında virülensin azaldığı bildirilmiştir (Fuller ve ark. 2000). Başka bir çalışmada ise *P. multocida* serotip A suşunun kapsülsüz varyantlarında virülens kaybı olduğunu ve etken kapsüllendiğinde farelerde virülensin eski haline döndüğü rapor edilmiştir (Watt ve ark. 2003).

*P. multocida*'nın kapsülü virülens ile ilişkilendirilmiştir ancak farelerde yapılan aşılama çalışmalarında kapsülün koruyucu etkisi olmadığı bildirilmiştir (Pruimboom ve ark. 1996). *P. multocida*'nın çoğu virulent suşları çeşitli konaklarda doğal olarak bulunan moleküllere benzeyen hyaluronik asit, kondroitin veya heparinden oluşan kapsül yapısına sahiptir. Bu moleküler benzerlik kapsül materyaline karşı güçlü bir antikor cevabı oluşmasını engellemekte, fagositoz aşamalarını bozmakta, komplement aktivitesini azaltmaktadır (Harmon ve ark. 1991).

*P. multocida*'nın antifagositik aktivitesi tespit edilmiş ve aktivitenin kapsül kalınlığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Pruimboom ve ark. 1996). *P. multocida* serotip A:3 hyaluronidaz ile kapsülsüz hale getirildiğinde makrofaj fagositozunda artış rapor edilmiştir (Pruimboom ve ark. 1996). *P. multocida* serotip A'da serum direnci kapsüllenme ile korelasyon göstermektedir ve saha suşları ile kıyaslandığında kapsülsüz suşlar genelde komplement aracılığı ile inaktif hale gelmektedir (Chung ve ark. 2001).

### 1.7.6.4. Dış Membran Proteinleri

*P. multocida*'nın bazı dış membran proteinleri yüzeyde sergilenme, in vivo ekspresyon, immunojenik ve bakterisidal özellikler gibi virülens karakterlere sahiptir (Davies ve ark. 2004). *P. multocida ompA*, in vivo eksprese olan majör immunojenik ve antijenik dış membran proteini. Bu ve bazı dış membran proteinlerine karşı oluşan yüksek antikor yanıtı sığırlar virulent *P. multocida* ile epruvasyon yapıldığında sığırların direnç durumu ile ilişkili bulunmuştur (Dabo ve ark. 2003).

Majör antijenik özelliğe sahip, hücre yüzeyinde sergilenen ve konservatif dış membran benzeri porin proteini olan *ompH* sığır izolatlarında tespit edilmiştir ve aşı potansiyeli bulunmaktadır (Ewers ve ark. 2006). Bu proteinin farelerde ve tavuklarda yapılan epruvasyon çalışmalarında koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir (Vasfi Marandi ve Mittal 1997) ve ekspresyonu demir ve glukoz tarafından negatif düzeyde etkilenmektedir. *ompH*'ın potansiyel immunojen olarak önemi ve *ompH* ekspresyonu göz önüne alındığında bakterin üretiminde etkenin glukoz olmayan ortamlarda üretilmesi tavsiye edilmiştir (Bosch ve ark. 2001).

İn vivo çalışmalarda *P. multocida* virülens genleri potansiyeli ve dış membran ilişkili çapraz koruma faktörleri tanımlanmıştır (Hunt ve ark. 2001). Canlı *P. multocida* izolatlarına karşı antiserum uygulandığında çapraz korumayı tetikleyen moleküler ağırlığı yüksek dört protein tespit edilmiştir (Wang ve Glisson 1994).

#### **1.7.6.5. Demir Düzenleyen Proteinler**

Bakterilerin canlı kalması için demir alımı gereklidir ve patojenik bakteriler çeşitli demir alım stratejileri geliştirmiştir. *P. multocida* konak moleküllerinde demir bağlamak amacıyla demir şelatlayan sideroforlar ve dış membran reseptörleri üretmektedir. Demiri tükenmiş besiyerinde ya da in vivo şartlarda üretilen *P. multocida*'nın siderofor bağlanma afinitesi olan demir düzenleyen dış membran proteini eksprese ettiği bildirilmiştir (Choi-Kim ve ark. 1991). *P. multocidatbpA* geni kanatlı izolatlarında yoktur ancak sadece ruminant izolatlarında tespit edilmiştir

(Ewers ve ark. 2006). *P. multocida* serotip B:2 de tespit edilen *tbpA*'nın membran bölgelerinde gözenek olduğu tahmin edilmektedir (Shivachandra ve ark. 2005).

*P. multocida* Pm70 genomunun karşılaştırılmalı analizlerinde demir kazanım ilişkili immunojenik proteinleri kodlayan *hgbA* da dahil dokuz adet gen tespit edilmiştir (May ve ark. 2001). Bu proteinler farelere tekli olarak inokule edildiğinde koruyucu bağışıklık sağlamadığı bildirilmiştir (Bosch ve ark. 2004).

*tonB*, *tbpA*, *hgbA* ve *hgbB* genlerinin sığır kökenli *P. multocida* izolatlarında sırasıyla %100, %70.2, %95.2 ve %57.7 oranında bir çalışmada tespit edilmiştir ve hastalık durumu ile *hgbB* ve *tbpA* geni bulunması arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (Ewers ve ark. 2006).

*P. multocida*'da bulunan haemin ve hemoglobin taşıyıcı genler, kandan demir kullanma kapasitesinin göstergesi olan eşsiz genlerdir (Roehrig ve ark. 2007).

#### 1.7.6.6. Hücre Dışı Enzimler

*P. multocida*'da proteaz ve lipaz gibi hücre dışı enzimler muhtemel virülens faktörü olarak bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Negrete-Abascal ve ark. 1999, Pratt ve ark. 2000). Patojenik bakterilerde lipazın rolü muhtemelen nutrisyoneldir ancak proteazlar opsonizasyonu azaltarak ve konak IgG'yi degrade ederek konak savunma mekanizmalarına karşı patojenlere yardım etmektedir. Sığır dahil olmak üzere farklı türlerden izole edilen *P. multocida* kültür süpernatantında proteaz sekresyonu bildirilmiştir (Negrete-Abascal ve ark. 1999). Bu proteazlar geniş pH aralığında konakçı IgG'yi degrade etme yeteneğine sahiptir. Farklı türlerden izole edilen *P. multocida* izolatlarında lipaz üretimi olduğu bildirilmiş ancak patogenezdaki rolü tam olarak açıklanamamıştır (Pratt ve ark. 2000).

### 1.7.7. Antimikrobiyal Direnç

Antimikrobiyal ajanlar BRD ve diğer enfeksiyonlarda *P. multocida*'yı elimine etmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Antimikrobiyal kullanımı sonucunda ise *P. multocida* birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmekte veya kazanmaktadır.

Çizelge1.2'de *P. multocida*'da tespit edilen ve çeşitli sınıflardaki antimikrobiyal etkenlere direnç sağlayan genler özetlenmiştir. Çizelgede ilgili genlerin lokasyonu ve direnç mekanizmaları da liste halinde sunulmuştur. *P. multocida*'da çeşitli direnç genleri saptanmış ancak tilmikosin veya tulathromisin gibi makrolid grubundaki antibiyotiklere özgü direnç genleri henüz belirlenememiştir.

*P. multocida*'da tanımlanan direnç genlerinin çoğu plasmid veya transpozon kaynaklıdır. Genelde konjugatif olmayan küçük plasmidler tek veya daha fazla direnç geni taşırlar. Direnç genlerini taşıyan plazmidler ve transpozonlar *P. multocida* antimikrobiyal direnç genlerinin donörü veya alıcısı olarak horizontal gen transferi olaylarında önemli bir rol üstlenirler.

*P. multocida*'da belirlenen direnç genlerinin küçük bir kısmı bu türe özgüdür. Bunlar *dfrA20* trimethoprim ve *aadA14* streptomisin/spektinomisin direnç genleridir (Kehrenberg ve ark. 2005). *sul2*, *strA*, *strB*, *floR*, *catA1*, *catA3*, *aphA1*, *aphA3* veya *aadA1* gibi *P. multocida*'da tanımlanan direnç genlerinin çoğu ise diğer bakterilerde tespit edilmektedir. *P. multocida* *Pasteurellaceae* familyası içerisinde hem de diğer bakteriler ile antimikrobiyal direnç geni transferi yapmaktadır. Tetrasiklin direnç genlerinde *tet(L)* geninin stafilokoklar, streptokoklar ve enterokoklar arasında yaygın şekilde yayılmasından dolayı, Gram pozitif bakterilerle bir değişimin bile kabul edildiği varsayılmıştır (Kehrenberg ve ark. 2005).

**Çizelge1.2.***P. multocida* izolatlarında tanımlanan antimikrobiyal direnç genleri (Schwarz 2008)

Antimikrobiyal etken	Direnç	Direnç genleri	Yerleşimi
----------------------	--------	----------------	-----------

mekanizması			
Penisillin	Enzimatik	<i>blaROB-1</i>	-
	inaktivasyon	<i>blaTEM-1</i>	pFAB-1
		<i>blaPSE-1</i>	pJR2
Tetrasiklin	Aktif efluks	<i>tet(H)</i>	Tn5706
		<i>tet(B)</i>	Kromozom
		<i>tet(G)</i>	pJR1
		<i>tet(L)</i>	Kromozom
Tetrasiklin	Hedef bölge koruması	<i>tet(M)</i>	Kromozom
Florsuz fenikoller	Enzimatik	<i>catA1</i>	Plazmid
	inaktivasyon	<i>catA2</i>	Plazmid
		<i>catB2</i>	pJR2
Fenikoller	Aktif efluks	<i>floR</i>	pCCK381
Kanamisin, neomisin	Enzimatik	<i>aphA1</i>	pCCK3152
	inaktivasyon	<i>aphA3</i>	pCCK411
Streptomisin	Enzimatik	<i>strA-strB</i>	pPMSS1
	inaktivasyon		
Streptomisin/spektinomisin	Enzimatik	<i>aadA1</i>	pJR2
	inaktivasyon	<i>aadA14</i>	pCCK647
Trimetoprim	Hedef değişimi	<i>dfrA20</i>	pCCK154
Sülfonamidler	Hedef değişimi	<i>sul2</i>	pPMSS1

### 1.7.8. Antimikrobiyal Direnç Epidemiyolojisi

Bir bakteri popülasyonunda antimikrobiyal direnç yayılmasından sorumlu üç koşul mevcuttur bunlar; direnç genlerinin bulunması, bu direnç genlerinin vertikal (klonal) veya horizontal yayılımı ve seçici baskıdır (Schwarz ve ark. 2001). Seçici baskı direnç oluşumunun seviyesini belirlemektedir çünkü duyarlı bakterileri öldürüp dirençli bakterilerin canlı kalmasını sağlayarak bakteri popülasyonunu değiştirmektedir. Seçici baskının esas sebebi ise antimikrobiyal kullanımıdır. Patojenik bakteriler antimikrobiyal ilaçların seçici baskı uygulayacağı hedef bakteri popülasyonudur. Antimikrobiyal ilaçlar ayrıca her bireyin deri, konjunktiva, üst solunum yolları, alt ürogenital sistem ve özellikle de sindirim sistemindeki komensal

bakterilere de seçici baskı uygulamaktadır (Barbosa ve Levy 2000). Sindirim sisteminde bağırsaklar komensal bakterilerin en geniş rezervuarı konumundadır. Bu sebeple bağırsak mikrobiyotasını temsil eden fekal bakteriler antimikrobiyal direnç çalışmalarının çoğunda incelenmektedir. Ayrıca fekal komensal bakterilerde tespit edilen antimikrobiyal direnç antimikrobiyal ajankullanımı sonucunda oluşan seçici baskıyı temsil etmektedir. Çiftlik hayvanlarında *Escherichia coli* ve enterokoklarinsağlıklı hayvanların gaitalarında bol miktarda bulunması ve direnç genlerini taşıması sebebiyle Gram negatif ve Gram pozitif indikatör bakteri olarak kullanılmaktadır (Catry ve ark. 2003). İndikatör bakteriler ile antimikrobiyal direnç izlenmesinin amacı direnç seviyesinin yanlış belirlenmesinin önüne geçmektir. Nekropsi vakalarından izole edilen patojenik suşlardaki direnç farklılığı veya tedavi başarısızlığı durumlarında antimikrobiyal tedavinin değişmesi nedeniyle patojenik bakterilerde antimikrobiyal direnç izlenmesi doğru sonuç vermeyebilir (Bogaard ve Stobberingh 1999). *Pasteurellaceae* familyasındaki etkenler fırsatçı solunum sistemi patojeni ve solunum sistemi florasının bir parçası olduğu için patojen ile kommensalizm arasındadır, bu da bakteriyel populasyon araştırmalarında dikkat çekmektedir.

Yaş, hayvan türleri içerisinde antimikrobiyal direnç prevalansını etkileyen bir faktördür. Genç tavukların sekumlarında enterokoklar, çocuklarda, domuz yavrularında ve buzağılarda fekal koliform bakteriler (Berge ve ark. 2001) incelendiğinde yetişkinlere göre antimikrobiyal direnç prevalansının daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Bakteri türlerinin konakçılarında farklı bölgelerde lokalize olması ile antimikrobiyal direnç prevalansı korelasyon göstermektedir. Belirli bir organ sisteminde relatif dirençli bakteri bolluğu, organın barındırabileceği geniş bir komensal floraya bağlıdır (Dagan ve ark. 2001). Örneğin, sığırların solunum sistemindeki patojenik suşlar memede lokal antibiyotik uygulaması daha fazla olmasına rağmen memedeki patojenlerle kıyaslandığında daha fazla kazanılmış direnç gösterirler. Bu durumun makul açıklaması ise solunum sistemine kıyasla memenin direnç genleri rezervuarına sahip yerleşik florasının olmamasıdır (Martel ve Vandaele 1999).



Barınma şartlarının da hayvanlarda dirençli fekal koliform prevalansını etkilediği bildirilmiştir (Langlois ve ark. 1988). Benzer şekilde besiye alınan buzağılarda fekal koliform ve solunum sistemindeki *Pasteurellaceae* sütçü buzağılarla kıyaslandığında yüksek derecede direnç tespit edilmiştir. Ekolojik niş içerisindeki bazı hayvan populasyonları arası temas ve antimikrobiyallerin kullanıldığı çevrenin hayvan populasyonlarında antimikrobiyal direnç seviyesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Catry ve ark. 2003). İnsanlarda populasyon yoğunluğu azaldığında önemli derecede antimikrobiyal direnç sıklığının azaldığı rapor edilmiştir (Walson ve ark. 2001).

### **1.8. *Mannheimia haemolytica***

*M. haemolytica*, Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, fermentatif, oksidaz pozitif, fakültatif anaerobik bir kokobasil bakteridir (Rice ve ark. 2007). Etken *Proteobacteria* şubesi; *Gammaproteobacteria* sınıfı; *Pasteurellales* takımı; *Pasteurellaceae* familyası; *Mannheimia* cinsi içerisinde taksonomik sınıflandırılmıştır (Zecchinon ve ark. 2005).

İlk olarak 1885 yılında Theodore Kitt tarafından *Bacterium bipolare multocidum* olarak isimlendirilmiştir (Kitt 1885), 1932 yılında ise koyun kanlı agarda hafif hemolitik aktivitesi nedeniyle *Pasteurella haemolytica* olarak ismi değiştirilmiştir. Kapsüler yüzey antijenleri kullanılarak yapılan indirekt hemagglütinasyon testlerinde 16 serotipi belirlenmiştir (Biberstein ve ark. 1960). Fenotipik ve genotipik özelliklerin kapsamlı değerlendirilmesi sonucunda ise *Mannheimia* cinsi oluşmuş ve bu cins 5 türe ayrılmıştır; *M. haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, *Mannheimia granulomatis*, *Mannheimia ruminalis* ve *Mannheimia varigena*. *Mannheimia* cinsi daha sonra arabinoz veya trehaloz fermente etme kabiliyetine göre farklı biyotiplere (A ve T) ayrılmış, 12 adet A serotipi (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A11, A12, A13, A14 ve A16), 4 adet T serotipi (T3, T4, T10 ve T15) tanımlanmıştır (Highlander 2001). Suriye’de koyunlardan izole edilen A17 ise yeni bir *M. haemolytica* serotipi olarak tanımlanmıştır. DNA-DNA

hibridizasyon ve 16S RNA sekans çalışmaları neticesinde A serotiplerinin biri hariç hepsi *M. haemolytica* türleri olarak tanımlanmıştır. *P. haemolytica* kompleksi içerisinde yer alan 17 serovardan dördü olan T3, T4, T10 ve T15 serotipleri *B. trehalosi*, A11 serotipi *Mannheimia glucosida* ve kalan 12 serotip *M. haemolytica* olarak tanımlanmıştır (Adamu 2007).

Solunum sistemi problemi olan sığırlarda sıklıkla izole edilmesi, pnömonik akciğerlerden saf olarak kültürünün yapılması ve endotrakeal, trake içi ve intrapulmoner yolla serotip A1 inoküle edilen vakalarda karakteristik pnömoni lezyonları meydana getirmesi sebebiyle *M. haemolytica* shipping fever vakalarında primer bakteriyel ajan olarak kabul edilmektedir (Jeyaseelan ve ark. 2002). Etken sağlıklı sığırların üst solunum yollarında komensal bir etken olarak bulunmaktadır ve immun sistemin zayıfladığı durumlarda patojenik hale geçerek alt solunum yollarına ulaşmaktadır (Highlander 2001). Bu patojenik dönüşüm kapsüler serotip ile ilişkili bulunmuştur. A1 ve A2 serotipleri sığırlardan sıklıkla izole edilirken A1 serotipi pnömonik lezyonlardan daha sık izole edilmektedir (Dassanayake ve ark. 2007).

A1 ve A2 serotipleri koyun ve sığırların üst solunum yollarında kolonize olmaktadır. Sağlıklı sığırların nazofarinks bölgesinde A1 ve A2 serotipi bulunurken, nekropsi yapılan sığır pnömoni vakalarında akciğerlerden başlıca A1 serotipi izole edilmiştir. Davies ve ark. (2001), A1 ve A6 serotiplerinin sığır pnömonik pastörelloz vakalarının neredeyse tamamından sorumlu olduğunu bildirmiştir.

*M. haemolytica* sağlıklı buzağuların nazofarinks ve tonsillerine yerleşmektedir. Komensal bir etken olan *M. haemolytica* nazofarinks bölgesine yerleştiğinde konakla simbiyotik bir ilişki kurmaktadır. Sütten kesme, değişken hava şartları, yem değişikliği, uzun süren nakil, sürüye yeni hayvan alınması ve enfeksiyonlar gibi stres durumlarında bu simbiyotik ilişki bozularak hastalık tablosuna dönüşmektedir.

Tonsilla dokusunun *M. haemolytica* için rezervuar olduğu bildirilmiştir (Frank ve ark. 1995). Buzağuların burun svabı kültür sonucu *M. haemolytica* negatif olabilirken tonsilla kültürünün pozitif olduğu rapor edilmiştir. Buzağular işletmeye geldiğinde sadece *M. haemolytica* A1 izolasyon sıklığı değil aynı zamanda etken sayısında hızlı bir şekilde artmaktadır. Buzağuların burun mukozasında fazla sayıda *M.*

*haemolytica* olduğunda etken soluma vasıtasıyla akciğerlere ulaşmaktadır. Sağlıklı buzağılarda solunan *M. haemolytica*'nın kleransının yüksek olduğu, alınan etkenin %90'ının 4 saat içerisinde elimine edildiği bildirilmiştir (Lillie ve Thomson 1972).

Etkenin komensalden patojen durumuna geçişi ile ilgili mekanizmaları anlamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Soğuk stresi ve transportun immunosupresyon etkileri araştırıldığında, soğuk stresinin geçici olarak plazma kortikol seviyesini artırdığı, histamin ve bradikinin seviyelerinde değişim olmadığı, transportun ise in vitro lenfosit blastogenezi baskıladığı ve plazma kortikol seviyesinde geçici artışa neden olduğu bulunmuştur (Filion ve ark. 1984). Hayvan pazarından alınan ve işletmeye getirilen buzağılarda serum komplemant aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. İmmun sistemdeki bu değişimler buzağının komensal etken ile olan dengesini sürdürme kabiliyetini etkilemektedir.

Buzağuların bir arada tutulmasının solunum sistemi hastalığı prevalansı üzerinde etkisi yabancı buzağularla etkileşim stresinden veya enfeksiyöz etkenlerle temas fırsatının artmasından kaynaklanmaktadır. Viral ve bakteriyel etkenler solunum yollarında seröz ve mukoz salgıların, anyonik peptidlerin ve B-defensinlerin antimikrobiyal bariyer özelliğini ortadan kaldırarak *M. haemolytica*'nın komensal durumdan patojen duruma geçişine olanak sağlarlar. BHV-1, PI-3 ve BVD virusları *M. haemolytica*'nın nazofarinkste sayıca artmasına imkan vermekte, akciğer kleransını etkilemekte ve trakeadaki epitelyal hücrelerin siliar aktivitesini bozmaktadır (Rossi ve Kiesel 1977). BVD enfeksiyonu nötrofil ve lenfosit fonksiyonlarının bozulmasına neden olarak hayvanı bakteriyel pnömoniye predispoze hale getirmektedir. BRS virus enfeksiyonlarında immunosupresyon şekillenmekte ve BHV-1 enfeksiyonlarında T lenfosit, B lenfosit, monosit ve makrofaj aktivitesi azalmaktadır. Tüm bu faktörler doğal immun savunma sistemlerini bozmakta ve etkene solunum sisteminde daha derin dokulara ulaşma fırsatı sunmaktadır (Ribble ve ark. 1995).

### **1.8.1. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri**

*M. haemolytica* %5-7 koyun kanlı agarda küçük zonlu hemolitik koloniler meydana getirmektedir. Kolonileri 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında 0.2x1-2 µm çapında, kenarları düzgün, konveks biçimde ve beta hemolitik aktivitesi translüsent olması karakteristiktir (Quinn ve ark. 2002).

MacConkey agarda küçük çapta pembe veya kırmızı koloniler oluşturmaktadır. Etken *Pasteurella* türlerindeki diğer etkenlerden üreaz aktivitesinin ve indol negatif olmasıyla kolayca ayırt edilmektedir. TSI agarda H<sub>2</sub>S negatif, üstteki eğimli kısımda ve alt kısımda sarı renk oluşturmaktadır ayrıca katalaz aktivitesi negatiftir. *M. haemolytica* suşları laktoz, sükroz, maltoz ve D-ksiloz'dan asit üretme kabiliyetine sahiptir ancak L-arabinoz ve D-trehaloz'u fermente edememektedir. (Quinn ve ark. 2002).

### 1.8.2. Moleküler Teşhis

*Mannheimia* türlerini birbirinden ve *Pasteurellaceae* familyası üyelerinden ayırt etmede fenotipik testler kullanılmaktadır. Fenotipik özellikler ve seroloji temelli klasifikasyon metotlarında uzun zaman alması, zahmetli olması, sonuçların tekrarlanabilirliği ve geçerliliği ile ilgili problemlerle yaşanması gibi durumlarla karşılaşmaktadır (Rowe ve ark. 2001). Günümüzde izolatların moleküler metotlar ile tanımlanmasında tRNA-intergenic spacer, lökotoksin (Alexander ve ark. 2008), lktA-artJ genleri PZR ile tespit edilebilmektedir (Angen ve ark. 2009). Ayrıca 16S rRNA ve *sodA* genlerinin sekans analizi neticesinde de izolatlar tanımlanabilmektedir (Gautier ve ark. 2005).

Sekanslama çalışmalarında *sodA* geninin *Mannheimia* türlerinin ayırt edilmesinde ayırım gücünün iyi olduğu bildirilmiştir (Gautier ve ark. 2005). Bu nedenle bu çalışmada *sodA* geni qPZR'da hedef bölge olarak tercih edilmiştir.

### **1.8.3. Virülens Faktörleri**

#### **1.8.3.1. Adezyon**

Adezyonların kolonizasyonda önemli rol oynadığı düşünülmektedir ancak *M. haemolytica*'nın spesifik adezyon karakteristiği hakkında az bilgi bulunmaktadır (Zecchin ve ark. 2005). Her ne kadar *M. haemolytica*'da adezyon proteinlerini kodlayan bir lokus belirlenmemiş olsa da sekans analizlerinde bir putatif adezyon dizisi tanımlanmıştır (Highlander 2001).

#### **1.8.3.2. Fimbria**

Fimbria Gram negatif bakterilerin yüzeyinde bulunan, tutunmayı ve kolonizasyonu sağlayan ufak uzantılardır. *M. haemolytica*'da 12-nm'lik sert ve 5-nm'lik esnek yapılı iki farklı fimbria tanımlanmıştır. İki fimbria da *M. haemolytica*'nın alt solunum yolları mukozasına tutunmasını kolaylaştırmaktadır (Mohamed ve Abdelsalam 2008).

#### **1.8.3.3. Kapsül**

Kapsüller polisakkarid antijen tiplendirilmesi sonucunda *M. haemolytica*'nın on iki serotipi belirlenmiştir. Üreme fazındaki bakteri iyi kapsül oluşturma yeteneği sergilerken durma döneminde kapsül oluşturma yeteneği zayıflamaktadır (Corstvet ve ark. 1982). *M. haemolytica*'nın kapsüller polisakkaritleri ile diğer bakterilerin kapsüller polisakkaritleri arasında benzerlik bulunmaktadır.

Kapsül savunmada önemli bir rol oynamaktadır, komplement aracılı lizise dirençte, makrofaj ve polimorf nükleer lökositlerin fagositozunu önlemede kapsül

görev almaktadır. Polisakkarit yapıda olan kapsülün alveolleri kaplayan mukozal tabakanın yüzey gerilimini düzenleyen pulmoner yüzey aktif maddelerle etkileşime girdiği ve böylece bakterilerin solunum yolu epiteline yapışmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Whiteley ve ark. 1990).

Kapsüler antijenler ile aşılamanın antikor üretimini artırdığı tespit edilmiş ancak kapsüler antikor ile koruma düzeyi arasında önemli bir korelasyon saptanamamıştır (Confer ve ark. 1989).

#### **1.8.3.4.Nörominidaz**

*M. haemolytica*'nın nörominidaz üretimi solunum sisteminde mukus yoğunluğunu azaltarak kolonizasyonu kolaylaştırmakta ve hücre yüzeyinde bakterinin daha yakına yerleşmesini sağlamaktadır (Zecchinon ve ark. 2005). Enzimin epitel dokusu mukoz bariyeri olan musinden son sialik artıkları uzaklaştırdığı böylece konak bağışıklığını etkilediği düşünülmektedir (Mohamed ve Abdelsalam 2008).

#### **1.8.3.5.Dış membran proteinleri (Omp)**

Dış membran proteinleri ve lipoproteinlerin *M. hamemolytica*'nın önemli koruyucu antijenleri olduğuna inanılmaktadır. Birçoğu, fagositoza ve komplement aracılı öldürmeye karşı korunmada rol aldıkları için potansiyel aşı adayları olarak ilgi çekmektedir. Ayrıca, konakçı hücre iskeletinin yeniden yapılanmasında da rol oynadıkları düşünülmektedir (Highlander 2001).

Yapılan çalışmalarda lipoproteinler tanımlanmıştır ve çoğu *M. haemolytica* serotipinde lipoproteinler mevcuttur (Nardini ve ark. 1998). PlpE olarak tanımlanan 45-kDa'luk dış membran proteininin sığırlarda immunojenik olduğu tespit edilmiştir (Pandher ve ark. 1998). Aşılama çalışmalarında rekombinant PlpE'nin subkutan

yolla aşılama neticesinde güçlü immonojenik karakterde olduğu belirtilmiştir (Confer ve ark. 2003). Ticari aşılarla bu rekombinant PlpE'nin katılmasının deneysel eprüvasyon çalışmalarında koruma düzeyini artırdığı bildirilmiştir (Confer ve ark. 2006).

### **1.8.3.6. Proteazlar**

*M. haemolytica*'nın tüm serotipleri hücre yüzey glikoproteinlerini makrofajlardan veya diğer lökositlerden ayıran bir çinko metalloglikoproteaz üretirler. Bu enzimin konak hücresi yüzeyine etki etme ve adezyonu artırma fonksiyonu vardır (Highlander 2001). Lökotoksin ile beraber inkübe edildiğinde aktivitesinin artış gösterdiği bildirilmiştir (Nyarko ve ark. 1998).

*M. haemolytica* A1 serotipi ayrıca IgG1'e özgü bir proteaz üretmektedir. IgG sığırların alt solunum yollarında primer salgısal antikor iken, IgG1 spesifik proteazın antikorların etkinliğini azalttığı ve böylelikle sığır pnömoni mannheimiozis patogenezinin önemli ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Lee ve Shewen 1996).

### **1.8.3.7. Lipopolisakkarit (LPS) Endotoksin**

LPS sığır pnömonik mannheimiozis ile ilgili esas virülens faktörlerden biridir. *M. haemolytica* kuru maddesinin %10-25'ini oluşturmaktadır ve sadece A1 serotipinde sekiz farklı varyant belirlenmiştir (Davies ve Donachie 1996). LPS'nin hem kaba hem de pürüzsüz formları vardır ve A2-A8 serotiplerinin kaba forma diğer serotiplerin ise pürüzsüz forma sahip olduğu tespit edilmiştir (Lacroix ve ark. 1993). LPS epitelyal hücrelere toksik etkilidir, lökosit fonksiyonunu değiştirebilme ve trombositleri lize etme kabiliyetine sahiptir. LPS enflamasyon indükleyicisidir ve hem koagülasyonu hem de komplement basamaklarını başlatır (Cusack ve ark.

2003). Daha spesifik olarak LPS proinflamatuvar sitokinler ile makrofajları uyarak lokalize kanama, ödem ve tromboz oluşumunu indükler. Damar geçirgenliğini artırarak yangısal hücrelerin özellikle nötrofillerin birikimine, akciğerde ise fibrin birikimine neden olur. LPS ayrıca lökotosin ile kompleks oluşturarak lökotosin stabilitesi ve sitotoksitesini artırmaktadır (Li ve Clinkenbeard 1999).

### **1.8.3.8.Lökotosin**

*M. haemolytica* lökotosini (Lkt), RTX toksin familyasının gözenek oluşturucu, kalsiyum bağımlı bir sitotoksinidir. Lökotosin ruminant lökositleri ve plateletlerine spesifiktir ve tüm serotiplerin ürettiği primer virülens faktörü kabul edilmektedir. Lkt'nin on bir farklı formu belirlenmiştir (Davies ve Baillie 2003) ve *M. haemolytica*'da işlevi korunmuştur ancak Lkt üretim hızı, moleküler ağırlık ve biyolojik aktivitesinde aynı serotipin suşları arasında bile önemli derecede heterojenite mevcuttur. *M. haemolytica*'da Lkt logaritmik üreme fazı süresince bol miktarda salgılanmaktadır (Zecchinon ve ark. 2005).

Lkt etkileri hücre fonksiyonlarının bozulmasından ruminant lökositleri parçalanmasına kadar değişmektedir (Rice ve ark. 2007). Lkt düşük konsantrasyonlarda alveolar makrofajları ve nötrofilleri aktive etmekte, toksik oksijen radikalleri, proteazlar, lipid mediatörleri ve nitrik oksit gibi çeşitli yangısal mediatörleri indüklemektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ise Lkt sığır alveolar makrofajları ve nötrofillere sitosidal etki göstermektedir. Lökositlerin lize olması alveolar duvara zarar veren proteolitik enzimlerin ve pro-yangısal maddelerin salınımına neden olmaktadır (Jeyaseelan ve ark. 2002). Bu maddeler çeşitli türdeki yangısal hücrelere kemotaktiktir ve bölgeye hücre gelmesini artırarak akciğer dokusunda hasarı artırmaktadır (Zecchinon ve ark. 2005).



### 1.8.3.9. Transferrin Bağlayıcı Reseptör

Bakterinin kolonize olabilmesi için serbest demirin olmadığı ortama uyum sağlayabilme kapasitesi memeli konakçılarda gerekli bir koşuldur. Konakçı dokusunda demirin neredeyse tamamı transferrin, laktoferrin, ferritin ve hemoglobin gibi yüksek afiniteli demir bağlama proteinleri tarafından tutulur. Mukozal yüzeylere kolonize olabilen bakteri demir afinitesi yüksek olan siderofor sekresyonu ve demir içeren konakçı proteinleri dış membran reseptörleri gibi demir kazanım sistemleri geliştirmiştir (Wandersman ve Delepelaire 2004). Çoğu bakteride demir kazanım proteinleri ekspresyonu demir alım regülatörü (Fur) denilen transkripsiyonel reseptörün kontrolü altındadır. *M. haemolytica*'da bir fur genine sahiptir ancak transkripsiyonu demir tarafından baskılanmadığından fonksiyonu atipik olabilir (Gioia ve Highlander 2007).

*TbpA* ve *TbpB*'den oluşan *M. haemolytica* transferrin reseptörü, konakçı transferrine bağlı olan demirin alımından sorumludur. *TbpA* transferrin'den serbest kaldıktan sonra demirin geçebileceği delik oluşturan entegre bir dış membran proteindir. *TbpB* transferin'den demir alım etkinliğini artıran bir dış membran lipoproteindir (Moraes ve ark. 2009). *TbpA* ve *TbpB* ikisi beraber ruminant transferin'e spesifik bir reseptör oluştururlar.

### 1.8.4. Patogenez

Sığır pnömonik mannheimiosis; fibrinöz lobar pnömonili veya fibrinopurulent bronkopnömonili ateşli akut solunum sistemi hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Akciğer ve plörada fibrin birikimi ve ödem daha spesifik olarak alveoller, bronşlar ve bronşiyollerde fibrin, kan ve seroproteinöz sıvı ile birlikte bozulmuş nötrofil ve makrofajların varlığı ile karakterize pnömonik bir durumdur (Highlander 2001).

Lökotoksin, lipopolisakkarit ve nötrofillerin yanısıra yangısal hücrelerden salgılanan enflamatuvar faktörler ile yoğun bir şekilde parenşim nekrozu şekillenir

ve saatler içerisinde hastalık başlangıcı şekillenir (Rice ve ark. 2007). Ödem, fibrin ve lökositlerin jelatinöz bir şekilde infüze olmasından dolayı pulmoner interlobüler bölgede tromboz ve gerginlik gözlemlenir. İnterlobüler bölgeden bitişik lobüllere kadar nekroz şekillenir (Zecchinon ve ark. 2005).

Hastalık solunum sisteminin bariyerleri olan  $\beta$ -defensin, anyonik peptidler, seröz ve müköz salgıların viral ve bakteriyel etkenler tarafından parçalanması sonucu meydana gelirken bu durum *M. haemolytica*'nın kommensal formdan patojenik hale gelmesine neden olur. *M. haemolytica* trakea'dan yerçekiminin etkisiyle beraber alt solunum yollarına ulaşır. Bu noktada, alveol surfaktan tabakası ile kapsüler polisakkarit arasındaki reaksiyonlar yoluyla alveollere bağlandığına inanılmaktadır (Ackermann ve Brogden 2000).

Etken akciğerlere yerleştiğinde LPS, polisakkarit ve Lkt'nin alveolar eksudatına serbest kalmasının yanısıra LPS'lerin nötrofiller tarafından alınması, polisakkaritlerin alveol ve alveolar makrofajlarda lokalize olması sonucunda yangısal reaksiyon başlar. Endotelyal hücreler, nötrofiller, mast hücreleri ve epitelyal hücreler yangıya aracılık eder. IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, lökotrin B4, histamine, prostaglandin E2 ve platelet aktive edici faktör gibi bir dizi yangısal mediatörler akut *M. haemolytica* pnömonisinde salınmaktadır (Ackermann ve Brogden 2000).

*M. haemolytica* patogenezinin ana belirleyicisi Lkt, lökositler ve nötrofil aracılı yangısal cevap arasındaki konak-patojen etkileşimidir (Zecchinon ve ark. 2005). Lkt'nin vasküler endotelyal hücrelere direkt etkisi yoktur ancak nötrofil ve makrofajların hem aktivitesini hem de sitolitik özelliğini uyararak hasarda katalizör olarak görev alır. Nötrofillerin sitolitik özelliği sonucunda oksidatif radikaller ve sitokinlerle beraber elastaz, asit hidrolaz gibi enzimler serbest kalarak damar hasarına ve proteinlerin damardan sızmasına neden olur. Bunlar akciğer mukozasına hasar verir ve akciğer dokusunu yangısal mediatörlere maruz bırakır. Endotoksinler (LPS) ise akciğer venleri, kılcal damarlar ve lenfatik sistemde tromboza neden olarak akciğer paranziminde işemik nekroz ve şiddetli bir yangısal reaksiyon şekillenmesine öncülük ederler (Mohamed ve Abdelsalam 2008).

Sığır pnömonik mannheimioziste oluşan lezyonların şiddeti patojenik suşun virülensine bağlı olarak değişmektedir. Virülens bakteriyel kolonizasyon derecesini,

salınan endotoksin miktarını ve konakçı savunma mekanizmalarının işlevini yitirme şiddetini belirlemektedir. Enfekte olduktan sonra, akciğerin anatomik özellikleri pnömoniye yol açan faktörlerin elimine edilmesini güçleştirmektedir. Sığırlar akciğerlerinde, alveoler üniteler ve interlobüler septum arasında az miktarda Kohn gözeneklerine sahiptir buda ventilasyonun ve alveoler genişlemenin azalmasına neden olarak alveoler eksudatın çıkarılma kapasitesini sınırlamaktadır (Ackermann ve Brogden 2000).

### **1.8.5. Antimikrobiyal Direnç**

Antimikrobiyal direnç artışı gıda endüstrisi ve insan sağlığıyla ilişkili bakterilerin antimikrobiyal aktivitelerini tespit etmek ve izlemek amacıyla çoklu ulusal survekans programlarının oluşmasına sebep olmuştur. Çeşitli Avrupa ülkelerinde, Kanada'da ve Amerika'da bu amaçla programlar oluşturulmuştur (Hendriksen ve ark. 2008). Fransa, Almanya, İngiltere, Hollanda, Portekiz ve Kuzey Amerika gibi çoğu ülkede antimikrobiyal direnç ile ilgili bildirimler mevcuttur (Catry ve ark. 2005).

*M. haemolytica*'da antimikrobiyal direnç birçok antimikrobiyal etkene karşı artma eğilimindedir. Bildirilen en yaygın direnç tipleri beta laktam, tetrasiklin, streptomisin, kloramfenikol, sülfanomid, trimetoprim, makrolid ve sülfametazinler'dir (Catry ve ark. 2005, Highlander 2001).

Amerika'da hasta sığırlardan izole edilen beşyüze yakın *M. haemolytica* izolatında yapılan bir çalışma sonucunda ceftiofur, gentamisin duyarlı, eritromisin orta derecede duyarlı, ampisilin, penisilin, sülfadimetoksin, tetrasiklin ve tilosin dirençli tespit edilmiştir (Post ve ark. 1991). Dört yıllık başka bir çalışmada *M. haemolytica* izolatlarında ampisilin, tetrasiklin, eritromisin ve sülfametazin direnci sıklıkla belirlenmiş, tüm izolatlar seftiofur'a duyarlı bulunmuş ve tilmikosine direnç artışı saptanmıştır (eritromisine çapraz dirençle ilişkili olduğu sonucunda) (Watts ve ark. 1994). Fransa ve Almanya'da yürütülen bir çalışmada Fransa izolatlarının Almanya izolatlarına göre duyarlılıklarının düşük olduğu, Almanya izolatlarında

zamanla tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin ve penisilin duyarlılığının belirgin bir şekilde azaldığı ifade edilmiştir. Ayrıca, seftiofur, sefquinom ve florfenikol duyarlılığının devamlı olduğu, vakaların çoğunda enrofloksasin, eritromisin, spiramisin, tilosin ve tilmikosin duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Kehrenberg ve ark. 2001).

Amerika'da 1994-2002 yılları arasında yapılan bir çalışmada seftiofur, sefalotin, enrofloksasin, sülfaklorpidazin ve trimetoprim/sülfametoksazol'un oldukça duyarlı olduğu, eritromisin, florfenikol, spektinomisin ve tilmikosin duyarlılığının zamanla azalma eğiliminde olduğu belirtilmiştir (Welsh ve ark. 2004). Catry ve ark. (2005) dirençli izolatların ortalama prevalansının %21 olduğu, ampisilin, oksitetrasiklin, sülfonamid, gentamisin, tilmikosin ve enrofloksasin direnciyle sıklıkla karşılaşıldığı, seftiofur ve florfenikol direnci saptanmadığını bildirmiştir. Üç yıl süreli başka bir çalışmada ise Fransa, Hollanda ve Portekiz'de yüksek seviyede ampisilin, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfanomid direnci rapor edilmiştir (Hendriksen ve ark. 2008).

Sahada bilinçli antibiyotik uygulanmasında antimikrobiyal direncin izlenmesi veteriner hekimler açısından kritik bir öneme sahiptir. Veteriner hekimler ilaç seçiminde kitaplardaki güncel bilgilere veya sörveyans çalışmaları raporlarına göre hareket etmektedir. Bu bilgilerin güncel olması ve etkili karar verme aşamasında hekimlere yol göstermesi önemlidir. Antibiyotiklerin yanlış kullanımı neticesinde bakterilerde direnç artışı şekillenmekte ve tedavide kullanılan antibiyotığın etkinliğinde azalmaya neden olması sonucunda tedaviye cevap alınamamaktadır.

#### **1.8.6.Genetik Determinantlar**

*M. haemolytica*'da belirlenen direnç genlerinin çoğu ufak plasmid veya transpozon kaynaklıdır (Zecchinon ve ark. 2005). Belirlenen direnç genlerinin çok azı *Mannheimia*'ya özgüdür ve yatay gen transferi mekanizmaları vasıtasıyla diğer bakterilerden kazanılmıştır. Son veriler, *M. haemolytica*'nın doğal olarak yetkin olma

kapasitesini vurgulamaktadır ve bazı çalışmalarda yatay gen aktarımında şüpheli olduğu belirtilmiştir (Kelley ve ark.2007). Sonuç olarak *M. haemolytica* antimikrobiyal direnç transferi ve yayılmasında potansiyel bir aday olarak kabul edilmelidir.

### 1.8.6.1.Beta Laktam

*BlarOB-1M. haemolytica* izolatlarında tespit edilen üç beta laktamaz geninden (*blarOB-1*, *blaTEM-1*, ve *blaPSE-1*) biridir. Bu gen beta laktamaz Ambler sınıf A'nın bir üyesidir, penisilin ve dar spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilmektedir. Geniş spektrumlu beta laktamaz aktivitesine sahip değildir veya seftiofur gibi yeni nesil sefalosporinlere karşı orta derece dirençli değildir (Kehrenberg ve ark. 2006). Gen ufak plazmidlerce kodlanmaktadır ve *Pasteurellaceae* familyasında sıklıkla bulunmaktadır (Highlander 2001). *P. multocida*, *P. haemolytica*, *H. influenzae* ve *A. pleuropneumoniae* izolatlarında tespit edilen *blarOB-1* genleri arasında güçlü bir genetik homoloji saptanmıştır (Kehrenberg ve ark. 2006).

### 1.8.6.2.Tetrasiklinler

Tetrasiklin direnci *Enterobacteriaceae* familyasında sıklıkla tespit edilirken *Pasteurella* türlerinde nadiren bulunmaktadır. Bunun *Pasteurella* türlerinin *Escherichia coli* genlerinin transkripsiyonundaki etkisizliği nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Hansen ve ark. 1996).

*Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus* ve *Haemophilus* cinsi bakterilerdeki tetrasiklin direnç genleri farklıdır. İki farklı mekanizmayla çalışan yedi adet tetrasiklin direnç geni belirlenmiştir bunlar *tetH*, *tetB*, *tetG*, *tetK*, *tetL* aktif effluks genleri ve *tetM*, *tetO* ribozomal koruyucu protein genleridir (Kehrenberg ve ark. 2006). *Pasteurellaceae* familyası içerisinde bu genlerin prevalansı farklıdır ve *M.*

*haemolytica* izolatlarında *P. multocida*'ya göre tetrasiklin direnci sıklığı daha fazladır (Catry ve ark. 2003).

*tetH* geni *M. haemolytica* izolatlarında yaygın olarak belirlenmiştir. *tetH* geninin bakteri kromozomuna entegre halde ve plazmidlerde olduğu tespit edilmiştir ayrıca yer değiştirebilen genetik elementler ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır. *tetG* geni *M. haemolytica* izolatlarının çoğunda kromozomda belirlenirken *tetL* geni hem kromozomda hem de plazmidde tespit edilmiştir (Kehrenberg ve ark. 2005b). *tetB* geni *Enterobacteriaceae* familyasında en sık karşılaşılan tetrasiklin direnç geni iken sadece Fransa'da bir *M. haemolytica* izolatında tespit edilmiştir (Chaslus-Dancla ve ark. 1995).

### **1.8.6.3.Aminoglikozidler**

*strA* geni *Mannheimia* ve *Pasteurella* türlerinde rastlanan en yaygın streptomisin direnç genidir. Gen enzimatik yolla ilacı inaktive eden aminoglikozid-3-fosfotransferaz üreterek direnç sağlamaktadır (Kehrenberg ve Schwarz 2001). *strA* gen bazen aminoglikozid-6-fototransferaz kodlayan *strB* ile birlikte bulunmaktadır. Bu *strA*-*strB* kombinasyonu streptomisine iyi derecede direnç sağlamaktadır ve çoğu patojenik ve komensal bakterilerin plazmidlerinde veya kromozomuna entegre halde bulunmaktadır (Kehrenberg ve ark. 2006).

Spektinomisin sığırların tedavisinde kullanılan bir aminoksiklitol aminoglikoziddir. *M. haemolytica*'da yüksek oranda spektinomisin direnci saptanmıştır (Kehrenberg ve Schwarz 2001) ancak spektinomisin direnç genlerini saptamaya yönelik bir çalışmada sonuç alınamamıştır (Schwarz ve ark. 2004).

### **1.8.6.4.Sülfanomidler**

Sülfanomid direnci *M. haemolytica*'da en sık karşılaşılan dirençten biridir ve tip II dihidropteroat sentetazı kodlayan *SuII* geni tarafından sağlanır. Gen çeşitli plazmidlerde tespit edilmiş ve sekans analizlerinde önemli derecede heterojenite gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda *strA-strB* genleriyle bağlantılı olduğu bulunmuştur (Kehrenberg ve ark. 2006) ve kanamisin ve / veya tetrasiklin direnci ile ilişkilendirilmiştir (Kehrenberg ve Schwarz 2001).

Trimethoprim direnci genelde plazmidler, transpozonlar veya gen kasetlerinde yer alan dihidrofolat reduktaz vasıtasıyla sağlanmaktadır (Kehrenberg ve ark. 2006).

#### 1.8.6.5.Kloramfenikol ve Florfenikol

Kloramfenikol direnci plazmid, transpozon veya gen kasetlerinde yer alan genler tarafından asetiltransferaz veya kloramfenikol dışarı atıcılar sayesinde sağlanmaktadır. İmmünolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre *catA1*, *catA2* ve *catA3* olmak üzere üç farklı inaktive edici enzim belirlenmiştir. *M. haemolytica* izolatlarında kloramfenikol direnci *catA1* ve *catA3* genleri ile bağlantılıdır, *catA2* geni se henüz tespit edilmemiştir (Kehrenberg ve ark. 2006). Çizelge 1.3'te *M. haemolytica* izolatlarında tespit edilen direnç genleri ve mekanizmaları özetlenmiştir.

**Çizelge1.3.** *M. haemolytica* izolatlarında tespit edilen direnç genleri ve mekanizmaları (Kehrenberg ve ark. 2005)

Antimikrobiyal etken	Direnç mekanizması	Direnç genleri
Penisillin	Beta laktamaz	<i>bla<sub>ROB-1</sub></i>
Sülfonamid	Dihidropteroat sentezi	<i>sul2</i>
Tetrasiklin	Efluks proteini	<i>tet(H)</i>

Streptomisin	Fosfotransferaz	<i>tet(G)</i> <i>strA</i> <i>strB</i>
Kloramfenikol	Asetil transferaz	<i>catA3</i>

### 1.8.7.Yönetim

BRD nin kompleks yapısı gereği hastalık yönetim stratejileri hastalığı önlenmesi ve tedavisi üzerine kuruludur. Etiyolojide birden fazla etken olması nedeniyle hastalığın kontrolünde sadece bir faktörün elimine edilmesi problemin çözülmesi için yeterli değildir. BRD yönetiminde sıkı yönetim programları uygulanması gerekliliği önem kazanmaktadır (Rice ve ark. 2007). Günümüzde kondüsyon programları, aşılama ve antimikrobiyal tedavi ile yönetim stratejileri belirlenmektedir.

#### 1.8.7.1.Kondüsyon Programları

BRD kontrolünde en etkili yolun enfeksiyona predispozisyon yaratan stres faktörlerinin azaltılması veya elimine edilmesi konusu tartışmalıdır. Kondüsyon programları süttten kesme aşamasında stresi azaltacak ve hayvanın immun sistemini güçlendirecek uygulamalar konseptidir. Çeşitli programlar mevcuttur ancak genelde süttten kesim periyodu, aşılama, antihelmentik tedavisi, kastrasyon, boynuz kesimi, yemlik ve suluğa alıştırma aşamalarından oluşmaktadır (Thomson ve White 2006).

#### 1.8.7.2.Aşılar



Aşılar işletmelerde solunum sistemi hastalıklarını önlemek amacıyla bir asırdan fazladır üretilmektedir. Aşılamanın ana öncelikleri immun sistemi uyarmak, etkenin saçılmasının önüne geçmek ve subklinik hastalık vakalarını azaltarak hayvanların performansını artırmaktır (Thomson ve White 2006). Amerika ve Kanada’da solunum sığır solunum sistemi hastalıkları önlenmesinde kullanılan ticari aşıların etkinliği değerlendirilmiştir (Bowland ve Shewen 2000). Objektif sonuçların belirlenmesi güçlüğü, anlamlı istatistiksel veri elde etmek için yeterli grupların oluşturulması ve yıldan yıla morbidite-mortalite oranlarının tahmin edilememesi nedenleriyle besi sığırlarında aşı etkinliğini değerlendirmek kaydadeğer güçlüklerin aşılmasını gerektirmektedir. İşletmelerde solunum sistemine yönelik belirli bir aşının ekonomik etkisi belirlenirken tek bir saha denemesinin yetersiz olduğu kabul edilmektedir

İlk aşı çalışmalarında *Bacillus bovisepitica* kültüründen hazırlanan bakterin aşılar kullanılmıştır. Saha denemeleri neticesinde aşının etkinliği tartışmalı hale gelmiştir veya zararlı etkileri olduğu bulunmuştur (Farley 1932). Sonraki yıllarda *M. haemolytica* kültüründen hazırlanan bakterin aşının ne yararlı nede zararlı olduğu bildirilmiştir (Wilkie ve ark. 1980). Canlı *M. haemolytica* aşı çalışmalarında ise koruma düzeylerinde değişken sonuçlar elde edilmiştir. Canlı *M. haemolytica* aşı suşu ile aşılanan sığırlarda antibiyotik kullanımı aşı etkeninin replikasyonunu inhibe edici etkisi nedeniyle tavsiye edilmemektedir (Hjerpe 1990). Hayvanların işletmeye gelmesini takiben yaygın antibiyotik kullanımı canlı aşı uygulaması pratiğini ortadan kaldırmaktadır.

Logaritmik üreme fazında üretilen ve pnömonik pastörelloz patogenezinde önemi anlaşılan Lkt’in belirlenmesi *M. haemolytica* A1 kültür süpernatant aşısı olan ticari aşının gelişimine katkı sağlamıştır. Deneysel uygulamalarda yirmi bir gün arayla iki doz uygulanan aşının orta-şiddetli pnömonilerde etkinliği %60-70 düzeyinde tespit edilmiştir (Shewen ve ark. 1988). Saha denemelerinde ise değişik sonuçlar alındığı rapor edilmiştir (Thorlakson ve ark. 1990). *M. haemolytica*’nın aglütinasyon reaksiyonlarında kullanılan yüzey antijenleri, kapsüler polisakkarid, lipoproteinler ve sialoglikoproteaz gibi logaritmik faz kültür süpernatantındaki çeşitli diğer antijenleri belirlenmiştir ve bu antijenler aşının etkinliğini etkileyebilmektedir. Çeşitli firmalar dış membran ekstraktı, rekombinant Lkt ile zenginleştirilmiş

ekstrakte antijen, kültür süpernatant antijeni eklenmiş bakterin gibi subunit veya subunit zenginleştirilmiş aşılarda antijen ekspresyonu. Demir kısıtlı ortamda antijen ekspresyonu edilen bir aşı lisans almıştır (Donachie 1999).

Yakın zamandaki çalışmalar antijenin mukozal sunumu ile *M. haemolytica*'ya karşı bağışıklığın uyarılmasına odaklanmıştır. Nazofarinks bölgesinde lokal immunité uyarımı *Pasteurella* cinsi etkenlerin kolonizasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Üst solunum yolunda replike olan ve *M. haemolytica* antijenlerini ekspresyon eden viral vektörler, aljinat mikrosferinde kapsüllenmiş *M. haemolytica*'nın oral yolla uygulaması ve modifiye canlı *M. haemolytica*'nın oral yolla uygulanması değerlendirilmektedir. Transgenik yenilebilir aşı üretimi amacıyla bitkilerde *M. haemolytica* antijenleri ekspresyon edildiği rapor edilmiştir (Lee ve ark. 2001).

*M. haemolytica* ilişkili solunum sistemi hastalığının karmaşık etiyojisi göz önüne alındığında hastalığın önlenmesinde tek bir stratejinin tamamen etkili olması mümkün değildir. Daha kesin teşhis yöntemleri, daha etkili aşılarda, etkili terapötik etkenler ve daha rasyonel yönetim uygulamaları kombinasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

### 1.8.7.3. Antimikrobiyal Uygulama

Antimikrobiyal uygulamalar BRD'nin önlenmesi ve tedavisinde başlıca etkili yöntem olarak kabul görmektedir. Kuzey Amerika'da aşılarda sıklıkla kullanılmasına rağmen buzağılara işletmeye gelmesini takiben veya kısa süre içerisinde standart uygulama olarak koruyucu amaçlı antibiyotik uygulanmaktadır (Rice ve ark. 2007). Kanda 48-72 saat süre ile kalabilen antibiyotikler işçilik maliyetlerinin azaltılması sebebiyle daha sık olarak tercih edilmektedir. Bu tarz tedavi popülasyona girişte uygulanır, çünkü aşılama zamanı ile bağışıklık yanıtı oluşturma arasındaki sürede BRD'yi erken dönemde teşhis etmek zordur. Koruyucu amaçla antibiyotik kullanımının morbiditeyi %50'ye kadar azalttığı bildirilmiştir

(Thomson ve White 2006). Sığırlarda lisanslı olan antimikrobiyallerin %80’ni BRD etkenlerine karşı sentezlendiği tahmin edilmektedir (Bowland ve Shewen 2000).

Bu alışmada Sivas bölgesinde pnömoniye neden olan majör bakteriyel etkenlerin prevalansının belirlenmesi, izolatların virülens ve direnç genlerinin tespit edilmesi,ayrıca izolatların “altın standart” olan PFGE yöntemiyle incelenerek birbirleriyle olan genetik ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Akciğer Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada haftada iki kez olmak üzere hayvan kesimlerinin en yoğun olduğu Pazartesi ve Cumartesi günlerinde Sivas ilindeki mezbahalar ziyaret edilerek sığırlara ait akciğer örnekleri (5597 akciğer örneği) incelendi. İnceleme esnasında sağlıklı akciğer örnekleri ve hepatizasyon, eksudat, fibrin birikimi gibi yangı bulguları gözlemlenen pnömonik akciğer örnekleri makas yardımı ile kesilerek kapaklı örnek toplama kaplarına alındı. Pnömonik akciğerlerden 200 ve sağlıklı akciğerlerden 400 olmak üzere toplamda 600 adet akciğer örneği alındı. Akciğerler laboratuvara ulaşınca kadar içerisinde buz kalıbı bulunan örnek taşıma çantasında soğuk zincirde muhafaza edildi.

### 2.2. Kültür

Laboratuvara getirilen akciğer örneklerinden aynı gün içerisinde mikrobiyolojik ekim gerçekleştirildi. Her bir akciğer örneği pens yardımı ile petri kaplarına alındı. Spatül alevde ısıtıldı ve akciğerin ekim yapılacak olan yüzeyi sıcak spatül ile dağıldı. Dağılan kısma steril bistüri ucu ile kesit atıldı. *Pasteurella* ve *Mannheimia* izolasyonu amacıyla akciğerden pens yardımı ile nohut büyüklüğünde bir doku parçası alınarak Kanlı Agar yüzeyine ekim yapıldı. Mikoplazma izolasyonu için ise alınan doku parçası brotha aktarılarak beş tüpte on katlı dilüe edildi ayrıca mikoplazma agara da akciğer örneklerinden ekim yapıldı. Kanlı agarlar 37°C'ye ayarlanmış olan etüve yerleştirildi ve kültür bir hafta takip edildi. Mikoplazma besiyerleri ise %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de bir hafta inkübe edildi.

Mikoplazma agarlarda tipik olarak sahanda yumurta görünümü, mikoplazma brothlarda ise türbidite ve film oluşumu incelendi. Mikoplazma kültürleri üç kez

pasajlandıktan sonra saklamak üzere %50 mikoplazma broth + %50 at serumu olan kryptöplere alınarak -70°C’de muhafaza edildi.

### 2.2.1. Kültür Aşamasında Kullanılan Besiyerleri ve Bileşimleri

#### Kanlı agar

Lab-Lemco’ powder .....	10.0 g/L
Peptone Neutralised.....	10.0 g/L
Sodyum Klorid .....	5.0 g/L
Agar.....	15.0 g/L

Karışımdan 40 gr besiyeri tartılır ve vida kapaklı şişeye aktarılır, distile su ile hacmi 1 litreye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda besiyerinin erimesi sağlandı. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika süreyle sterilize edildi. Besiyeri steril edildikten sonra soğuması sağlandı. Besiyeri sıcaklığı 50°C civarında %5-7 oranında koyun kanı katıldı ve vida kapaklı şişe hafifçe çevrilerek besiyerinin homojen karışması sağlandı. Steril petri kaplarına şarjlı pipetleyici yardımı ile 15 ml hacimde aktarıldı ve katılaşması için 30 dk beklendi.

#### Mueller Hinton Agar

Dehidre Sığır İnfüzyonu.....	300 g/L
Kazein Hidrolizatı.....	17.5 g/L
Nişasta.....	1.5 g/L
Agar.....	17 g/L

Karışımdan 38 gram tartıldı ve vida kapaklı şişeye alındı, distile su ile hacmi 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121°C’de 15 dakikada sterilize edildi, sıcaklığı 50°C civarında iken %7 koyun kanı katıldı ve steril petri kaplarına besiyeri kalınlığı 4mm olacak şekilde döküldü.

### **PPLO agar**

Beef Heart.....	6.0 g/L
Peptone .....	10.0 g/L
Sodyum Klorid.....	5.0 g/L
Agar.....	10.0g/L

Distile su 700 ml hacimde alındı ve 1 litrelik vida kapaklı şişeye aktarıldı. Şişe manyetik karıştırıcıya yerleştirildi ve distile su kaynayana kadar ısıtıldı. Agar noble 10 gram tartıldı ve distile suya ilave edildi. Agar tamamen çözünene kadar ısıtma işlemine devam edildi. PPLO 21 gram tartıldı ve vida kapaklı şişeye aktarıldı. Karışım berrak bir görünüm alınca eridiği anlaşıldı ve otoklavda 121°C’de 20 dakikada steril hale getirildi.

### **PPLO broth**

Beef Heart.....	6.0 g/L
Peptone .....	10.0 g/L
Sodyum Klorid.....	5.0 g/L

Distile su 700 ml hacimde alındı ve 1 litrelik vida kapaklı şişeye aktarıldı. Şişe manyetik karıştırıcıya kondu ve distile su ısıtıldı. PPLO 21 gram tartıldı ve vida kapaklı şişeye ilave edildi. Otoklavda 121°C’de 20 dakika süreyle steril edildi. Besiyeri +4°C’de bir yıla kadar muhafaza edilebilir.

### **Maya Ekstraktı**

Balon jøjeye 500 ml distile su alındı ve manyetik karıştırıcıya yerleştirildi. Isısı 80°C’ye getirilir ve 30 dakika manyetik balık yardımı ile karışması sağlandı. Kuru maya 34 gr tartıldı ve yavaşça balon jøjeye ilave edildi. Inkübasyona 35 dakika devam edildi. Karışım 50 ml’lik falkon tüplerine dağıtıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika süre ile 800xg’de santrifüj edildi. Herbir falkon tüpündeki süpernatant alındı, solüsyon önce 0.45 daha sonra 0.22 mikrometrelik filtrelerden geçirilerek vida kapaklı steril şişeye alındı. pH’sı 1N NaOH ile 8.0’e ayarlandı. Toplam hacim steril DS ile 500 ml’ye tamamlandı ve steril falkonlara 50 ml hacimde taksim edildi.

Falkonlar derin dondurucuya kaldırıldı. Bu şekilde hazırlanan maya ekstraktları 6 ay süre ile kullanılabilir.

### **At Serumu**

At serumu derin dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığında erimesi beklendi. Benmaride 56°C'de 1 saat süre ile inkübe edilerek komplement aktivitesi ortadan kaldırıldı. Sonrasında 0.22 mikrometrelik filtreden geçirilerek steril vida kapaklı şişeye aktarıldı.

### **PPLO Supplement**

Steril DS 250 ml hacimde vida kapaklı şişeye alındı, 10 gr glukoz, 20 gr sodyum piruvat ve 2 gr ampisilin katıldı. Karıştırılarak erimesi sağlandı ve 0.22 mikrometrelik filtreden süzülerek 50 ml'lik falkonlara aktarıldı. Falkonlar derin dondurucuya yerleştirildi. Supplement -20 °C derin dondurucuda 1 yıla kadar saklanabilir.

**PPLO besiyeri hazırlanışı:** Steril edilmiş ve ısısı yaklaşık 50°C olan 700 ml hacimdeki besiyerine 200 ml at serumu, 50 ml maya ekstraktı ve 50 ml PPLO supplement eklendi. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra agarlar petri kaplarına 15 ml hacimde döküldü, brothlar ise steril tüplere 9 ml taksim edildi.

## **2.3. Biyokimyasal Testler**

Kanlı agar yüzeyinde üreyen koloniler pasajlandı. Gram boyama yapılarak Gram negatif olan izolatlar seçildi ve biyokimyasal testler yapıldı. Oksidaz ve katalaz pozitif izolatlar belirlenerek Vitek2 compact (Biomerieux) cihazında 47 adet biyokimyasal parametreye göre incelendi.

### **Oksidaz testi**

Oksidaz testi ayıracı olan N, N, N', N'-tetra-metil-p-fenilen diamin dihidroklorid'in %1'lik çözeltisi taze olarak hazırlandı ve kurutma kağıdı üzerine pipet yardımı ile damlatıldı. Saf kültürden öze yardımı ile bir miktar koloni alındı ve ayıraç emdirilmiş olan bölgeye sürülür. Mavi-mor renk oluşumu gözlemlendi, 30 saniye içerisinde mavi-mor renk oluşması pozitif olarak yorumlandı.

### **Katalaz testi**

Lam yüzeyine test edilecek olan saf kültürden öze yardımı ile bir miktar alındı ve üzerine katalaz testi ayıracı olan %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı. Lam yüzeyinde hava kabarcığı oluşması pozitif olarak yorumlandı.

### **Glukoz Hidrolizi**

At Serumu.....16ml  
Maya Ekstraktı.....8ml  
Fenol Kırmızısı (%0.05).....5ml  
Glukoz (%20).....2ml

Bu formülasyona göre hazırlanan supplement'den 7.5 ml alınarak 17.5 ml PPLO broth'a aktarıldı. Steril cam tüplere 5 ml hacimde taksim edildi. Şüpheli Mikoplazma kültüründen 2 damla brotha damlatıldı ve broth 37°C'de bir hafta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında broth renginin sarıya dönmesi pozitif değerlendirildi.

### **Arjinin Hidrolizi**

At Serumu.....16ml  
Maya Ekstraktı.....8ml  
Fenol Kırmızısı (%0.05).....5ml  
L-arginine (%30).....3.4ml



Bu formülasyona göre hazırlanan supplement'den 7.5 ml alınarak 17.5 ml PPLO broth'a aktarıldı. Steril cam tüplere 5 ml hacimde taksim edildi. Şüpheli Mikoplazma kültüründen 2 damla brotha damlatıldı ve broth 37°C'de bir hafta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında brothda pembe renk oluşması pozitif değerlendirildi.

## **2.4. DNA İzolasyonu**

### **Fenol Kloroform Metodu**

Eppendorf tüpünün (1.5 ml) içerisine 300 ul steril distile su alındı ve taze katı kültürden ortalama 8-10 koloni süspanse edildi. Üzerine 300 ul K tamponu ilave edildi (K Tamponu: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0.2 Sodyum Dodesil Sülfat-SDS). Her tüpe 25 mg/ml Proteinase K'dan (100 mg Sigma: 4 ml steril DW ile sulandırıldıktan sonra 1 ml olacak şekilde 4 ayrı tüpe taksim edilir ve -20°C'de saklanır) 5 ul ilave edildi. Numuneler vortekslelendikten sonra 56°C'de ortalama 2 saat benmaride inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından Proteinase K inaktivasyonu için 10 dakika kaynatma işlemi yapıldı. Toplam hacim 600 ul ise 600 ul de 25:24:1 fenol:kloroform:isoamil alkol tüplere aktarıldı. 5 dakika elde iyice çalkalandıktan sonra 10 dakika 13000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüjün ardından iki katman oluştu. Alt faza hiç dokunulmadan üst faz aynı numaralar verilmiş başka bir tüpe pipet ile 100 ul şeklinde tekrarlanarak aktarıldı. (Alt faz protein artıklarının çökmesinden dolayı kirli fazdır). Alınan miktarın 2-2.5 katı kadar -20°C'de saklanan saf etil alkol ve 1/10'u kadar 3M Na Asetat ilave edildi. Vortekslemenin ardından -20°C'de 2 saat presipitasyon işlemi uygulandı. Bu işlemin ardından 10 dakika 13000 rpm santrifüj yapıldı ve sıvının tamamı dikkatli bir şekilde döküldü. Üzerine %70 derişimli etil alkolden 300 ul ilave edildi ve 13000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı döküldükten sonra kurumaya bırakıldı ve pelet 100 ul steril DS ile sulandırılarak vorteksleme yada pipetaj yapılarak PZR'da hedef DNA olarak kullanıldı.

### **Referans Suşlar**

Bilgi: DSMZ-Leibniz Enstitüsü (Almanya), Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (*E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 29213) ve Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan (*P. multocida* ATCC 43137 ve *P. multocida* ATCC 12948) temin edilen referans suşlar kültür, DNA izolasyonu, PZR ve antimikrobiyal duyarlılık belirleme aşamalarında kullanıldı.

Liyofilize şekilde Almanya'dan gelen suşlar (*M. bovis* DSM 22781 (ATCC 25523), *M. haemolytica* DSM 10531 (ATCC 33396)) referans laboratuvar protokolüne göre açıldı.

## 2.5. PZR

**dNTP Sulandırması:** dNTP'lerin (100 mM 25 ug dNTP Set, Vivantis) her birinden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 ul alınarak 1.5 ml'lik bir eppendorf içerisinde karıştırıldı. Steril DS'ye (760 ul) 40 ul dNTP miksi katılır ve vortekslendikten sonra kullanıma hazırdır. Bu şekilde dNTP'ler 1/20 oranında sulandırılmış oldu.

**Primerlerin Sulandırılması:** Primerler stok konsantrasyonu 10 pmol/mikrolitre olacak şekilde steril distile su ile sulandırıldı. Stok primerler 100 mikrolitrelik hacimlerde eppendorf tüplerine aktarıldı ve derin dondurucuya yerleştirildi

**PZR Karışımı:** Mastermiks hazırlama işlemi PZR örnek sayısına göre Çizelge 2.1'de belirtilen formülasyona göre hesaplandı ve hazırlanan mastermiks 22.5 µl'lik hacimlerde 200 µl'lik şeffaf eppendorf tüplerine pipet yardımı ile dağıtıldı. DNA izolasyonu yapılmış örneklerden her bir eppendorf tüpüne 2.5 µl kalıp DNA aktararak tüplerin kapağı kapatıldı. Eppendorf tüpler termal siklus cihazının (Biorad T100) metal bloğuna dizildi ve cihazın ekranına çalışılan primer ile ilgili kondüsyonlar girildi. İlk olarak 95°C'de ön denatürasyon, 30-35 siklus boyunca

denatürasyon, primer bağlanma ve sentez aşaması tekrarlandı, 72°C’de 5 dakika son sentez aşaması gerçekleştirildi. Yaklaşık 2-2.5 saat sonunda hedef DNA’lar yapay koşullarda termal siklus cihazında amplifiye edilmiş oldu.

**Çizelge2.1.** 25 µl’lik total hacimde bir örnek için PZR mastermiks hazırlanması

DS	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	PCR Buffer 10X	dNTP (5mM)	Enzim	Primerler (10pmol/ µl)	Kalıp DNA
13 µl	2.5 µl	2.5 µl	4x0.5 µl	0.125 µl	2x1.25 µl	2.5 µl

**Elektroforez:**Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi için jel %1.5 oranında hazırlandı ve örnekler jele yüklenerek elektriksel akım etkisiyle yürütüldü.

**Agarose Jel Hazırlanması (%1.5):**Jel tankının büyüklüğüne göre örneğin 250 ml hacimli jel tankı için 3.75 gr agarose tartıldı ve 250 ml 1xTBE ile sulandırıldı. Mikrodalga fırında 2-3 dakika kaynatıldı ve homojen bir erime olması için ara sıra karıştırıldı. Tam homojen bir erimenin ardından jel biraz soğutuldu ve jel kalıbına döküldü. Baloncuk oluşturmamaya dikkat edildi. Devamında örnek sayısına göre jel katılaşmadan taraklar yerleştirildi. Jelin katılaşması için 30 dakika beklenildi.

#### **TBE5x Stok Solüsyon Hazırlanması:**

Tris.....54.4 g

Borik Asit..... 27.2 g

EDTA.....4.6 g

Bir balon joje içerisine 1L distile su ile tamamlandı. Manyetik karıştırıcı yardımı ile karışımdaki maddelerin homojen bir şekilde erimesi sağlandı. Oda sıcaklığında saklanmalıdır.

Jel hazırlanmasında ve elektroforez bufferı olarak 1xTBE kullanma solüsyonu kullanıldı.

**Yükleme İşlemi:** Amplifikasyon ürünlerinin jele yüklenmesi için DNA Marker ve Jel Yükleme boyasına (6x) ihtiyaç duyulur. Rulo parafilm üzerine yaklaşık 15 mikrolitre PZR ürünü + 3 mikrolitre yükleme boyası alındı. Pipet yardımıyla homojen karışım sağlandı ve elektroforez ünitesinin jelindeki ilgili kuyucuklara yükleme yapıldı. DNA Marker'dan 5 mikrolitre alındı ve jelin iki ucundaki kuyucuklara yüklendi.

**Yükleme Sırası:** Pipet yardımı ile Marker+ Numuneler+ Negatif Kontrol +Pozitif Kontrol+ Marker şeklinde jele yükleme yapıldı. Yükleme işlemi takiben elektroforez tankının kapağı kapatıldı. Güç ünitesi açıldı ve örnekler 110 V'da 90 dakika süre ile elektroforez işlemine tabi tutuldu (Biorad, PowerPac Basic).

**Jelin Görüntülenmesi:** Elektroforez işlemi sonrasında jel boyama işlemi için plastik bir kaba 400 ml distile su alındı ve 40 µl Etidyum Bromid (10 mg/ml) ilave edildi. Jel elektroforez tankından alındı ve boyama kabına aktarıldı. Jelin boyanması için 20-30 dakika beklenildi. Boyama tankından spatül yardımıyla jel alındı ve jel görüntüleyici cihazına yerleştirildi (Vilber Lourmat, Quantum ST4). UV ışığı altında jelin görüntüsü alındı ve masaüstüne görüntüsü kaydedildi.

*M. haemolytica* izolatlarının serotip (Çizelge 2.2), virülens (Çizelge 2.3) ve direnç (Çizelge 2.4) genleri tespitinde, *P. multocida* izolatlarının kapsül (Çizelge 2.5), virülens (Çizelge 2.6) ve direnç (Çizelge 2.7) genleri tespitinde ilgili tablolardaki primer çiftleri PZR aşamasında kullanıldı.

**Çizelge 2.2.***M. haemolytica* izolatlarının serotip tayininde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

Kodu	Primer dizilimi (5'-3')	Amplikon	Hedef Serotip	Tm
Hyp_F	CATTTCCCTTAGGTTTCAGC	306 bp	Serotip 1	55°C
Hyp_R	CAAGTCATCGTAATGCCT			
Core2_F	GGCATATCCTAAAGCCGT	160 bp	Serotip 2	55°C
Core2_R	AGAATCCACTATTGGGCACC			
TupA_F	TGAGAATTTTCGACAGCACT	78 bp	Serotip 6	55°C
TupA_R	ACCTTGGCATATCGTACC			

**Çizelge 2.3.***M. haemolytica* virulens genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

Kodu	Primer dizilimi(5'-3')	Amplikon	Hedef Gen	Tm
gcp_F	CGCCCCTTTTGGTTTTCTAA	420 bp	O-sialogliko proteaz	58°C
gcp_R	GTAATGCCCTTCCATATGG			
gs60_F	GCACATTATATTCTATTGAG	429 bp	Dış membran lipoprotein	55°C
gs60_R	AGGCATACTCTAACTTTTGC			
tbpB_F	CTACTTGCTGCTTGTTTCCTC	137 bp	Demir bağlayan protein	60°C
tbpB_R	AGAACCGCTTACTGTACGTC			
lktC_F	GGAAACATTACTTGGCTATGG	440 bp	Lökotoksin	58°C
lktC_R	TGTTGCCAGCTCTTCTTGATA			
nmaA_F	CTGTAGAAGCCGGAACAGTA	129 bp	UDP-N-asetil D glukozamin epimeraz	60°C
nmaA_R	CATCGCCATAAGGGTTGTGA			
adh_F	CTGCAAGTAAGGCAACATTG	150 bp	Adezyon	58°C
adh_R	GAATCCGCACCAATAGCAAT			

**Çizelge 2.4.***M. haemolytica* direnç genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

Kodu	Primer dizilimi (5'-3')	Amplikon	Hedef Gen	Tm
bla_F	AATAACCCTTGCCCCAATTC	685 bp	Ampisilin/Penisilin	60°C
bla_R	TCGCTTATCAGGTGTGCTTG			
aphA_F	TTATGCCTCTTCCGACCATC	489 bp	Neomisin	58°C
aphA_R	GAGAAAACCTCACCGAGGCAG			
tetH_F	ATACTGCTGATCACCGT	1076 bp	Tetrasiklin	60°C
tetH_R	TCCAATAAGCGACGCT			

**Çizelge 2.5.** *P. multocida* kapsül genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

Kodu	Primer dizilimi (5'-3')	Amplikon	Kapsül Serogrubu	Tm
PM_A_F	TGCCAAAATCGCAGTCAG	1044 bp	A	55°C
PM_A_R	TTGCCATCATTGTCAGTG			
PM_B_F	CATTTATCCAAGCTCCACC	760 bp	B	55°C
PM_B_R	GCCCGAGAGTTTCAATCC			
PM_D_F	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657 bp	D	55°C
PM_D_R	CATCTACCCACTCAACCATATCAG			
PM_F_F	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	851 bp	F	55°C
PM_F_R	TTCCGCCGTCAATTACTCTG			

**Çizelge 2.6.** *P. multocida* izolatları virülens genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplikon boyutları

Kodu	Primer dizilimi(5'-3')	Amplikon	Gen	Tm
ptfA_F	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC	488 bp	Adezin	55°C
ptfA_R	TCATGAATTCTTATGCGCAAATCCTGCTGG			
pfhA_F	TTCAGAGGGATCAATCTTCG	286 bp	Adezin	55°C
pfhA_R	AACTCCAGT TGGTTTGTGC			
tadD_F	TCTACCCATTCTCAGCAAGGC	416 bp	Adezin	60°C
tadD_R	ATCATTTTCGGGCATTCACC			
toxA_F	CTTAGATGAGCGACAAGG	864 bp	Toksin	55°C

toxA_R	GAATGCCACACCTCTATAG			
hgbA_F	TCAACGGCAGATAATCAGGG	267 bp	Demir bağlanma	55°C
hghA_R	GCGGGAATGCTGAAGATAAG			
hghB_F	ACCGCGTTGGAATTATGATTG	788 bp	Demir bağlanma	54°C
hghB_R	CATTGAGTACGGCTTGACAT			
tonB_F	CGACGGTGAAACCTGAGCCA	261 bp	Demir bağlanma	54°C
tonB_R	CCGAGCGATAAGCATTGACT			
nanB_F	CATTGCACCTAACACCTCT	555 bp	Sialid	57°C
nanB_R	GGACACTGATTGCCCTGAA			
nanH_F	GTGGGAACGGGAATTGTGA	287 bp	Sialid	57°C
nanH_R	ACATGCCAAGTTTGCCCTA			
ompA_F	CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC	201 bp	Protektin	55°C
ompA_R	CATAAACAGATTGACCGAAACG			
ompH_F	CGCGTATGAAGGTTTAGGT	438 bp	Protektin	57°C
ompH_R	TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC			
oma87_F	GGCAGCGAGCAACAGATAACG	838 bp	Protektin	55°C
oma87_R	TGTTTCGTCAAATGTCCGGTGA			

**Çizelge 2.7.** *P. multocida* izolatları direnç genleri tespitinde kullanılan primer dizileri ve amplicon boyutları

Kodu	Primer dizilimi(5'-3')	Amplicon	Hedef Gen	Tm
bla_F	CATTAACGGCTTGTTTCGC	852 bp	Beta laktamaz	55°C
bla_R	CTTGCTTTGCTGCATCTTC			
aphA1_F	ATGAGCCATATTCAACGGG	816 bp	Aminoglikozid	55°C
aphA1_R	TCAGAAAACTCATCGAGCATC			
tetB_F	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	774 bp	Tetrasiklin	55°C
tetB_R	ACTGCCGTTTTTTTCGCC			
tetH_F	ATACTGCTGATCACCGT	1076 bp	Tetrasiklin	60°C
tetH_R	TCCCAATAAGCGACGCT			
cat3a_F	ACCATGTGGTTTTAGCTTAACA	473 bp	Kloramfenikol	56°C
cat3a_R	GCAATAACAGTCTATCCCCTTC			

## 2.6. Real Time PZR

qPZR mastermiks hazırlama işlemi Çizelge 2.8’de belirtilen formülasyona göre hesaplandı ve hazırlanan mastermiks 45 µl’lik hacimlerde 200 µl’lik mat PZR tüplerine mikropipet ile dağıtıldı. DNA izolasyonu yapılmış örneklerden her bir ependorf tüpüne 5 µl kalıp DNA aktarıldı ve tüplerin üst kısmı şeffaf folyo ile sıkıca yapışacak şekilde kapatıldı. Tüpler termal siklus cihazının (Bioneer, Exicycler 96) metal bloğuna dizildi, bilgisayardan çalışılacak olan etkenle ilgili kondüsyonlar girildi, kullanılan proba özgü ilgili kanal ekrandan seçilerek amplifikasyon işlemi eş zamanlı olarak bilgisayar ekranından takip edildi. Çalışılan hedef etkene göre Çizelge 2.9’da belirtilen primer ve prob kombinasyonları qPZR aşamasında kullanıldı

**Çizelge2.8.** 25 örnek için qPZR mastermiks hazırlanması

DS	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	PCR Buffer 10X	dNTP (5mM)	Enzim	Primerler (10pmol/ µl)	Prob (10pmol/ µl)
656 µl	125 µl	125 µl	100 µl	6.25 µl	50*2 µl	17.5 µl

**Çizelge 2.9.** qPZR’da kullanılan hedef etkenlere spesifik primer ve prob dizileri

Etken	Gen	Primer ve Prob Dizileri(5’-3’)	Tm
<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>sodA</i>	ATTAGTGGGTTGTCCTGGTTAG	55°C
		GCGTGATTTTCGGTTCAGTTG	
		FAM-CTGAACCAACACGAGTAGTCGCTGC-TAMRA	
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>kmt-1</i>	GGGCTTGTCTGGTAGTCTTT	55°C
		CGGCAAATAACAATAAGCTGAGTA	
		FAM-CGGCGCAACTGATTGGACGTTATT-TAMRA	
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>oppD</i>	TCAAGGAACCCACCAGAT	60°C
		AGGCAAAGTCATTTCTAGGTGCAA	
		FAM-TGGCAAACCTTACCTATCGGTGACCCT-TAMRA	



## 2.7. Sekans Analizi

PZR uygulamalarında virülens ve direnç genleri için referans pozitif DNA'sı olmayan örnekler dizi doğrulanması amacıyla sekans analizine gönderildi. İlgili örnekler için PZR'da çift tüpte 50 µl hacimde amplifikasyon işlemi yapıldı. Amplikonlar jele yüklenerek hedef dizilerin varlığı doğrulandı. İlgili örnekler dizi analizi yapılmak üzere soğuk zincirde her bir örnek 5 pmol/mikrolitre konsantrasyonda kendi primeri ile beraber Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü'ne gönderildi. Sekans analizi sonucunda hedef dizisi belirlenemeyen kısa amplikonlar ise jelden saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldı ve örnekler tekrar sekans analizine gönderilerek dizileri belirlendi.

Sanger kapiller sekanslama sonucunda elde edilen floresan temelli okuma sonuçları her bir örnek için kromatogram şeklinde SNAPGENE programında değerlendirildi. Kromatogram sonucunda DNA dizisi belirlenen amplikonlar BLAST online modül kullanılarak Gen Bankası veritabanındaki veriler ile karşılaştırıldı ve amplikonların temsil ettiği diziler analiz edildi.

## 2.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

### 2.8.1. Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyon testi ile *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıkları belirlendi. *P. multocida* izolatları için kanamisin (5µg), streptomisin (25µg), kloramfenikol (30µg), siprofloksasin (10µg), trimethoprim/sülfametaksazol (25µg), tetrasiklin (30µg), spektinomisin (25µg), norfloksasin (10µg), enrofloksasin (5µg), seftiofur (30µg), doksisiklin (30µg) ve ampisilin (10µg) diskleri, *M. haemolytica* izolatları için ise amoksisilin/klavulanik asit (30µg), oksitetrasiklin (30µg), tetrasiklin (30µg), trimethoprim/sülfametaksazol

(25µg), enrofloksasin (5µg), penisillin (10µg), seftiofur (30µg), ampisilin (10µg), spektinomisin (25µg), gentamisin (30µg), tilmikosin (15µg) ve neomisin (30µg) diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanıldı.

### **2.8.1.1 İnokulum Hazırlanması**

Kültürden inokulum hazırlamak için vida kapaklı cam tüpler otoklava verilerek steril edildi. Tüplere 5 ml steril FTS ilave edildi ve her bir kültürden eküvyon yardımıyla koloni alınarak tüpün cidarında FTS ile süspanse edildi. Spektrofotometrik cihazda (Biosan DEN-1) 600nm dalga boyunda ilk olarak FTS olan tüp blank okutuldu sonrasında sırası ile örnekler ait süspanسیونlar okutuldu ve örneklerin yoğunluğu 0.5 MacFarland'a göre ayarlandı. Bakteri süspanسیونlarından eküvyon çubuğu yardımıyla alınarak %7 koyun kanlı MHA üzerine boşluk kalmayacak şekilde agar yüzeyine yayıldı. İlgili antibiyotik içeren diskler steril pens yardımı ile agar yüzeyine yerleştirildi. Petri kapları etüve kaldırıldı ve 24 saat sonra agar yüzeyindeki inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçülerek not edildi (Hudzicki ve ark. 2009).

Örneklerle beraber *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kalite kontrol suşları antibiyogram sonuçları esnasında eşzamanlı olarak verifikasyon aşamasında kullanıldı.

### **2.8.2. Mikoplazma Antimikrobiyal Duyarlılık Belirleme**

Veteriner mikoplazma türleri MİK değerlerinin belirlenmesinde sıvı ve katı MİK metotları kullanılmaktadır. Bu metotların örnekleri arasında Tanner ve ark. (1992) tarafından kullanılan sıvı metot ve Hannan ve ark. (2000)'nın belirttiği agar metodu yer almaktadır. Bu metotların ikisinde insan kökenli mikoplazmaların test edilmesine olanak sağlamak ve çeşitli hayvan türlerinden izole edilen mikoplazmaları test

etmede kullanılmaktadır. İki metotla alınan sonuçlar çoğu durumda benzerlik göstermektedir. Brothda iyi gelişme gösteren mikoplazma türleri için Tanner metodu, broth veya agarda üreme gözlemlenen türler için ise modifiye Hannan metodu kullanılması tavsiye edilmektedir. Sıvı metot uygulanması açısından kolay olmakla beraber az sayıda örnekle çalışılacaksa, agar metodu ise fazla sayıda mikoplazma suşu ile çalışılacaksa tavsiye edilmektedir. Sıvı metot ayrıca az sayıda örnekle çalışılacak ise tüpte de uygulanabilmektedir.

### **2.8.2.1. Sıvı MİK Belirleme Metodu**

#### **2.8.2.1.1. Stok Mikoplazma Kültürü Hazırlanması**

Mikoplazmalar primer izolasyon ve identifikasyonun ardından 10 ml'lik tüplerde uygun substratlı (glukoz, arjijin, piruvat veya üre) ve pH indikatörlü (fenol kırmızısı) brothlarda renk değişimi oluşana kadar 36°C'de üretildi. Steril gliserol final konsantrasyonu %5 olacak şekilde her bir kültüre ilave edildi ve kültürler 1 ml'lik viallere 5 seri şeklinde taksim edilerek -70°C'de saklandı.

#### **2.8.2.1.2. Mikoplazma İnokulumu Hazırlanması**

1. Derin dondurucudan(-70°C) 1 ml donmuş inokulum çıkarıldı ve eritildi. Glukoz veya piruvat kullanan türler için pH'ı 7.6'ya, arginin kullanan türler için 6.8'e veya üre kullanan türler için 6.0-6.5'a ayarlanmış uygun vasattan 4 ml ilave edildi.
2. Asit veya alkali reaksiyon gözlemlenene kadar dilüe kültür 36°C'de inkübe edildi.
3. Renk değişimi için geçen süre not edildi.

### **2.8.2.1.3. Sıvı MİK Testlerinde Canlı Hücre Sayımı**

1. Mikoplazma kültüründen 1 ml alındı ve 9 ml steril mikoplazma broth ile sulandırıldı, süspansiyon mikoplazmaların kümeleşmesini önlemek amacıyla 5 saniye vortekslendi.
2. Vortekslenen süspansiyondan 0.9 ml lik hacimlerde  $10^{-2}$ – $10^{-9}$  arasında 10 kat sulandırmalar yapıldı.
3. pH'ı ayarlanmış steril mikoplazma brothdan 0.1 ml alınarak yuvarlak dipli pleytin yatay sırasındaki 8 kuyucuğa aktarıldı.
4. Sterilite kontrol amacıyla 0.2 ml steril mikoplazma broth 12 numaralı kuyucuğa aktarıldı.
5. Her bir mikoplazma dilüsyonundan 0.1 ml alındı, 8 numaralı kuyucuktan başlayıp 1 numaralı kuyucuğa kadar 0.1 ml broth olan kuyucuklara aktarıldı.
6. Pleyt yapışkan pleyt filmi ile kapatıldı, kullanılmayan kuyucuklar delinerek inkübasyon esnasında folyonun açılması önlenmiş oldu. Her kuyucuğun kenarındaki film düz bir obje ile bastırılarak filmin iyice yapışması sağlandı.
7. Renk değişimi tamanlanana kadar pleytler  $36^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi.
8. Sonuçlar kaydedildi; renk değişiminin (yaklaşık 0.2 pH ünitesi) olduğu en düşük dilüsyon 0.1 ml dilüe edilmemiş mikoplazma kültüründe renk değiştiren ünite (ccu) sayısının karşılığını ifade etmektedir. Örneğin,  $10^{-6}$  dilüsyonda renk değişimi olursa, dilüe edilmemiş kültürün 0.1 ml'sinde  $10^6$  veya 1 ml'de  $10^7$  ccu olduğunu göstermektedir

### **2.8.2.1.4. Sıvı MİK Testlerinde İnokulum Hazırlanması**

1. Prosedür 1.2 de olduğu gibi inkübasyon periyodu duplike olarak tekrarlandı.
2. Kültür konsantrasyonu  $10^3$  ccu -  $10^5$  ccu / mL olacak şekilde mikoplazma broth ile dilüe edildi.

#### **2.8.2.1.5. Modifiye MİK metodu (Tanner ve Wu method)**

1. Pleytte yatay olarak 1-9 arasındaki kuyucuklara her bileşik dilüsyonundan 0.1 ml aktarıldı.
2. Sterilite kontrol kuyucuğu olan 12 numaralı kuyucuğa pH'ı ayarlanmış steril mikoplazma brothdan 0.2 ml aktarıldı.
3. 10 numaralı kuyucuğa pH'ı ayarlanmış steril mikoplazma brothdan 0.2 ml aktarıldı. (fermentatif türler için ph 6.8, son kontrol noktası)
4. 11 numaralı kuyucuğa (üreme kontrol) pH'ı ayarlanmış steril mikoplazma broth'dan 0.1 ml aktarıldı.
5. Antibiyotik dilüsyonları olan 1-9 arasındaki her bir kuyucuğa ve üreme kontrol kuyucuğuna 0.1 ml mikoplazma inokulumu aktarıldı. MİK testleri antimikrobiyal duyarlılık aralıkları bilinen standart referans mikoplazma suşları ile yapıldı, bu sayede sonuçların geçerliliği doğrulandı.
6. Pleyt yapışkan film ile kapatıldı ve üreme kontrol kuyucuğundaki renk son kontrol noktası kuyucuğundaki ile uyumlu olana kadar  $36^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi.
7. MİK değerleri kayıt edildi; üreme kontrol kuyucuğundaki renk son kontrol noktası kuyucuğundaki ile uyumlu olduğunda renk değişiminin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeridir.
8. İnokulum kontrol kuyucuğundaki renk değişimi tamamlanana kadar pleytin inkübasyonuna devam edildi.

## 2.9. Pulsed Field Jel Elektroforez (PFGE)

### 2.9.1. PFGE Solüsyon Bileşimleri

#### TE Buffer, 1L

Tris 1M, pH 8.0.....	10 ml
EDTA 0.5M, pH 8.0 .....	2 ml
Ultsa Saf Su.....	988 ml

Otoklavlanır ve oda sıcaklığında saklanır

#### Hücre Süspansiyon Buffer, 0.5L

Tris 1 M, ph 8.0.....	50 ml
EDTA 0.5M, pH 8.0 .....	100 ml
Ultsa Saf Su.....	350 ml

Otoklavlanır ve oda sıcaklığında saklanır

#### Proteinase K

Proteinase K .....	200 mg
Ultsa Saf Su.....	5 ml
Aliquot .....	1ml/tüp

Yaklaşık 50°C'ye kadar ısıtarak çözdürülür ve 1 ml'lik hacimlerde -20 °C'de saklanır

#### Sarcosyl (%10)

Sarcosyl.....	10 gr
Ultsa Saf Su.....	100 ml

Isıtılarak çözdürülür ve oda sıcaklığında saklanır

#### Cell Lizis Buffer

Tris 1 M, ph 8.0..... 25 ml  
EDTA 0.5M, pH 8.0 .....50 ml  
Sarcosyl %10.....50ml  
Ultra saf su ile hacmi 500 ml'ye tamamlanır

### SDS %10

SDS .....10 gr  
Ultsa Saf Su .....100 ml  
Isıtılarak çözdürülür ve oda sıcaklığında saklanır

### Low melting agaroz(% 2)

Kromozomal Grade Agaroz..... 1 gr  
TE Buffer .....50 ml  
Mikrodalgada ısıtılarak çözdürülür

### Pulse Field Sertifikalı Agaroz(%1)

Kromozomal Grade Agaroz..... 1 gr  
TBE Buffer 0.5x.....100 ml  
Mikrodalgada ısıtılarak çözdürülür ve ısısı 50 °C civarında iken jel kalıbına dökülür

### Restriksiyon Enzimleri

*ApaI*, *SaII* ve *SmaI* restriksiyon enzimleri ultsa saf su ve enzim buffer (10x) ile sulandırılarak literatürde belirtilen miktarda kullanıldı. İlgili enzimlerin tanıma bölgeleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

<b>ApaI</b>	<b>SaII</b>	<b>SmaI</b>
5'...GGGCCC...3' 3'...CCCGGG...5'	5'...GTCGAC...3' 3'...CAGCTG...5'	5'...CCCGGG...3' 3'...GGGCCC...5'

**Şekil2.1.** PFGE analizinde kullanılan enzimler ve ilgili enzimlerin 6 bp'lik palendromik tanıma bölgeleri

### **2.9.2.Mikoplazma PFGE Protokolü**

*M. bovis* izolatlarının PFGE ile tiplendirilmesi aşamasında McAuliffe ve ark. (2004) belirttiği protokol kullanıldı.

**Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması:** Etüvde 4-6 gün boyunca brothda üretilen mikoplazma örnekleri alınarak dansitometrede yoğunlukları belirlendi. Spektrofotometrik cihazda(Shimadzu UV-1800) 600 nm dalga boyunda ilk olarak mikoplazma broth blank olarak okutuldu devamında ise her bir kültürden hazırlanan örnekler sırası ile okutularak bakteri yoğunluğu 0.3 olarak ayarlandı. Cam tüpler içerisindeki mikoplazma brothlar 3500 g'de +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi ve TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, ph 8.0) ile 3 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra 250 µl TE buffer ile sulandırıldı.

**Plug Hazırlama:** McFarland (OD600'de 0.3) standardına göre ayarlanan kültürlerden 100 µl alındıve steril ependorflara aktarıldı. Agaroz ile karıştırıldığında hemen katılaşmaması için ependorflar 37°C'ye ayarlanmış olan benmariye kaldırıldı. Low melting agaroz %2'lik hazırlandı. Bakteri süspansiyonu ile agaroz pipet yardımıyla karıştırıldı. Her bir ependorf tüpünden 100 µl alınarak plug kalıbına aktarıldı ve 20 dakika süreyle +4 °C'de katılaşması beklendi.

**Lizis Aşaması:** Örnek sayısına göre lizis buffer hazırlandı ve her örneğe 5 ml lizis buffer hesap edildi. Falkon tüpüne 10mM Tris, 1mM EDTA, ph 8.0 aktarılır. Sarcosyl %10'luk hazırlandı, erimesi için benmaride (55° C) bekletildi ve final konsantrasyonu %1 olacak düzeyde falkonlara aktarıldı. Kalan hacim örnek sayısına göre steril saf su ile tamamlandı ve hazırlanan lizis buffer 5'er ml hacimde steril falkon tüplere dağıtıldı. Her bir tüpe 250 µl Proteinaz K (20mg/ml) ilave edildi. Katılaştan pluglar ilgili falkonlara parçalanmadan alındı. Falkon tüp içerisindeki



örnekler 56°C ve 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcı benmaride 48 saat lizise bırakıldı.

**Yıkama:** Örnekler benmariden alınarak 5 dakika +4°C'de bekletildi. Plug parçalanmadan falkon tüp içerisindeki buffer uzaklaştırıldı. Tüplere 10 ml ultra saf su (55°C) ilave edildi, örnekler benmariye yerleştirildi ve çalkalama işlemine devam edildi. Yaklaşık 20 dakika beklendi ve ultra saf su ile yıkama işlemi tekrarlandı. Aynı yıkama işlemi bu defa TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) ile 4 defa yapıldı. Pluglar toplamda 6 kez yıkanmış oldu. Yıkanan pluglar TE buffer'a alınarak +4°C'de saklandı.

**Restriksiyon:** Örnek sayısı kadar steril ependorf tüp hazırlandı ve spora dizildi. Enzimin tampon buffer'ı derin dondurucudan çıkarıldı ve erimesi beklendi. Steril başka bir tüpe örnek sayısına göre 177 µl Steril su + 20 µl buffer + 3 µl *SmaI* enzimi hazırlandı ve ependorflara 200 µl taksim edildi. Lizis aşaması bitmiş olan pluglar steril bistüri ucu ile kesilerek ilgili ependorflara aktarıldı. Ependorflar benmari'de 37°C'de 1 gece inkübe edildi.

**Elektroforez:** Pulsed Field sertitikalı agaroz 0.5x TBE buffer ile 100 ml hacimde %1'lik hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi. Sıcaklığı 50-55°C civarında olan agaroz jel kalıbına döküldü ve pluglar yüklenmiş oldu. Jelin katılaşması için 30 dakika beklendi. Bu esnada cihazın parametreleri girildi ve elektroforez tankındaki tampon solüsyon olan 0.5x TBE soğutulmuş oldu. Örnekler 14°C'de, 4-40 switch süresi, 6v/cm voltajda 20 saat süreyle jelde yürütüldü (Biorad, CHEF DR III).

### 2.9.3. *Mannheimia* PFGE Protokolü

*M. haemolytica* izolatlarının PFGE ile tiplendirilmesi aşamasında Klima ve ark. (2010) belirttiği protokol kullanıldı.

**Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması:** Steril bir vida kapaklı şişede süspansiyon tamponu hazırlandı (0.1 M Tris, 0.1 M EDTA, pH 8.0) ve tampon pipetle steril

tüplere 2 ml hacimde dağıtıldı. Eküvyon yardımıyla saf taze kültürden koloniler alınarak süspansiyon tamponunda homojen bir bakteri süspansiyonu hazırlandı. Spektrofotometrik cihazda(Shimadzu UV-1800) 600 nm dalga boyunda ilk olarak süspansiyon tamponu blank olarak okutuldu devamında ise her bir kültürden hazırlanan örnekler sırası ile okutulurken bakteri yoğunluğu 1.25-1.35 arasında ayarlandı.

**Plug Hazırlama:** McFarland (OD600'de 1.1) standardına göre ayarlanan kültürlerden 100 µl alındı ve steril ependorflara aktarıldı. Agaroz ile karıştırıldığında hemen katılaşmaması için ependorflar 37°C'ye ayarlanmış olan benmariye yerleştirildi. TE buffer'dan (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 25 ml alındı ve erlenmeye aktarıldı. Low melting agaroz'dan 0.5 gr tartıldı ve erlene ilave edildi. Mikrodalgada kısa sürelerle ısıtılarak erimesi sağlandı. Eriyen agaroz 55°C'ye ayarlanmış olan kuru blok ısıtıcı üzerine alınarak hemen katılaşması önleildi. Falcon tüpünde %10'luk SDS hazırlandı, sıcak suda ısı 55-60°C civarına getirildi ve hazırlanan low melting agarozla 2.5 ml ilave edildi. Örnek sayısı kadar steril ependorf kuru blok ısıtıcıya dizildi ve erimiş halde olan low melting agarozdan 100 µl alınarak ilgili ependorflara aktarıldı. Benmarideki bakteri süspansiyonlarına 10 µl Proteinaz K (20mg/ml) eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bu karışımdan 100 µl alındı ve kuru blok ısıtıcıdaki ependorflara aktarıldı. Bakteri süspansiyonu ile agaroz pipet yardımıyla karıştırıldı. Her bir ependorf tüpünden 100 µl alınarak plug kalıbına aktarıldı ve 20 dakika süreyle +4°C'de katılaşması beklendi.

**Lizis Aşaması:** Örnek sayısına göre lizis buffer hazırlandı ve her örneğe 5 ml lizis buffer hesap edildi. Falcon tüpüne 0.05 M Tris, 0.05 M EDTA, pH 8.0 aktarıldı. Sarcosyl %10'luk hazırlandı, erimesi için benmaride (55° C) bekletildi ve final konsantrasyonu %1 olacak düzeyde falkonlara aktarıldı. Kalan hacim örnek sayısına göre steril saf su ile tamamlandı ve hazırlanan lizis buffer 5'er ml steril falkon tüplere dağıtıldı. Her bir tüpe 25 µl Proteinaz K (20mg/ml) ilave edildi. Katılaşan pluglar ilgili falkonlara parçalanmadan alındı. Falcon tüp içerisindeki örnekler 54°C ve 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcı benmaride bir gece lizise bırakıldı.

**Yıkama:** Örnekler benmariden alınarak 5 dakika +4°C'de bekletildi. Plug parçalanmadan falkon tüp içerisindeki buffer uzaklaştırıldı. Tüplere 10 ml ultra saf

su (55°C) ilave edildi, örnekler benmariye yerleştirildi ve çalkalama işlemine devam edildi. Yaklaşık 20 dakika beklendi ve ultra saf su ile yıkama işlemi tekrarlandı. Aynı yıkama işlemi bu defa TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, ph 8.0) ile 4 defa yapıldı. Pluglar toplamda 6 kez yıkanmış oldu. Yıkanan pluglar TE buffer'a alınarak +4°C'de saklandı.

**Restriksiyon:** Örnek sayısı kadar steril ependorf tüp hazırlandı ve spora dizildi. Enzimin tampon buffer'ı derin dondurucudan çıkarıldı ve erimesi beklendi. Steril başka bir tüpe örnek sayısına göre 179 µl Steril su + 20 µl buffer + 1 µl *SalI* enzimi hazırlandı ve ependorflara 200 µl taksim edildi. Lizis aşaması bitmiş olan pluglar steril bistüri ucu ile kesilerek ilgili ependorflara aktarıldı. Ependorflar benmari'de 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Jele yükleme öncesinde pluglar 200 µl 0.5x TBE'de oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.

**Elektroforez:** Pulsed Field sertitikalı agaroz 0.5x TBE buffer ile 100 ml hacimde %1'lik hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi. Isısı 50-55 °C civarında olan agaroz jel kalıbına döküldü ve pluglar yüklenmiş oldu. Jelin katılaşması için 30 dakika beklendi. Bu esnada cihazın parametreleri girildi ve elektroforez tankındaki tampon solüsyon olan 0.5x TBE soğutulmuş oldu. Örnekler 12°C'de, 4-40 switch süresi, 6v/cm voltajda 22 saat süreyle jelde yürütüldü (Biorad, CHEF DR III).

#### **2.9.4.Pasteurella PFGE Protokolü**

*P. multocida* izolatlarının PFGE ile tiplendirilmesi aşamasında Köndgen ve ark. (2011) belirttiği protokol kullanıldı.

**Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması:** Steril bir vida kapaklı şişede PBS hazırlandı (Sodyum klorid 8mg/ml, potasyum klorid 0.2 mg/ml, disodyum hidrojen fosfat 1.15 mg/ml, potasyum dihidrojen fosfat 0.2 mg/ml) ve pipetle steril falkon tüplere 2 ml hacimde PBS dağıtıldı. Eküvyon yardımıyla saf taze kültürden koloniler alınarak PBS ile homojen bir süspansiyon hazırlandı. Spektrofotometrik cihazda (Shimadzu UV-1800) 600 nm dalga boyunda ilk olarak PBS blank olarak okutuldu devamında

ise her bir kültürden hazırlanan örnekler sırası ile okutularak bakteri yoğunluğu 0.7 olarak ayarlandı. Steril ependorflara 1.5 ml bakteri süspansiyonu alındı ve 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pelet 250 µl PBS ile sulandırıldı.

**Plug Hazırlama:** PBS ile hazırlanan kültürlerden 100 µl alındı ve steril ependorflara aktarıldı. Agaroz ile karıştırıldığında hemen katılaşmaması için ependorflar 37°C'ye ayarlanmış olan benmariye kaldırıldı. TE buffer'dan (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 25 ml alındı ve erlenmayere aktarıldı. Low melting agaroz'dan 0.5 gr tartıldı ve erlene ilave edildi. Mikrodalgada kısa sürelerle ısıtılarak erimesi sağlandı. Eriyen agaroz 55°C'ye ayarlanmış olan kuru blok ısıtıcı üzerine alınarak hemen katılaşması önleildi. Örnek sayısı kadar steril ependorf kuru blok ısıtıcıya dizildi ve erimiş halde olan low melting agarozdan 100 µl alınarak ilgili ependorflara aktarıldı. Bu karışımdan 100 µl alındı ve kuru blok ısıtıcıdaki ependorflara aktarıldı. Bakteri süspansiyonundan 100 µl alındı ve pipet yardımıyla low melting agaroz ile karıştırıldı. Her bir ependorf tüpünden 100 µl alınarak plug kalıbına aktarıldı ve 20 dakika süreyle +4°C'de katılaşması beklendi.

**Lizis Aşaması:** Örnek sayısına göre lizis buffer hazırlandı ve her örneğe 5 ml lizis buffer hesap edildi. Falkon tüpüne 0.5 M EDTA (pH 9.0) aktarıldı. Sarcosyl %10'luk hazırlandı, erimesi için benmaride (55°C) bekletildi ve final konsantrasyonu %1 olacak düzeyde falkona aktarıldı. Hazırlanan lizis buffer steril falkon tüplere 5'er ml dağıtıldı. Her bir tüpe 125 µl Proteinaz K (20mg/ml) ilave edildi. Katılaştıran pluglar ilgili falkonlara parçalanmadan alındı. Falkon tüp içerisindeki örnekler 55°C ve 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcı benmaride bir gece lizise bırakıldı.

**Yıkama:** Örnekler benmariden alınarak 5 dakika +4°C'de bekletildi. Falkon tüp içerisindeki buffer plug parçalanmadan uzaklaştırıldı. Tüplere 10 ml ultra saf su (55°C) ilave edildi, örnekler benmariye yerleştirildi ve çalkalama işlemine devam edildi. Yaklaşık 20 dakika beklendi ve ultra saf su ile yıkama işlemi tekrarlandı. Aynı yıkama işlemi bu defa TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) ile 4 defa yapıldı. Pluglar toplamda 6 kez yıkanmış oldu. Yıkanan pluglar TE buffer'a alınarak +4°C'de saklandı.

**Restriksiyon:** Örnek sayısı kadar steril ependorf tüp hazırlandı ve spora dizildi. Enzimin tampon buffer'ı derin dondurucudan çıkarıldı ve erimesi beklendi. Steril

başka bir tüpe örnek sayısına göre 178 µl Steril su + 20 µl buffer + 2 µl *ApaI* enzimi hazırlandı ve ependorflara 200 µl taksim edildi. Lizis aşaması bitmiş olan pluglar steril bistüri ucu ile kesilerek ilgili ependorflara aktarıldı. Ependorflar benmari'ye alınarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi.

**Elektroforez:** Pulsed Field sertitikalı agaroz 0.5x TBE buffer ile 100 ml hacimde %1'lik hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi. Agaroz ısı 50-55°C civarında iken jel kalıbına döküldü ve pluglar yüklenmiş oldu. Jelin katılaşması için 30 dakika beklendi. Bu esnada cihazın parametreleri girildi ve elektroforez tankındaki tampon solüsyon olan 0.5x TBE soğutuldu. Örnekler 14°C'de, 1-25 switch süresi, 6v/cm voltajda 22 saat süreyle jelde yürütüldü (Biorad, CHEF DR III).

**PFGE Jelin Boyanması:** Çalışılan protokole göre 20-22 saatlik elektroforez aşaması sonrası öncelikle cihazın soğutucu ünitesi kapatıldı ve soğutma ünitesinde tampon solüsyonun donmaması için pompa yarım saat daha çalıştırılarak sirkülasyon sağlandı. Jel, altındaki siyah metal plaka ile beraber tampon solüsyondan (0.5x TBE) alındı. Boyama solüsyonu olan Etidyum bromid 500 ml hacimde distile su ile 10mg/ml konsantrasyonunda boyama kabında hazırlandı. Jel boyama solüsyonuna alındı ve yarım saat süre ile shaker'da (Heidolph, Duomax 1030) boyanması sağlandı. Jelin görüntülenmesi esnasında arka planda oluşacak parlamaları önlemek ve bantları netleştirmek amacıyla jel 3 kez yarım saat süre ile 500 ml hacimde distile su ile çalkalanarak yıkanması sağlandı. Jel görüntüleyiciye (Biorad, Gel Doc XR+) jel yerleştirildi, görüntüsü alındı ve çekilen fotoğraf jel analiz programlarında analiz edilmek üzere tiff formatında kayıt edildi.

## 2.10 İstatistiksel Analiz

Sığır akciğerlerinden elde edilen etken pozitiflik oranlarının karşılaştırılmasında  $\chi^2$  testi kullanıldı. Analizler SPSS 26.0 programında yapıldı.

### 3. BULGULAR

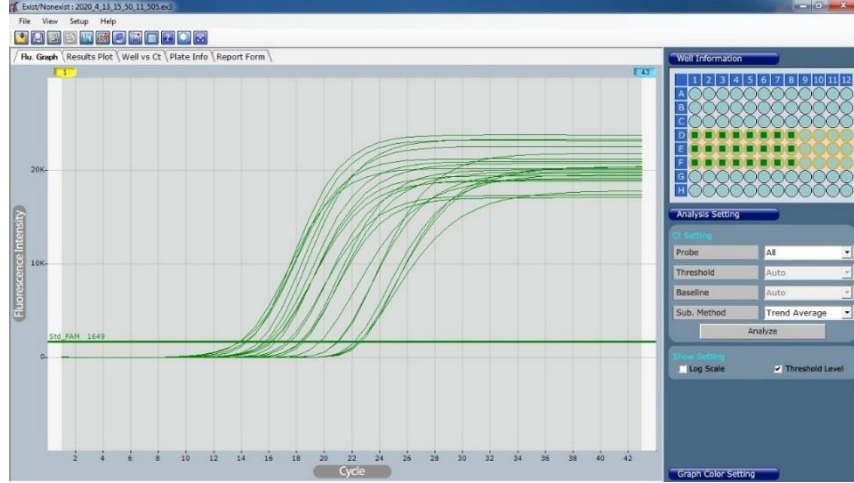
#### 3.1 Biyokimyasal Test Bulguları

Gram negatif izolatlar Vitek 2 (Biomerieux) cihazı ile incelendiğinde 9 adet *P. multocida* ve 8 adet *M. haemolytica* suşu tanımlandı.

Mikoplazma kültürleri ise film/spot oluşumu, glikoz ve arjinin hidrolizi parametlerine göre değerlendirildiğinde 22 adet saf mikoplazma suşunun tamamında stereomikroskopta agar yüzeyinde film/spot oluşumu gözlemlendi, glikoz ve arjinin hidroliz testlerinin ise negatif olduğu tespit edildi.

#### 3.2 Real Time PZR Bulguları

Ekstraksiyon sonrasında ilgili örnekler tür spesifik primer / prob kombinasyonu ile qPZR'da incelendiğinde 9 adet *P. multocida* ve 8 adet *M. haemolytica* suşlarının tümünde amplifikasyon eğrileri gözlemlendi. Ayrıca 22 Mikoplazma suşu qPZR ile incelendiğinde izolatların hepsinin *M. bovis* olduğu saptandı (Şekil 3.1).

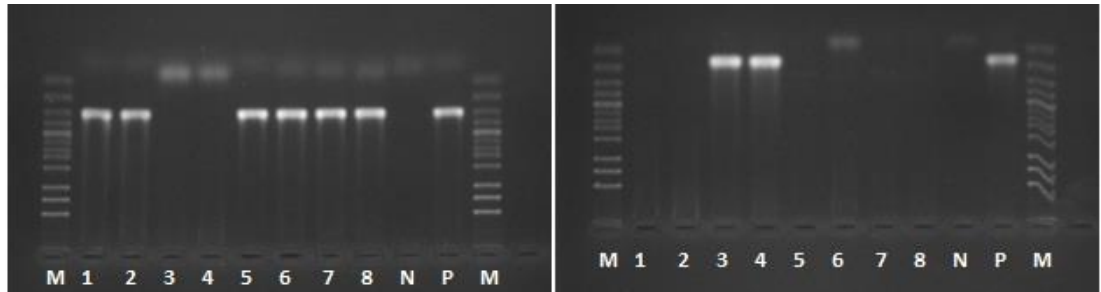


**Şekil3.1.** *M. bovis* izolatlarının Real Time PZR’da analiz edilmesi sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileri

### 3.3. Konvansiyonel PZR Bulguları

#### 3.3.1. *M. haemolytica* Serotip Bulguları

*M. haemolytica* olduğu belirlenen 8 izolatın PZR ile serotip incelemesi yapıldığında suşların 6’sının serotip 1 ve 2’sinin serotip 2 olduğu tespit edildi (Şekil 3.2).

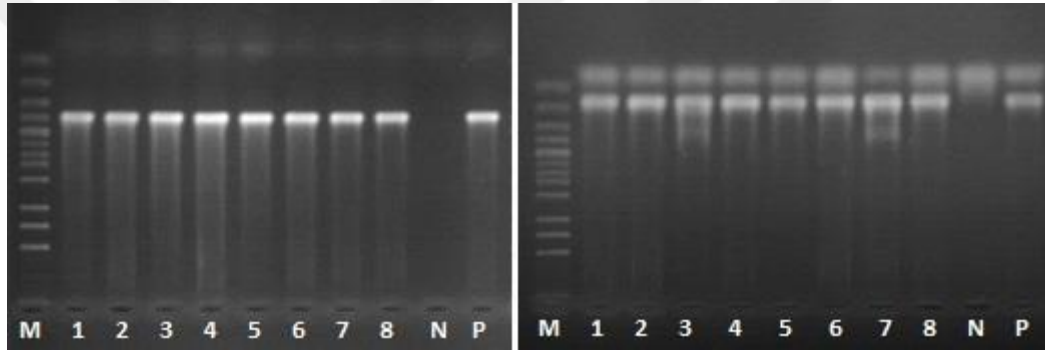


**Şekil 3.2.** *M. haemolytica* serotip 1 (306 bp) ve 2 (160 bp) spesifik genlerin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-8: *M. haemolytica* saha

suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*M. haemolytica* ATCC 33396 ve ATCC 10609)

### 3.3.2.*M. haemolytica* Virülens Gen Bulguları

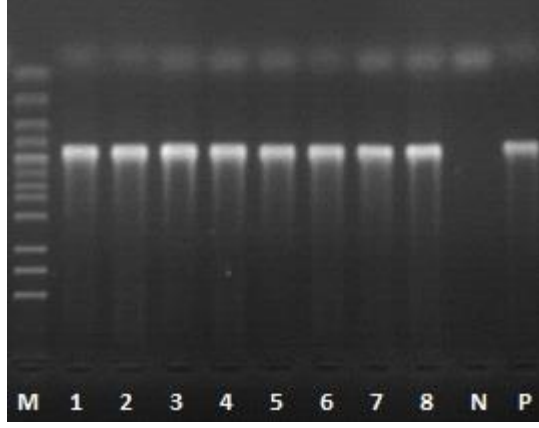
*M. haemolytica* izolatlarında *gcp* ve *adH* virülens genleri izolatların hepsinde tespit edildi (Şekil 3.3)



**Şekil 3.3.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *gcp* (426 bp) ve *adH* (150 bp) virülens genlerinin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-8: *M. haemolytica* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*M. haemolytica* ATCC 33396, DSM 10531)

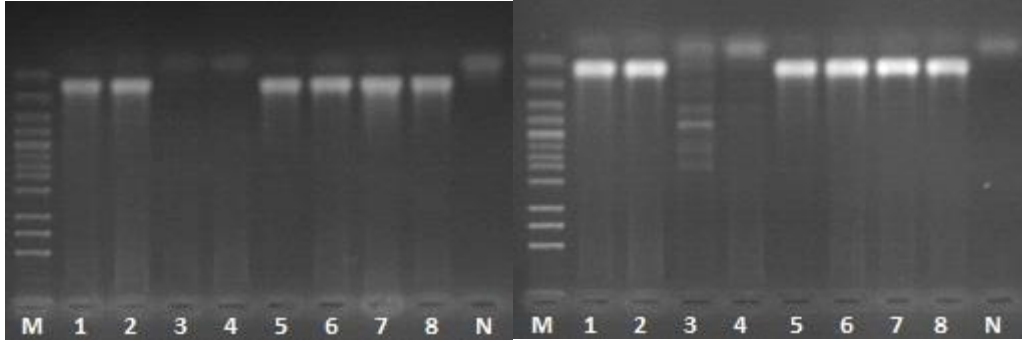
*M. haemolytica* izolatlarında *lktC* virülens geni izolatların hepsinde tespit edildi (Şekil 3.4)





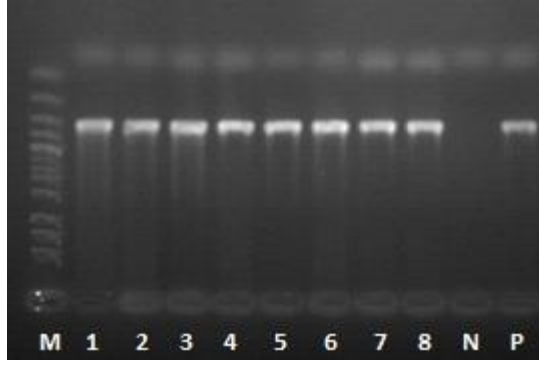
**Şekil3.4.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *lktC* (440 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-8: *M. haemolytica* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*M. haemolytica* ATCC 33396, DSM 10531)

*M. haemolytica* izolatlarında *tbp* ve *nma* virülensgenleri izolatların 6'sında tespit edildi (Şekil 3.5)



**Şekil3.5.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *tbp* (137 bp) ve *nma* (129 bp) virülens genlerinin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-8: *M. haemolytica* saha suşları, N: Negatif kontrol

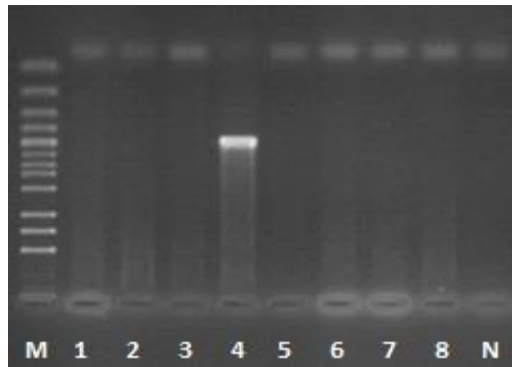
*M. haemolytica* izolatlarında *gs60* virülensgeni izolatların hepsinde tespit edildi (Şekil 3.6)



**Şekil3.6.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *gs60* (330 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-8: *M. haemolytica* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*M. haemolytica* ATCC 33396, DSM 10531)

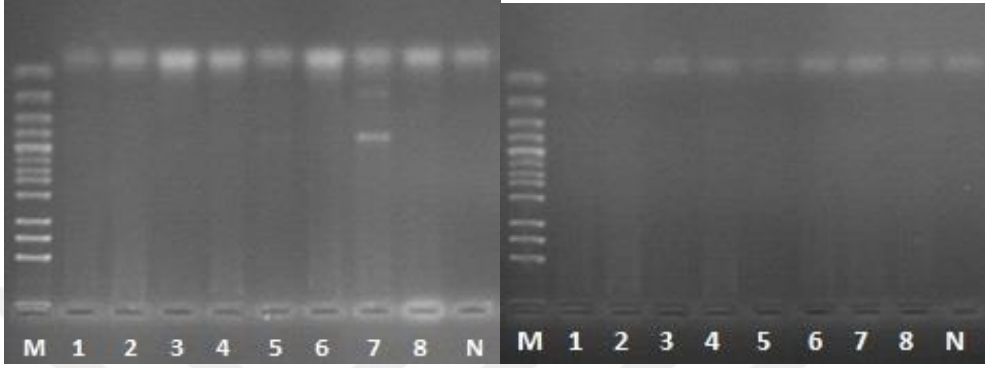
### 3.3.3. *M. haemolytica* Direnç Geni Bulguları

*M. haemolytica* izolatlarında *aphA-1* direnç geni izolatların 1'inde tespit edildi (Şekil 3.7)



**Şekil3.7.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *aphA-1* (489 bp) direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-8: *M. haemolytica* saha suşları, N: Negatif kontrol

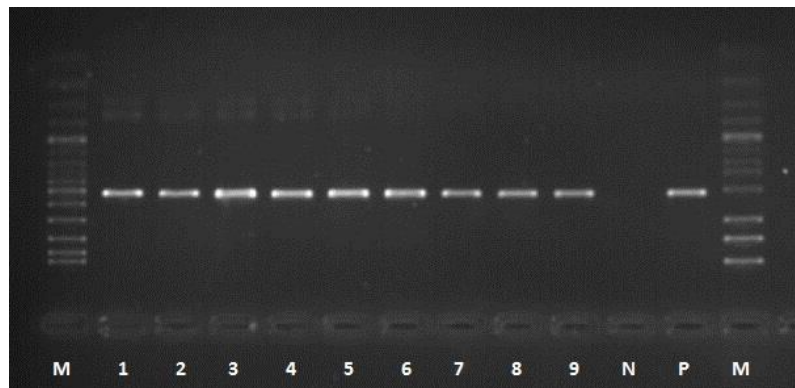
*M. haemolytica* izolatlarında *bla<sub>rob-1</sub>* ve *tet(H)* direnç genleri izolatlarda tespit edilemedi (Şekil 3.8)



**Şekil3.8.** *M. haemolytica* saha izolatlarında *bla<sub>rob-1</sub>* (685 bp) ve *tet(H)* (1076 bp) direnç genlerinin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-8: *M. haemolytica* saha suşları, N: Negatif kontrol

### 3.3.4.P. *multocida* Kapsül Gen Bulguları

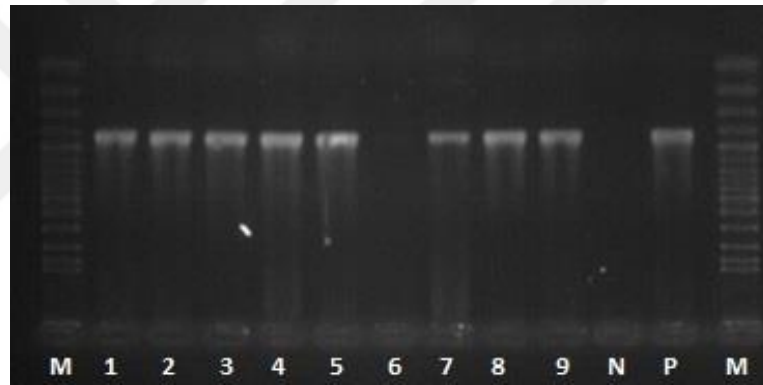
*P. multocida* olduğu belirlenen 9 adet izolatın PZR'da kapsül tipleri incelendiğinde suşların hepsinin A serotipinde olduğu tespit edildi (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** *P. multocida* saha izolatlarında *capA* (1044 bp) kapsül geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137)

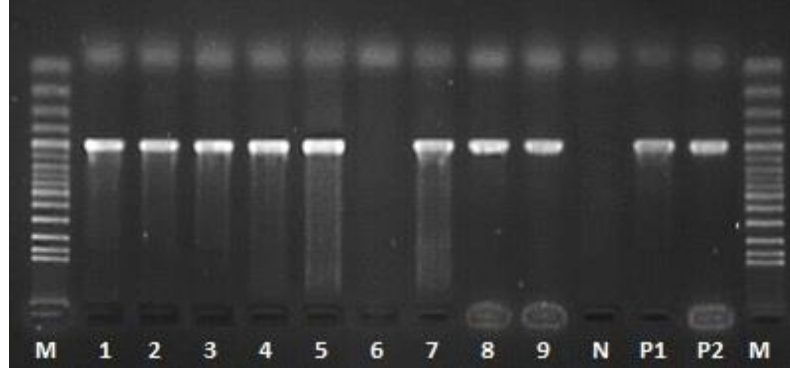
### 3.3.5. *P. multocida* Virülens Gen Bulguları

*P. multocida* izolatlarında *tadD* virülens geni izolatların 8'inde tespit edildi (Şekil 3.10)



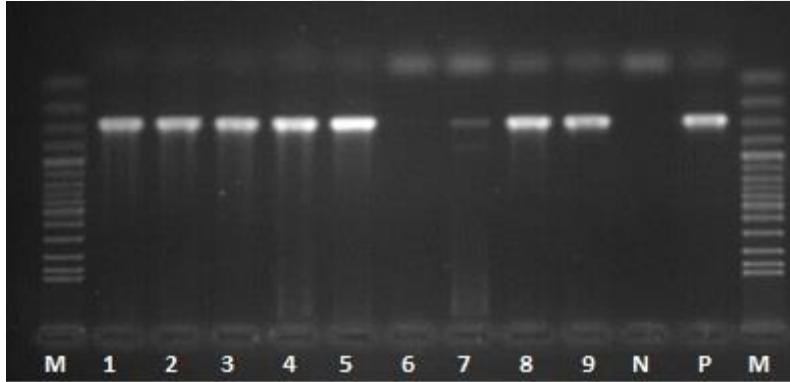
**Şekil3.10.** *P. multocida* saha izolatlarında *tadD* (416 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137)

*P. multocida* izolatlarında *ptfA* virülens geni izolatların 8'inde tespit edildi (Şekil 3.11)



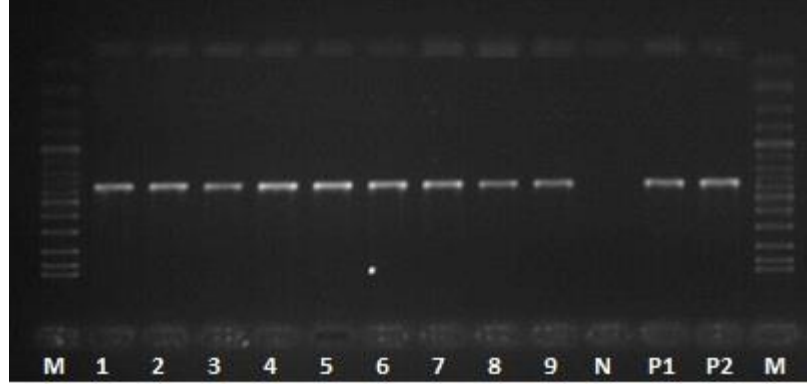
**Şekil 3.11.** *P. multocida* saha izolatlarında *ptfA* (488 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P1: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137), P2: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 12948)

*P. multocida* izolatlarında *pfha* virülens geni izolatların 8'inde tespit edildi (Şekil 3.12)



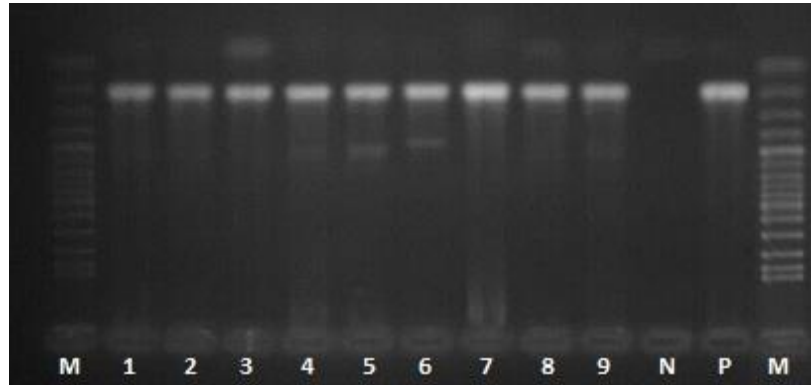
**Şekil3.12.** *P. multocida* saha izolatlarında *pfha* (286 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, 10: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137)

*P. multocida* izolatlarında *oma87* virülens geni izolatların hepsinde tespit edildi (Şekil 3.13)



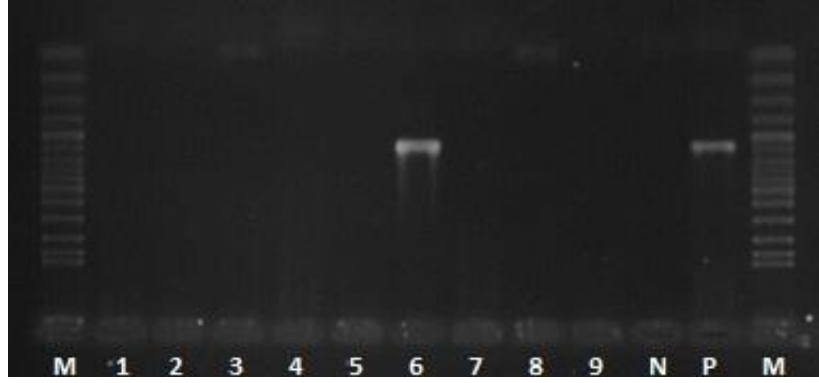
**Şekil 3.13.** *P. multocida* saha izolatlarında *oma87* (838 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P1: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137), P2: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 12948 )

*P. multocida* izolatlarında *ompA* virülens geni izolatların hepsinde tespit edildi (Şekil 3.14)



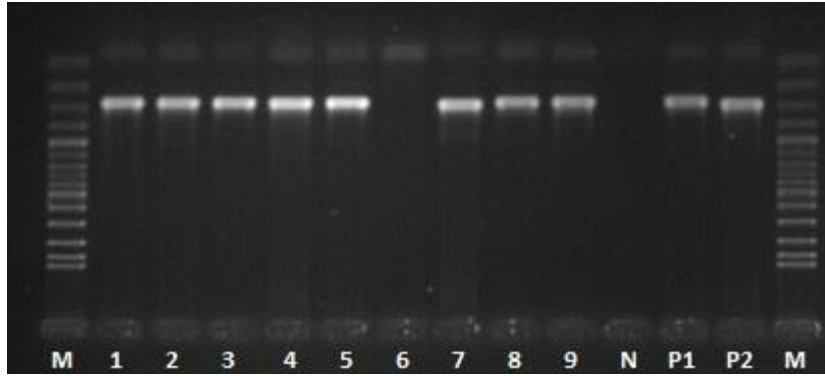
**Şekil 3.14.** *P. multocida* saha izolatlarında *ompA* (201 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137)

*P. multocida* izolatlarında *nanB* virülens geni izolatların 1'inde tespit edildi (Şekil 3.15)



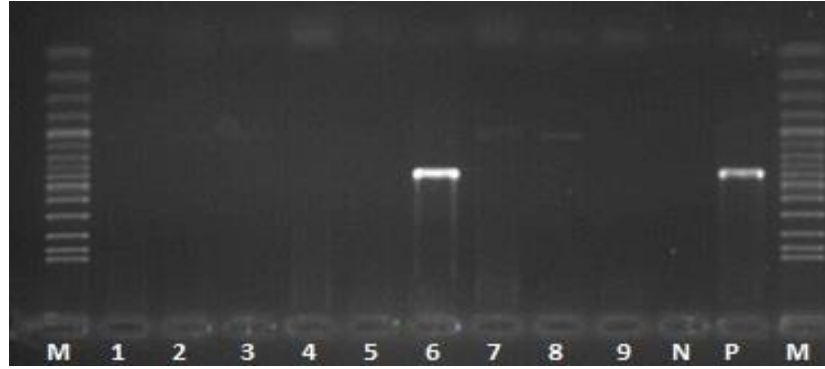
**Şekil 3.15.** *P. multocida* saha izolatlarında *nanB* (555 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137)

*P. multocida* izolatlarında *nanH* virülens geni izolatların 8'inde tespit edildi (Şekil 3.16)



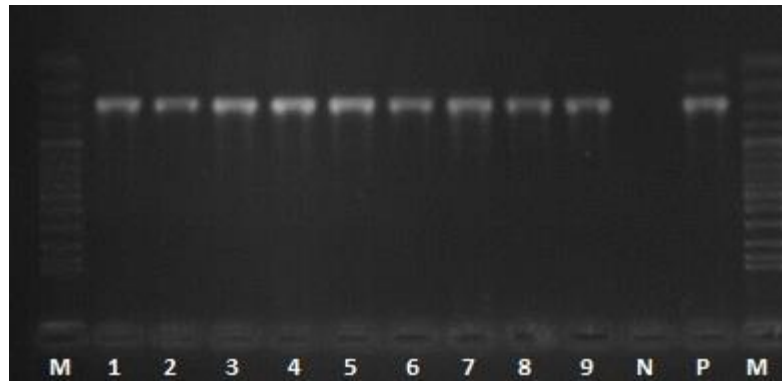
**Şekil3.16.** *P. multocida* saha izolatlarında *nanH* (287 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P1: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 12948), P2: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137)

*P. multocida* izolatlarında *toxA* virülens geni izolatların 1'inde tespit edildi (Şekil 3.17)



**Şekil 3.17.** *P. multocida* saha izolatlarında *toxA* (864 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 12948)

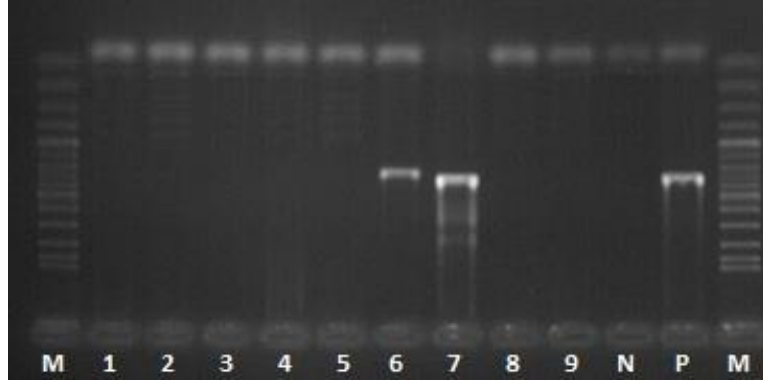
*P. multocida* izolatlarında *hgbA* virülens geni izolatların hepsinde tespit edildi (Şekil 3.18)



**Şekil3.18.** *P. multocida* saha izolatlarında *hgbA* (267 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137)

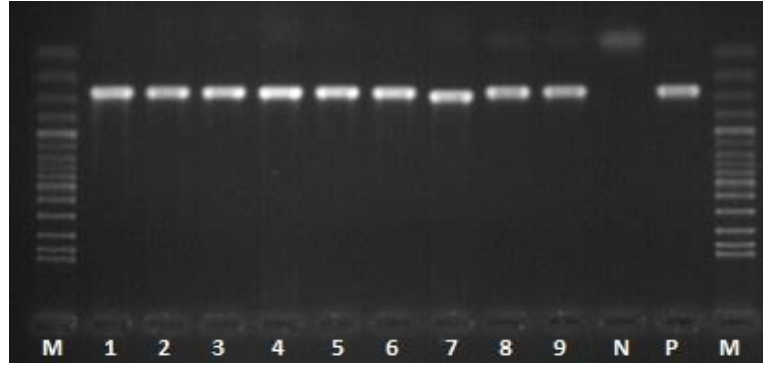
*P. multocida* izolatlarında *hgbB* virülens geni izolatların 2'sinde tespit edildi (Şekil 3.19)





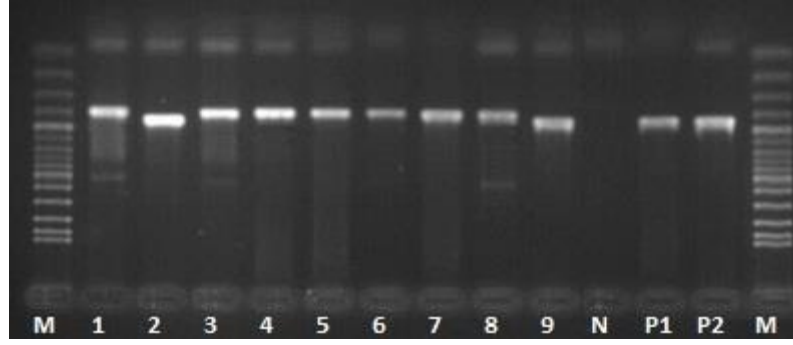
**Şekil 3.19.** *P. multocida* saha izolatlarında *hgbB* (788 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 12948)

*P. multocida* izolatlarında *tonB* virülens geni izolatların hepsinde tespit edildi (Şekil 3.20)



**Şekil3.20.** *P. multocida* saha izolatlarında *tonB* (261 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137)

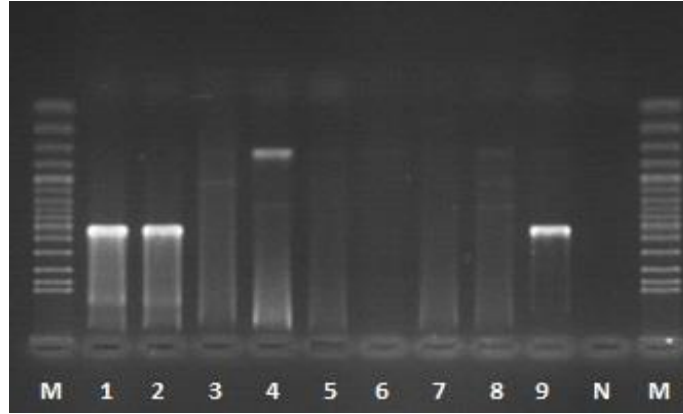
*P. multocida* izolatlarında *ompH* virülens geni izolatların hepsinde tespit edildi (Şekil 3.21)



**Şekil3.21.** *P. multocida* saha izolatlarında *ompH* (438 bp) virülens geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol, P1: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 43137), P2: Pozitif kontrol (*P. multocida* ATCC 12948)

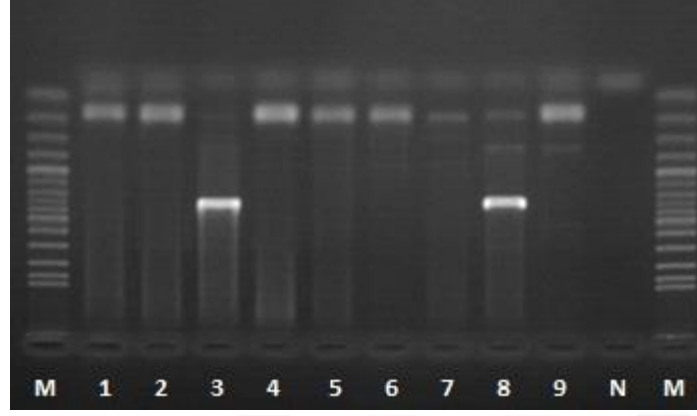
### 3.3.6. *P. multocida* Direnç Geni Bulguları

*P. multocida* izolatlarında *tetH* direnç geni izolatların 3'ünde tespit edildi (Şekil 3.22)



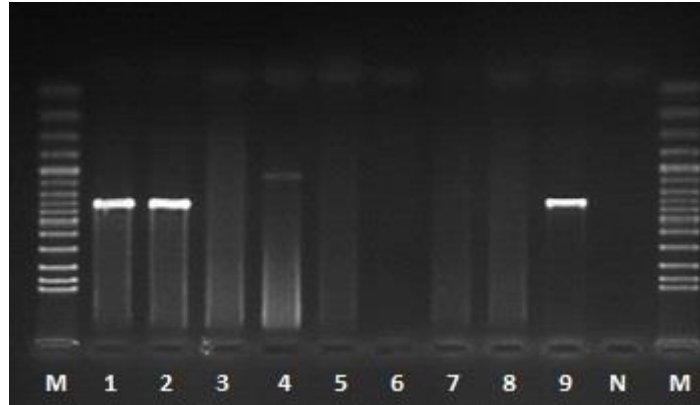
**Şekil3.22.** *P. multocida* saha izolatlarında *tetH* (1076 bp) direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol

*P. multocida* izolatlarında *tetB* direnç geni izolatların 2'sinde tespit edildi (Şekil 3.23)



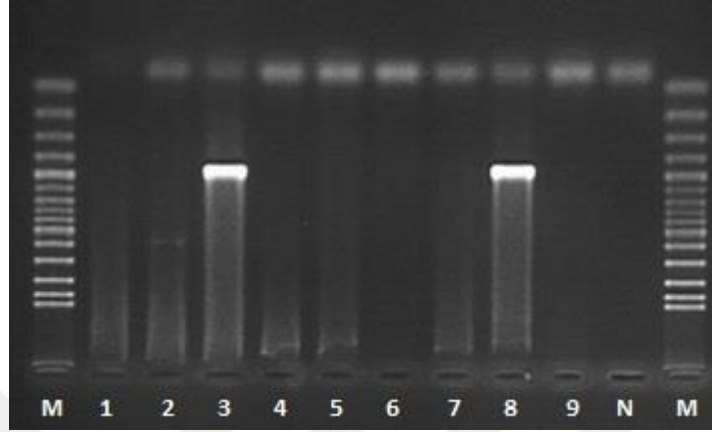
**Şekil3.23.** *P. multocida* saha izolatlarında *tetB* (774 bp) direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol

*P. multocida* izolatlarında *aphA1* direnç geni izolatların 3'ünde tespit edildi (Şekil 3.24)



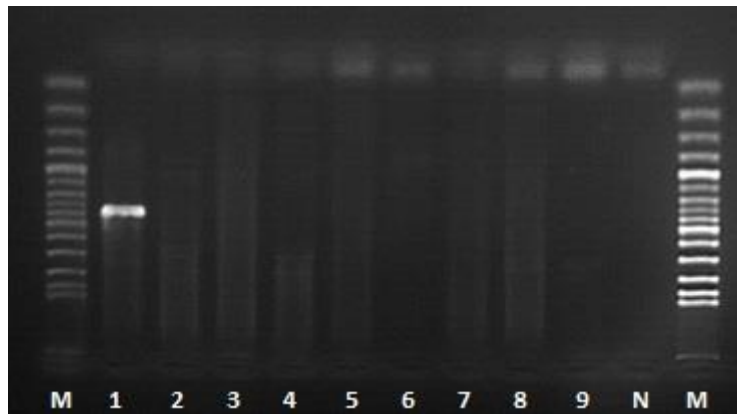
**Şekil3.24.** *P. multocida* saha izolatlarında *aphA1* (816 bp) direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol

*P. multocida* izolatlarında *cat3a* direnç geni izolatların 2'sinde tespit edildi (Şekil 3.25)



**Şekil3.25.** *P. multocida* saha izolatlarında *cat3a* (473 bp) direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol

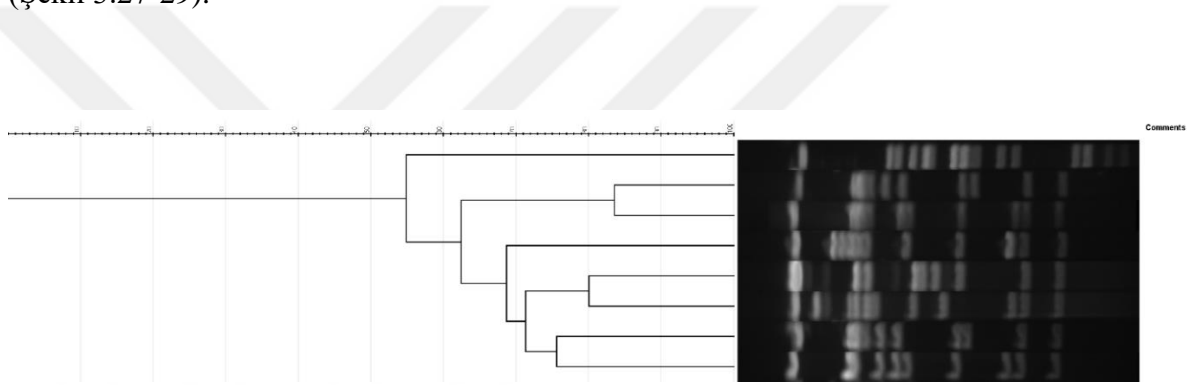
*P. multocida* izolatlarında *bla<sub>ROB-1</sub>* direnç geni izolatların 1'inde tespit edildi (Şekil 3.26)



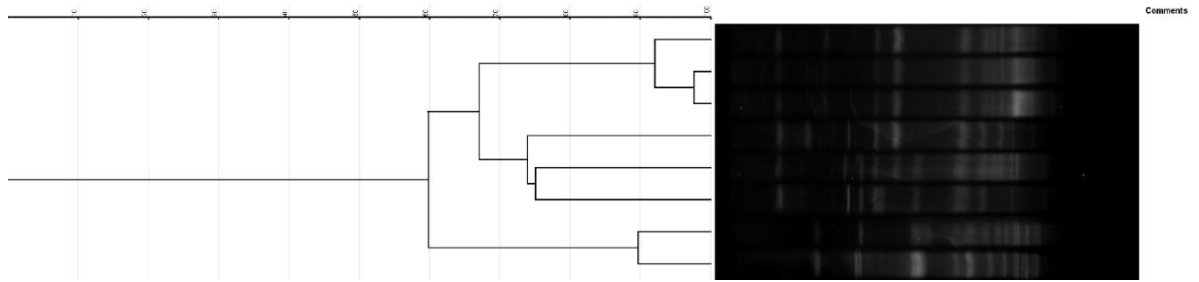
**Şekil3.26.** *P. multocida* saha izolatlarında *bla<sub>ROB-1</sub>* (852 bp) direnç geninin PZR amplifikasyonu sonrası agaroz jelde görüntüsü, M: Ladder, 1-9: *P. multocida* saha suşları, N: Negatif kontrol

### 3.4. PFGE Bulguları

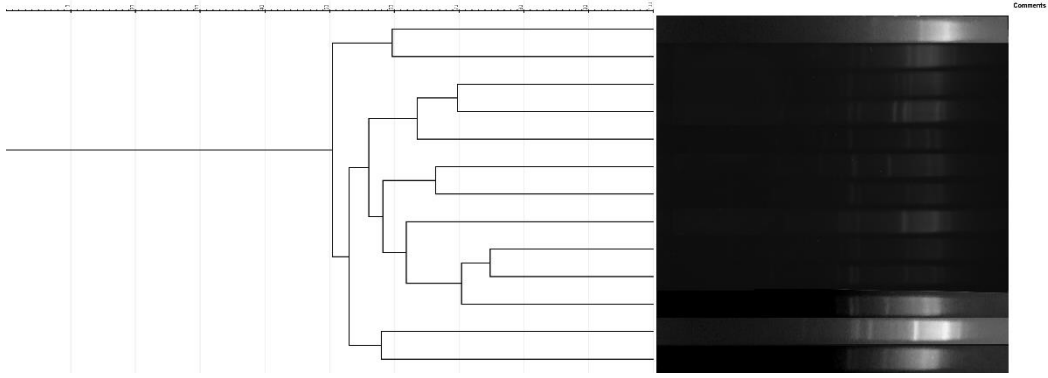
İzolatlar PFGE ile tiplendirildiğinde *P. multocida* izolatlarının sadece bir adedi tiplendirilemedi, tiplendirilen izolatlarda ise 8 pulsotip gözlemlendi, *M. haemolytica* izolatlarının ise 6 pulsotip, 1 küme, 5 özgün profil oluşturduğu saptandı, *M. bovis* izolatlarının ise DNAaz aktivitesi olduğundan dolayı 9'u tiplendirilemedi, tiplendirilen izolatlarda ise 8 pulsotip, 2 küme ve 6 özgün profil oluştuğu tespit edildi (Şekil 3.27-29).



Şekil3.27.*P. multocida* izolatlarının PFGE analiz ve dendrogram sonuçları



Şekil3.28.*M. haemolytica* izolatlarının PFGE analiz ve dendrogram sonuçları



Şekil 3.29. *M. bovis* izolatlarının PFGE analiz ve dendogram sonuçları

### 3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Test Bulguları

#### 3.5.1. *P. multocida* Antimikrobiyal Duyarlılık Bulguları

Çizelge 3.1. *P. multocida* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık bulguları

Etken madde	Duyarlı	Orta derecede duyarlı	Dirençli
Kanamisin (5µg)	2 (%22)	4	3 (%33)
Streptomisin (25µg)	2 (%22)	2 (%22)	5 (%55)
Kloramfenikol (30µg)	7 (%77)	-	2 (%22)
Siprofloksasin (10µg)	6 (%66)	3 (%33)	-
Trimetoprim/sülfametoksazol (25µg)	6 (%66)	-	3 (%33)
Tetrasiklin (30µg)	4 (%44)	-	5 (%55)
Spektinomisin (25µg)	8 (%88)	-	1 (%11)
Norfloksasin (10µg)	7 (%77)	2 (%22)	-
Enrofloksasin (5µg)	9 (%100)	-	-
Seftiofur (30µg)	9 (%100)	-	-
Doksisiklin (30µg)	7 (%77)	2 (%22)	-
Ampisilin (10µg)	8 (%88)	-	1 (%11)

*P. multocida* izolatlarının 3'ünde kanamisin, 5'inde streptomisin, 2'sinde kloramfenikol, 3'ünde trimetoprim/sülfametoksazol, 5'inde tetrasiklin, 1'inde spektinomisin ve 1'inde ampisilin direnci tespit edildi.

### 3.5.2.M. *haemolytica* Antimikrobiyal Duyarlılık Bulguları

Çizelge 3.2.M. *haemolytica* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık bulguları

Etken madde	Duyarlı	Orta derecede duyarlı	Dirençli
Amoksisilin/klavulanik asit (30µg)	8 (%100)	-	-
Oksitetrasiklin (30µg)	6 (%75)	-	2 (%25)
Tetrasiklin (30µg)	6 (%75)	-	2 (%25)
Trimetoprim/sülfametoksazol (25µg)	7 (%87)	1 (%12)	-
Enrofloksasin (5µg)	5 (%62)	3 (%37)	-
Penisillin (10µg)	6 (%75)	2 (%25)	-
Seftiofur (30µg)	8 (%100)	-	-
Ampisilin (10µg)	7 (%87)	1 (%12)	-
Spektinomisin (25µg)	8 (%100)	-	-
Gentamisin (30µg)	8 (%100)	-	-
Tilmikosin (15µg)	8 (%100)	-	-
Neomisin (30µg)	4 (%50)	3 (%37)	1 (%12)

*M. haemolytica* izolatlarının 2'sinde oksitetrasiklin, 2'sinde tetrasiklin ve 1'inde neomisin direnci tespit edildi.

### 3.5.3.M. *bovis* Antimikrobiyal Duyarlılık Bulguları

Çizelge 3.3.M. *bovis* izolatlarının MİK değerleri (µg/ml)

İzolat	Gentamisin	Danofloksasin	Oksitetrasiklin	Tilosin	Enrofloksasin
1	4	4	16	32	4
2	4	2	16	>32	4
3	8	2	8	>32	8
4	4	4	8	>32	4
5	8	2	8	>32	4
6	8	2	16	16	8
7	8	4	16	>32	8
8	8	4	32	>32	8
9	8	8	>32	>32	8
10	4	1	32	>32	1

11	8	4	32	>32	2
12	8	0.25	8	16	0.25
13	8	0.5	16	>32	0.5
14	4	1	16	>32	4
15	8	2	16	>32	8
16	8	1	16	>32	4
17	8	2	16	>32	4
18	4	1	8	>32	2
19	2	0.5	4	16	0.25
20	2	4	8	32	8
21	8	4	16	>32	4
22	8	8	16	>32	8
<b>Min.</b>	2	0.5	4	16	0.25
<b>Mak.</b>	8	8	32	32	8
<b>MİK50</b>	8	4	16	32	4

MİK değerlerinin yorumlanmasında <2 µg/ml duyarlı; >2 -<8 orta derecede duyarlı; >8 dirençli şeklinde kriterler baz alınarak değerlendirme yapılmıştır. İzolatlar MİK50 değerlerine göre değerlendirildiğinde belirtilen izolatların gentamisin, tilosin ve oksitetrasiklin'e dirençli, enrofloksasin, danofloksasin'e ise orta derecede duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

### 3.6. Sekans Analizi Sonuçları

Virülens ve direnç amplikonlarına ait sekans sonuçları incelendiğinde Gen Bankası veritabanındaki veriler ile uyumlu olduğu tespit edildi.



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır solunum yolu hastalıkları ile ilgili çalışmalar 18'inci yüzyılda başlamıştır ve günümüzde halen devam etmektedir. Bu tez çalışmasında Sivas ilindeki sığırlara ait akciğer örneklerinden hedef bakteriyel etkenlerin izolasyonu sonrasında suşların antimikrobiyal duyarlılıkları fenotipik yöntemlerle incelenmiş, virulans ve direnç profilleri PZR ile belirlenmiş, pnömonik vakalarda ilgili bakteriyel etkenlerin rolü ortaya konmuştur. Ayrıca *M. haemolytica*, *P. multocida* ve *M. bovis* izolatları moleküler tiplendirmede altın standart kabul edilen PFGE ile tiplendirilerek suşların klonal ilişkisi açıklığa kavuşturulmuştur.

Veteriner araştırma merkezlerine gönderilen numuneler baz alınarak yapılan araştırmalarda *P. multocida* sığır solunum hastalıklarının İngiltere ve Galler'de %15'ini, İskoçya'da ise %10'unu oluşturmaktadır (Hotchkiss ve ark. 2010). Amerika'da Gagea ve ark. (2006) 54 adet kazeo nekrotik bronkopnömonili buzağı akciğerlerinden %35 oranında *P. multocida* izole ettiğini bildirmiştir. Kanada'da Timsit ve ark. (2017) solunum problemi olan 107 sığırdan aldıkları transtrakeal aspirat örneklerini kültüre ettiğinde %54.8, sağlıklı sığırlardan alınan 210 adet aspirat örneklerinde ise %25.2 oranında *P. multocida* izolasyonu yaptıklarını rapor etmişlerdir. Kuzey Amerika'da Klima ve ark. (2014) ölümlerle sonuçlanan 68 vakadan alınan nazofaringeal svab ve akciğer örneklerini kültür ile incelediğinde örneklerin 8'inde (%12) *P. multocida* tanımlanmış ancak PZR ile akciğer örnekleri incelendiğinde 9'unda (%13) *P. multocida* tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Kuzey İrlanda'da Bell ve ark. (2014) ölümlerle seyreden 150 sığır pnömoni vakasından temin edilen ve enstitüye gönderilen akciğer örneklerini kültüre ettiğinde örneklerin 31'inde *P. multocida* (%20.7) izolasyonu yaptığını bildirmiştir. Fas'ta Sebbar ve ark. (2018) ölümlerle sonuçlanan solunum sistemi vakalarından aldığı 12 adet sığır akciğeri örneklerinde 2 adet *P. multocida* (%17) izolatı PZR ile tanımladığını bildirmiştir. Rusya'da Nefedchenko ve ark. (2016) solunum sistemi problemi olan sığırlara ait 161 adet akciğer örneğinden 102 adet *P. multocida* (%63.3) izolasyonu yaptığını bildirmiştir. İran'da Khamesipour ve ark. (2014) sığırlara ait akciğer örneklerinden

svabla ekim yaparak kültür sonucunda 219 pnömonik akciğerden 25 (%11.4), 114 sağlıklı akciğerden ise 5 adet (%4.4) *P. multocida* izole ettiğini bildirmiştir. Etiyopya'da Abera ve ark. (2014) sığırlara ait 69 adet pnömonik akciğerden 3 adet *P. multocida* (%4.3) izolatu tanımladıklarını, 75 adet sağlıklı görünen akciğerlerden ise etken izolasyonu olmadığını rapor etmişlerdir. Doğu Azerbaycan'da Shayegh ve ark. (2010) sığırlara ait 27 pnömonik akciğer örneğinden 1 (%3.7) adet *P. multocida* kültürü yapabilmiş ve sonucu PZR ile teyit etmiştir.

Ülkemizdeki sığırlardan *P. multocida* izolasyonu ile ilgili çalışmalarda Şeker ve ark. (2009) sağlıklı sığırların burun boşluğundan %11.4, hasta sığırların burun boşluğundan ise %40 oranında, Erbaş ve ark. (2008) İzmir ve Aydın illerine ait mezbahalardan topladığı 570 adet intratracheal svab örneklerinden %4.54 oranında, Kılıç ve ark. (2004) Elazığ'da pnömonili 500 sığır akciğeri üzerine yapılan bir çalışmada %6 oranında, Önat ve ark. (2010) Bursa'da sığırlardan aldıkları burun svablarından %54 oranında etken izolasyonu bildirmişlerdir. Kale ve ark. (2013) Burdur'da solunum sistemi problemi olan 56 sığıra ait akciğer ve kan örneklerini incelediğinde %1.79 düzeyinde *Pasteurella* spp. izole ettiğini rapor etmişlerdir. Ülker ve ark. (2012), Hatay'da mezbahadan aldıkları 122 sığır akciğerinin sadece 3'ünden (%2.45) *P. multocida* izole ettiğini ancak örneklerin hiç birinden *M. haemolytica* tespit edemediklerini rapor etmişlerdir. Özdemir ve ark. (2019) Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen ve histopatolojik inceleme sonucunda pnömonik olduğu tespit edilen sığırlara ait 20 akut pnömonik akciğer örneğinde kültür sonucunda 5 adet *P. multocida* (%25), 23 kronik pnömonik akciğer örneğinde ise 3 adet *P. multocida* (%13) izolatını Vitek 2 cihazı ile biyokimyasal profillerine göre tanımlamıştır. Gülaydın ve ark. (2018) Van'da mezbahadan alınan 222 adet sağlıklı akciğerlere ait trakebronşiyal svaplardan etkeni izole edememiştir, 7 adet solunum sistemi problemi olan sığırlardan aldığı trakebronşiyal svapların hepsinden etkeni izole etmiştir, ayrıca kliniğe solunum sistemi problemi şikayeti ile gelen 52 sığırdan aldığı nazofaringeal svap örneğinin 12'sinde etkeni saptadığını bildirmişlerdir.

Amerika'da Gagea ve ark. (2006) 54 adet kazeo nekrotik bronkopnömonili buzağı akciğerinden %35 oranında *M. haemolytica* izole edildiğini rapor etmiştir. Kanada'da Timsit ve ark. (2017) solunum sistemi problemi olan 107 sığırdan aldıkları

transtrakeal aspirat örneklerini kültüre ettiğinde %30.5, sağlıklı sığırlardan alınan 210 adet aspirat örneklerinde ise %13.1 *M. haemolytica* izolasyonu yaptıklarını rapor etmişlerdir. Kuzey Amerika'da Klima ve ark. (2014)ölümle sonuçlanan 68 vakadan alınan nazofaringeal svab ve akciğer örneklerini kültür ile incelediğinde örneklerin 55'inde (%81) etkeni izole etmiş ancak PZR ile incelendiğinde örneklerin 62'sinde (%91) *M. haemolytica* tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Kuzey İrlanda'da Bell ve ark. (2014) ölümle seyreden 150 sığır pnömoni vakasından temin edilen ve enstitüye gönderilen akciğer örneklerini kültüre ettiğinde örneklerin 33'ünde *M. haemolytica* (%22) izolasyonu yaptığını bildirmiştir. Fas'ta Sebbar ve ark. (2018) ölümle sonuçlanan solunum sistemi vakalarından aldığı 36 adet sığır akciğeri örneklerinde 4 adet *M. haemolytica* (%11.1) izolatı PZR ile tanımladığını rapor etmiştir. Rusya'da Nefedchenko ve ark. (2016) solunum sistemi problemi olan sığırlara ait 161 adet akciğer örneğinden 23 adet *M. haemolytica* (%14.3) izolasyonu yaptığını bildirmiştir. Amerika'da Lamm ve ark. (2012) solunum sistemi problemi sonucunda ölen sığırlara ait 40 adet bronkopnömonik akciğer örneğinin 17'sinde *M. haemolytica* (%42.5) izole ettiğini rapor etmiştir. Kanada'da Anholt ve ark. (2017) solunum sistemi problemi olan yada ölmüş sığırlara ait 480 adet akciğer örneğinden 213 adet *M. haemolytica* (%44.4) izolatı tanımladığını bildirmiştir. Amerika'da Fulton ve ark. (2009) solunum sistemi problemi neticesinde ölüm şekillenen 237 buzağı vakasına ait akciğer örneklerini incelediğinde *M. haemolytica* (%25.0) izolasyonu yaptıklarını bildirmişlerdir. Mısır'da Kaoud ve ark. (2010) sağlıklı ve solunum problemi olan sığırlardan alınan solunum sistemi örneklerinden konvansiyonel yöntemler kullanılarak sırasıyla %2.3 ve %8 oranında *M. haemolytica* izolasyonu rapor edilmiştir. Etiyopya'da Abera ve ark. (2014) sığırlara ait 69 adet pnömonik akciğerden 7 adet (%10.1) *M. haemolytica* izolatı tanımladıklarını, 75 adet sağlıklı görünen akciğerlerden ise etken izolasyonu olmadığını bildirmişlerdir.

Ülkemizde sığırlarda *M. haemolytica* izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda; Kılıç ve ark. (2004) Elazığ'da pnömonili 500 sığır akciğeri üzerinde yapılan bir çalışmada %1.8'inde, Şeker ve ark. (2009) Afyon'da 70 sağlıklı, 30 solunum problemlili sığırlardan alınan burun svablarında sırasıyla %14.3 ve %100'ünde, Önat ve ark. (2010) Bursa'da sığırlara ait burun svablarından %10.6'ında etken izolasyonu bildirmişlerdir. Özdemir ve ark. (2019)isePendik

Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen ve histopatolojik inceleme sonucunda pnömonik olduğu tespit edilen sığırlara ait 20 akut pnömonik akciğer örneğinde kültür sonucunda 2 adet *M. haemolytica* (%10), 23 kronik pnömonik akciğer örneğinde ise 9 adet *M. haemolytica* (%39) izolatını Vitek 2 cihazı ile biyokimyasal profillerine göre tanımlamıştır.

Avrupa'da *M. bovis*'in sığırlarda tüm solunum sistemi vakalarının %25 ile 33'ünden sorumlu olduğu belirtilmektedir (Gevaert2006). Son on yılda İngiltere ve Galler'de pnömonik akciğerlerden %40 oranında *M. bovis* izole edildiği bildirilmektedir (Nicholas2011). İrlanda'da Byrne ve ark. (2001) ölümle sonuçlanan pnömoni vakalarından alınan akciğer örneklerinde %18 oranında *M. bovis* izole edildiği rapor edilmiştir. Belçika'da Thomas ve ark. (2002) postmortem pnömoni vakalarından alınan akciğer örneklerinde %20, nükseden solunum problemi olan buzağılardan alınan bronko alveolar lavaj örneklerinden ise %35.5 oranında izole edildiği ancak makroskopik olarak sağlam görünen buzağılardan alınan lavaj örneklerinde etkenin izole edilemediğini bildirmiştir. Kuzey Amerika'da Klima ve ark. (2014) ölümle sonuçlanan 68 vakadan alınan nazofaringeal svab ve akciğer örneklerini PZR ile incelendiğinde 43'ünde (%63) *M. bovis* rapor etmişlerdir. Polonya'da Szacawa ve ark. (2016) solunum sistemi problemi olan 73 sığır işletmesinden aldığı 713 burun svabını kültür ve PZR ile incelediğinde 30 örnekte (%5.5) *M. bovis* saptadıklarını ifade etmişlerdir. Kuzey İrlanda'da Bell ve ark. (2014) ölümle seyreden 150 sığır pnömoni vakasından temin edilen ve enstitüye gönderilen akciğer örneklerini kültüre ettiğinde örneklerin 29'unda *M. bovis* (%19.3) izolasyonu yaptığını bildirmiştir. Amerika'da Lamm ve ark. (2012) solunum sistemi problemi sonucunda ölen sığırlara ait 40 adet bronkopnömonik akciğer örneğinin 25'inde *M. bovis* (%74) izole ettiğini rapor etmiştir. Kanada'da Anholt ve ark. (2017) solunum sistemi problemi olan yada ölmüş sığırlara ait 480 adet akciğer örneğinden 198 adet *M. bovis* (%41.3) izolatu tanımlamıştır.

Ülkemizde sığır solunum sistemi vakalarında *M. bovis*'in tespiti amacıyla çeşitli çalışmalar mevcuttur; Karahan ve ark. (2010) Doğu Anadolu'da üç farklı ilde 3 pnömonik sığır akciğerinin 3'ünde (%100) ve klinik hastalık belirtisi bulunan sürülerden alınan 51 adet svabın 12'sinde (%23.5) etken saptadıklarını, Özen ve ark. (2009) Kars'ta pnömonili 100 sığır akciğerinde ise 4 örnekte (%4) tespit ettiklerini,

Akan ve ark. (2014) yedi farklı coğrafik bölgedeki solunum problemi olan 6-12 aylık sığırlardan alınan 127 adet burun svabının 16'sında (%12.5) etkeni tespit ettiklerini, Sayın ve ark. (2016) yedi farklı coğrafik bölgedeki 21 süt sığırı işletmesinden alınan 95 adet akciğer örneğinin 30'unda (%30.5) ve 67 adet bronkoalveolar lavaj örneğinin 23'ünde (%34.3) etkeni izole ettiklerini, Özdemir ve ark. (2019)Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen ve histopatolojik inceleme sonucunda pnömonik olduğu tespit edilen sığırlara ait 20 akut pnömonik akciğer örneğinde kültür sonucunda 20 *M. bovis* (%100) izolatu tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, 200 adet pnömonik sığır akciğerinden 9 adet *P. multocida* (%4.5),8 adet *M. haemolytica* (%4) ve 22 adet *M. bovis* (%11) suşu izole edilmiştir, 400 adet sağlıklısığır akciğerinden ise bahsedilen etkenlerin izolasyonu sağlanamamıştır. Sığırlarda belirtilen solunum sistemi etkenlerine yönelik literatür verileri incelendiğinde %2.4 – 63.3 arasında *P. multocida*, %1.8 – 81 arasında *M. haemolytica* ve % 4– 74 arasında *M. bovis* izole edildiği anlaşılmaktadır.Literatürde daha yaygın olarak pnömoni vakalarından veya solunum sistemi problemi belirtisi olan hayvanlardan etken izolasyonu yapıldığı ve ölümlle sonuçlanan pnömonik vakalarda, nükseden solunum sistemi vakalarında etken izolasyon oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte daha az oranda da olsa sağlam akciğerlerden de sığır solunum sistemi etkenleri izolasyonu yapıldığı ifade edilmiştir. Sağlıklı bireylerin akciğerlerinden etken izolasyonu yapıldığı durumlarda etkenin hastalığın ilk safhalarında izole edilmesi ve klinik bulgu meydana gelmeden önce yapılan örneklemelerde izolasyon olabileceği literatürde belirtilmiştir. Ayrıca solunum sistemi vakalarındaki örnekleme metodu, toplam örnek sayısı, örnek alma ve ekim/izolasyon metoduna bağlı olarak çalışmalarda izolasyon farklılıkları olmasının muhtemel olabileceği düşünülmektedir. Etkenizolasyonundaki varyasyonun coğrafik dağılım, çevresel şartlar, stres faktörleri, örnek alınan sığırların immunolojik ve sağlık durumu, genetik dirence bağlı olarak farklı olabileceği bildirilmiştir (Awad ve ark. 2019). Ayrıca hayvanların yaşı ve cinsiyeti, çiftliğin hijyenik durumu, bakım ve beslemeye bağlı olarak ta etken izolasyon farklılığı olabileceği ifade edilmiştir (Kale ve ark. 2013).

Rusya'da Nefedchenko ve ark. (2016) solunum sistemi problemi olan sığırlara ait 161 adet akciğer örneğinden izole ettiği 102 adet *P. multocida* izolatını

PZR ile incelendiğinde 89'u serogrup A (%88.2), 12'si serogrupD (%10.8) ve 1'i serogrupF (%0.9) olduğunu rapor etmişlerdir. Japonya'da Katsuda ve ark. (2013) sağlıklı ve solunum sistemi problemlili buzağılardan aldıkları burun svablarından izole ettiği 378 adet *P. multocida* izolatında kapsül biyosentez genlerini PZR ile incelediğinde 354 izolatın A (%93.7) ve 24 izolatın D (%6.3) serogrubunda olduğunu bildirmiştir. İran'da Khamesipour ve ark. (2014) sığırlara ait akciğer örneklerinden izole ettiği 30 adet *P. multocida* suşunun serotiplerini araştırdığında pnömonik akciğer izolatlarında 18'i serogrupA (%72), 5'i serogrupD (%20), 2'si (%8) ise tiplendirilememiştir, sağlıklı akciğerler izolatlarında ise 5 izolatın serogrupA (%100) olduğu PZR ile tespit edilmiştir. İran'da Jamali ve ark. (2014) solunum sistemi problemi olan 169 buzağıya ait burun svabı örneklerinden izole ettiği 141 adet *P. multocida* suşunun 126'sını serogrupA (%89.4), 12'sini serogrupD (%8.5) ve 3'ünü serogrupB (%2.1) olarak PZR ile tespit ettiğini rapor etmiştir. İtalya'da Cucco ve ark. (2017) yapılan çalışmada solunum sistemi problemi olan sığırlardan izole edilen 36 adet *P. multocida* suşunu PZR ile incelediğinde hepsini serogrupA (%100) olarak tanımlamıştır. Almanya'da Ewers ve ark. (2006) sığırlara ait 91 izolatın da dahil olduğu farklı hayvan türlerine ait 289 *P. multocida* izolatını incelemiş ve sığır kökenli izolatların 84'ünü serogrupA (%92.3), 3'ünü serogrupD (%3.2), 2'sini serogrupF (%2.1) olarak belirlemiş, 2 izolatın tiplendirmede sonuç vermediğini bildirmiştir. Hindistan'da Kumar ve ark. (2009) sığır kökenli 38 adet *P. multocida* izolatının 2'sini serogrupA (%5.2), 36'sını ise serogrupB (%94.7) olarak PZR ile tespit etmişlerdir.

Ülkemizde *P. multocida* izolatlarının serotip tayininin yapıldığı çalışmalarda; Güler ve ark. (2013) Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen sığır kökenli örneklerden izole ettiği 36 adet *P. multocida* izolatın serotiplerini PZR ile incelediğinde 33 adet suşun A serogrup(%91.6) olduğunu belirlemiştir, diğer 3 suşun ise serogrubutespit edilememiştir. Van'da Gülaydın ve ark. (2018) sağlıklı ve solunum problemi olan sığırlardan aldığı svap örneklerinden izole ettiği 53 adet *P. multocida* suşunun serogruplarını PZR ile incelediğinde hepsinin serogrupA (%100) olduğunu tespit etmiştir. Erbaş ve ark. (2008) İzmir ve Aydın illerindeki sığırlardan aldıkları 570 adet intratrakeal svap örneklerinde izole ettiği 28 adet *P. multocida* suşunu hızlı aglütinasyon kiti ile incelediğinde suşların 15'i serogrupB (%53.6), 10'u

serogrupA (%35.7), 1'i serogrupD olarak tespit edilmiş ve 2 suşun (%7.2) ise tiplendirilemediğini rapor etmiştir.

Bu çalışmada *P. multocida* suşlarının tümünün serogrupA olduğu PZR ile tespit edilmiştir. Literatürde sığırların solunum sisteminden izole edilen *P. multocida* suşlarının büyük çoğunluğunun serogrupA olduğu veserogrupA'nın sığır konağına daha iyi adapte olduğu belirtilmiştir (Ewers ve ark. 2006). *P. multocida* izolatlarının serogrup bulguları literatür ile paralellik göstermektedir.

Kuzey Amerika'da Klima ve ark. (2014) ölümle sonuçlanan 68 vakadan alınan nazofaringeal svab ve akciğer örneklerinden izole ettiği 55 *M. haemolytica* suşunu hızlı pleyt aglütinasyon testi ile incelendiğinde izolatların 44'ünü serotip 1 (%65), 2'sini serotip 2 (%3) ve 9'unu serotip 6 (%13) olarak belirlemiştir. Fransa'da Timsit ve ark. (2013) solunum sistemi problemi olan sığırlardan aldığı burun ve trakeal svab örneklerinde *M. haemolytica* serotiplerini incelemiştir. Hızlı pleyt aglütinasyon testi ile 175 izolatın 48'i nin serotip 1 (%27), 12'sinin serotip 2 (%6.8) ve 115'inin serotip 6 (%65) olduğunu belirlemiştir. Kanada'da Klima ve ark. (2011) sığırlardan izole ettiği 411 adet *M. haemolytica* suşunun serotiplerini pleyt aglütinasyon testi ile incelediğinde 49'unu serotip 1 (%11.9), 306'sını serotip 2 (%74.5) ve 52'sini serotip 6 (%12.7) olarak rapor etmiştir. Kanada'da Klima ve ark. (2014) başka bir çalışmasında sığırların burunlarından izole edilen 90 adet *M. haemolytica* izolatına pleyt aglütinasyon testi ile serotip tayini yapıldığında izolatların 36'sı serotip 1 (%40), 41'i serotip 2 (%45.5) ve 13'ü serotip 6 (%14.4) olarak belirlenmiştir. Solunum sistemi problemi olan sığırlara ait izolatlarda serotip 1 (%70.7), serotip 2 (%9.7) ve serotip 3 (%19.5) belirtilen oranlarda tespit edildiğini bildirmişlerdir. Timsit ve ark. (2017) Kanada'da solunum sistemi semptomları olan sığırlardan izole ettiği 78 adet *M. haemolytica* izolatını hızlı pleyt aglütinasyon kiti ile incelendiğinde izolatların 62'si serotip 1 (%), 2'si serotip 2 (%), 7'si serotip 6 (%) olarak belirlenmiş ve 7'si ise tiplendirilememiştir. Angen ve ark. (2002) Danimarka'da sığırlardan izole ettiği 69 adet *M. haemolytica* izolatını indirekt hemaglütinasyon kiti ile incelediğinde izolatların 46'sı serotip 1 (%66.6), 4'ü serotip 2 (%5.7), 1'i serotip 7 (%1.4) ve 1'i serotip 9 (%1.4) olarak belirlenmiştir. Katsuda ve ark. (2008) Japonya'da yirmi yılda sığır pnömoni vakalarından aldığı örneklerden izole ettiği 202 *M. haemolytica* suşunda indirekt hemaglütinasyon testi ile serotip

incelemesi yaptığında suşların 102'si serotip A1 (%49.3), 47'si serotip A2 (%22.7) ve 42'si serotip A6 (%20.3) olduğunu rapor etmiştir. Lasheras ve ark. (2019) Avrupa'da 2011-2015 yılları arasında sığır solunum sistemi vakalarından dokuz klinik laboratuvara gelen örneklerden izole ettiği 98 adet *M. haemolytica* izolatının serotiplerini lam aglütinasyon testi ve PZR ile incelediğinde izolatlarda serotip 1 (%59), serotip 2 (%18) ve serotip 6 (%22) olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada incelenen *M. haemolytica* suşlarının 6'sının serotip 1 ve 2'sinin serotip 2 olduğu PZR ile tespit edilmiştir. Moleküler temelli serotiplendirme metodlarında tür veya serotip içerisindeki tüm genotipik değişimleri kapsayacak ve saha suşlarını da görece nitelikte primer tasarlayabilmek metodun kısıtlayıcı özelliği olabilmektedir. Bu sebeple PZR temelli tiplendirme metodunda her zaman *M. haemolytica* serotiplerini %100 güvenle tespit edebilmek mümkün olamamaktadır. Bu dezavantaj sensitivite düşüklüğü, çapraz reaksiyon verme potansiyeli olan serolojik temelli aglütinasyon testlerinde de karşımıza çıkmaktadır. Ancak fenotipik özelliklerin belirlenmesinde etkene ait genomun tespit edilmesi aglütinasyon testlerine göre daha stabil bir yöntem olması daha olasıdır (Klima ve ark. 2017). Literatürde sığır solunum sistemi vakalarında serotip 1, 2 ve 6'nın tespit edildiği anlaşılmaktadır. Sığır pnömoni vakalarında serotip 1'in en yaygın görülen serotip olduğu literatürde belirtilmiştir. Bu çalışmadaki veriler *M. haemolytica* suşlarının literatürdeki serotip bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Japonya'da Katsuda ve ark. (2013) sağlıklı ve solunum sistemi problemlili buzağılardan aldıkları burun svablarında 378 adet *P. multocida* izolatında virülens genleri PZR ile incelediğinde *psl* (%100), *ompH* (%100), *omp87* (%100), *ptfA* (%94.7), *fimA* (%100), *hsf-2* (%92.6), *pfhA* (%52.4), *tadD* (%88.9), *nanB* (%100), *nanH* (%88.4), *tonB* (%100), *tbpA* (%76.2), *hgbA* (%95.5), *hgbB* (%61.4), *sodA* (%100), *sodC* (%100), *HAS* (%92.6) genlerini tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Almanya'da Ewers ve ark. (2006) sığırlara ait 91 izolatın virülens genlerini PZR ile incelediğinde izolatlarda *psl* (%100), *ompH* (%100), *omp87* (%100), *ptfA* (%99), *pfhA* (%46.2), *nanB* (%100), *nanH* (%88.5), *toxA* (%5.8), *tbpA* (%70.2), *tonB* (%100), *hgbA* (%95.2), *hgbB* (%57.7), *sodA* (%100), *sodC* (%100) genlerini belirtilen oranda tespit ettiğini bildirmiştir.



İtalya'da Cucco ve ark. (2017) solunum sistemi problemi olan sığırlardan izole edilen 36 adet *P. multocida* suşunun virülens genlerini PZR ile incelediğinde *hgbB* (%5.1), *pfhA* (%2.6) ve *tbpA* (%5.1) oranında tespit etmiştir.

İran'da Khamesipour ve ark. (2014) sığırlara ait akciğer örneklerinden izole ettiği 30 adet *P. multocida* suşunun virülens genlerini PZR ile incelediğinde suşlarda *ptfA* (%80.0), *fimA* (%80.0), *hsf-1* (%60.0), *hsf-2* (%76.7), *pfhA* (%60.0), *tadD* (%40.0), *toxA* (%10.0), *exbB* (%83.3), *exbD* (%86.7), *tonB* (%83.3), *hgbA* (%86.7), *hgbB* (%93.3), *Fur* (%83.3), *nanB* (%83.3), *nanH* (%80.0), *pmHAS* (%33.3), *ompA* (%90.0), *ompH* (%86.7), *oma87* (%90.0), *plpB* (%83.3), *sodA* (%83.3), *sodC* (%86.7), *tbpA* (%66.7) oranında tespit edildiğini rapor etmiştir.

İran'da Jamali ve ark. (2014) çalışmasında solunum sistemi problemi olan 169 buzağıya ait burun svabı örneklerinden izole ettiği 141 adet *P. multocida* suşunun virülens genlerini PZR ile incelendiğinde *psl* (%100), *ompH* (%100), *oma87* (%100), *fimA* (%100), *hsf-2* (%98.6), *pfhA* (%81.6), *ptfA* (%100), *nanB* (%100), *nanH* (%100) ve *tadD* (%81.6) genleri belirtilen oranda izolatlarda tespit edilmiştir.

Hindistan'da Verma ve ark. (2013) sığırlardan izole ettiği 23 adet saha izolatında virülens genlerini PZR ile araştırdığında *tbpA* (%100), *pfhA* (%100), *hgbA* (%100), *hgbB* (%26.09), *toxA* (%0), *nanH* (%100), *nanB* (%0), *sodA* (%39.13), *sodC* (%91.30), *oma87* (%91.30) ve *ptfA* (%86.95) genlerini tespit etmiştir.

Bu çalışmada *P. multocida* izolatlarında virülens genleri PZR ile incelendiğinde *tadD* (%88.8), *ptfA* (%88.8), *pfhA* (%88.8), *oma87* (%100), *ompA* (%100), *nanB* (%11.1), *nanH* (%88.8), *toxA* (%11.1), *hgbA* (%100), *hgbB* (%22.2), *tonB* (%100) ve *ompH* (%100) oranında tespit edilmiştir. *toxA*, *nanB* ve *hgbB* virülens genleri az sayıda izolatta tespit edilse de literatür verilerinde *toxA* geninin %0-10, *nanB* geninin %0-100 ve *hgbB* geninin %5-93 aralığında olduğu göz önüne alındığında bulguların diğer çalışmalarla uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Belirtilen genlerin izolatlarda farklı sıklıklarda tespit edilmesi etkenin patojenitesindeki varyasyonlardan kaynaklandığı literatürde rapor edilmiştir (Aski ve ark. 2016). Bununla birlikte PZR ile hedef direnç genleri amplifikasyonuna bağlı olarak yapılan bu çalışmada hedef gendeki dizi polimorfizmine bağlı olarak primerin hedef bölgeye

bağlanamaması sonucunda yanlış negatif sonuç alabilme olasılığı da bulunmaktadır (Cucco ve ark. 2017).

Kanada’da Klima ve ark. (2014) sığırlara ait burun svablarından izole ettiği 90 adet *M. haemolytica* izolatında virülens genleri PZR ile araştırıldığında serotip 1 ve 6 izolatlarında lökotoksin C (*lktC*), putatif adezyon (*adh*), dış membran lipoproteini (*gs60*), sialoglikoproteaz (*gcp*), demir bağlayan protein B (*tbpB*) ve UDP-N-asetil-Dglukozamin- 2-epimeraz (*nmaA*) genlerinin sağlıklı veya hasta sığırlara ait izolatların hepsinde tespit edildiğini ancak serotip 2 izolatlarında sadece *lktC*, *ahs*, *gs60* ve *gcp* genlerinin tespit edildiğini rapor etmiştir.

İspanya’da Garcia-Alvarez ve ark. (2018) üç farklı bölgeye ait koyunlardan izole ettiği 121 adet *M. haemolytica* izolatında PZR ile virülens genleri incelediğinde *lktA*, *tbpA*, *tbpB* ve *tonB* genlerini izolatların hepsinde saptadığını, ancak diğer genleri ise *adh* (%97.5), *fhaC* (%94.2), *gcp* (%79.3) *hf* (%79.0), *irp* (%59.5), *lpsA* (%65.0), *nanH* (%99.2), *pilA* (%95.8), *plpD* (%95.8), *pomA* (%97.6), *sodA* (%91.7) ve *sodC* (%19.0) belirtilen oranda tespit ettiğini bildirmiştir.

Bu çalışmada *M. haemolytica* izolatlarında virülens genleri PZR ile incelendiğinde *gcp* (%100), *adH* (%100), *lktC* (%100), *tbp* (%75), *nma* (%75) ve *gs60* (%100) genleri belirtilen oranlarda tespit edilmiştir. *M. haemolytica* serotip 1 izolatlarında virülens genlerinin tamamı tespit edilmiştir ancak serotip 2 izolatlarında ise *tbp* ve *nma* genleri tespit edilememiştir, bulgular literatürle uyumluluk arz etmektedir. Virülens ile ilgili genlerin bireysel olarak tespit edilmesinin bir izolatın virulent olup olmadığını belirlemede yeterli olmayacağı ve *M. haemolytica* izolatlarında komensal ve potansiyel virulent ayrımında kullanılamayacağı literatürde ifade edilmiştir (Klima ve ark. 2014).

İtalya’da Cucco ve ark. (2017) çeşitli hayvan türlerinden izole edilen 186 adet *P. multocida* izolatına disk difüzyon testi uyguladığında amoksisilin – klavulanik asit (%0), ampisilin (%3.8), ceftiofur (%0), gentamisin (%1.6), enrofloksasin (%1.6), eritromisin (%9.7), tilosin (%51.1), tilmikosin (%1.6), florfenikol (%0), trimetoprim-sülfametoksazol (%4.8), tetrasiklin (%7.5) direnci bildirmişlerdir.

Almanya’da Michael ve ark. (2018) sığırlardan izole edilen 48 adet *P. multocida* izolatında broth dilüsyon metodu ile MİK değerleri belirlediğinde izolatlarda penisillin (%2.1), tetrasiklin (%10.4), gentamisin (%2.1), siprofloksasin (%6.3) direnci saptadıklarını rapor etmişlerdir.

İran’da Khamesipour ve ark. (2014) sığırlara ait akciğer örneklerinden svabla ekim yaparak kültür sonucunda pnömonik ve sağlıklı akciğerlerden izole ettiği 30 *P. multocida* izolatında amikasin (%33), linkomisin (%43.3), penisillin (%40), rifampin (%20), streptomisin (%16.7), amoksisilin (%10), eritromisin (%3.3) ve florfenikol (%16.7) direnci saptadıklarını ifade etmişlerdir.

Garch ve ark. (2016) Avrupa Birliği ülkelerinde 2002-2012 yılları arasında sığırların solunum sisteminden izole edilen (nazofaringeal veya ölü hayvan örnekleri) *P. multocida* izolatlarını broth dilüsyon testi ile incelediğinde 2002-2006 yıllarındaki 231 adet izolatta florfenikol (%0.4), spektinomisin (%3.5), tetrasiklin (%5.7), 2009-2012 yıllarında 134 adet izolatta ise enrofloksasin (%3), spektinomisin (%6) ve tetrasiklin (%11.2) direnci tespit ettiklerini, ayrıca bu süreçteki *P. multocida* izolatlarında enrofloksasin, spektinomisin ve tetrasiklin direncinin artış gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Hindistan’da Kumar ve ark. (2009) sığır kökenli 38 adet *P. multocida* izolatına disk difüzyon testi uygulanması sonucunda izolatlarda tetrasiklin (%15.7), doksisisiklin (%10.5), siprofloksasin (%15.7), norfloksasin (%18.4), enrofloksasin (%5.2), kanamisin (%68.4), kloramfenikol (%7.8), ampisillin (%26.3), eritromisin (%21), gentamisin (%36.8) direnci bildirmişlerdir.

İran’da Jamali ve ark. (2014) solunum sistemi problemi olan 169 buzağıya ait burun svabı örneklerinden izole edilen 141 adet *P. multocida* suşunda ampisillin (%9.2), oksitetrasiklin (%19.9), penisillin (%30.5), streptomisin (%22) ve tiamfenikol (%7.8) direnci bildirmişlerdir.

Fransa’da Clémence Bourély ve ark. (2019) altı yıl boyunca (2012-2017) solunum sistemi problemlili çeşitli hayvanlardan izole edilen 5356 *P. multocida* izolatında genel fenotipik direncin %20’nin altında olduğunu, antibiyotik etken maddelerine göre sığır izolatlarında amoksisilin (%2.3), gentamisin (%4.6),

tetrasiklin (%23.4), trimetoprim-sülfametoksazol (%6.2), florfenikol (%0.4), tilmikosin (%17.2), nalidiksik asit (%14.3) ve enrofloksasin (%4.5) direnci tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca bu beş yıllık süreçte tetrasiklin, tilmikosin, enrofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazol direncinin artma eğiliminde olduğunu ve sığır izolatlarında tetsasiklin, tilmikosin, flumequin ve enrofloksasin direncinin bu süreçte artış gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Amerika'da Welsh ve ark. (2004) 1994-2002 yılları arasında pnömoni tablosu olan 6-18 aylık besi sığırlarına ait akciğer örneklerini incelemiştir. İzolatlar Kirby Bauer Disk difüzyon metodu ile incelendiğinde 292 adet *P. multocida* izolatında ampisilin (%76-100) duyarlılığının değişken olduğunu ancak seftiofur (%96-100), enrofloksasin (%96-100) ve sefalotin (%96-100) duyarlılığında değişim olmadığını, eritromisin, florfenikol, spektinomisin, tetrasiklin, tilmikosin ve trimetoprim-sülfametoksazol duyarlılıklarında zamanla azalma eğilimi olduğunu rapor etmiştir.

Amerika ve Kanada'da Portis ve ark. (2012) 2000-2009 yılları arasındaki on yıllık süreçte yürütülen çalışmada seftiofur, penisillin, danofloksasin, enrofloksasin, florfenikol, tetrasiklin, tilmikosin ve tulathromisin etkenlerini sığır kökenli *P. multocida* izolatlarında test etmiştir. Test edilen 328 adet *P. multocida* izolatında penisillin (%3.3), florfenikol (%11.6), enrofloksasin (%2.1), tetrasiklin (%40.8), tilmikosin (%23.8) ve tulathromisin (%4.6) direnci rapor etmişlerdir.

Hindistan'da Choudhary ve ark. (2019) solunum sistemi problemi olan sığırlara ait 10 adet *P. multocida* suşunu MALDİ-TOFF ile tanımlamış ve bu suşlarda enrofloksasin (%10), sefaleksim (%100) ve kloksasilin (%100) direnci bildirmiştir.

Japonya'da Yoshimura ve ark. (2001) sığır kökenli 72 *P. multocida* izolatını agar dilüsyon testi ile incelediğinde kullanılan antimikrobiyal etkenlerin MİK değerlerine göre suşlarda streptomisin (%19.4), kanamisin (%1.4), oksitetrasiklin (%1.4), tilmikosin (%4.2), tiamfenikol (%0), enrofloksasin (%0) direnci rapor etmişlerdir.

Kanada'da Timsit ve ark. (2017) çalışmasında solunum problemi olan 107 sığırdan aldıkları transtrakeal aspirat ve sağlıklı sığırlardan alınan 210 adet aspirat

örneklerinden izole ettiği 135 adet *P. multocida* izolatında mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal ajanlar test edildiğinde oksitetrasiklin (%83), florfenikol (%14.1), tulathromisin (%79.3) direnci saptanmış ancak seftiofur, enrofloksasin ve penisillin direnci tespit edilememiştir.

Etiyopya’da Abera ve ark. (2014) sığırlara ait 69 adet pnömonik akciğerden izole ettiği 3 *P. multocida* suşunu disk difüzyon testi ile incelediğinde tüm suşların penisilin, eritromisin, kanamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, sefaleksim, polimiksin, florfenikol ve amoksisilin’e duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Kanada’da Anholt ve ark. (2017) yürütülen çalışmada solunum sistemi problemi olan yada ölmüş sığırlara ait 480 adet akciğer örneğinden kültüre ettiği 86 adet *P. multocida* izolatında gentamisin (%8.5), neomisin (%65.8), spektinomisin (%27.4), enrofloksasin (%0), danofloksasin (%1.7), tilosin (%99.1), tulathromisin (%29.9), tilmikosin (%41.9), seftiofur (%0.9), penisillin (%1.7), ampisillin (%1.8), klindamisin (%100), florfenikol (%1.7), oksitetrasiklin (%55.6), klortetrasiklin (%43.6) ve tiamulin (%86.3) direnci tespit ettiğini bildirmiştir

Japonya’da Katsuda ve ark. (2013) çalışmasında sağlıklı ve solunum sistemi problemlili buzağılardan aldıkları burun svablarından izole ettiği 378 adet *P. multocida* suşunun agar dilüsyon yöntemi ile 9 farklı antimikrobiyal etkene olan duyarlılığı araştırıldığında izolatlarda ampisilin (5.8), kanamisin (%9), oksitetrasiklin (%21.7), tiamfenikol (%13.2) fenotipik direnci saptadıklarını florfenikol, sefazolin, seftiofur, sefkuinom ve enrofloksasin direnci ise tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Oksitetrasiklin dirençli 82 izolatın 75’inde *tet(H)*, 4’ünde *tet(B)* geni, ampisilin dirençli 22 izolatın 16’sında *bla<sub>rob1</sub>* geni, tiamfenikol dirençli 50 izolatın 47’sinde *cat3a* geni, kanamisin dirençli izolatların tümünde ise *aphA1* geni PZR ile tespit edilmiştir.

Ülkemizde *P. multocida* izolatlarının direnç durumunun araştırıldığı çalışmalarda ise Erbaş ve ark. (2008) İzmir ve Aydın illerindeki sığırlardan aldıkları 570 adet intratrakeal svap örneklerinde izole ettiği 28 adet *P. multocida* suşunun % 93 florfenikol’e, % 61 enrofloksasin’e, % 54 oksitetrasiklin’e duyarlı olduğunu, suşların tümünün eritromisin ve trimetoprim-sülfametoksazol’e % 82, gentamisin’e

% 64 ve amoksisillin-klavulanik asid'e ise % 61 oranında dirençli olduğunu rapor etmiştir.

Özdemir ve ark. (2019) Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gelen sığırlara ait pnömonik akciğerlerden izole ettikleri 8 adet *P.multocida* izolatında disk difüzyon testi ile eritromisin ve tilosin (%100), trimetoprim-sülfametoksazol (%88), tetrasiklin ve tilmikosin (%75), tulathromisin ve enrofloksasin (%50) fenotipik direnç tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Güler ve ark. (2013) Konya'da Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen çeşitli hayvan türlerine ait örneklerden izole ettiği 50 adet *P. multocida* izolatını disk difüzyon testi ile incelediğinde suşların tümünün seftiofur, enrofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol ve florfenikol'e duyarlı olduğunu ancak suşlarda spektinomisin (%12), tilmikosin (%6), tetrasiklin (%12) ve eritromisin (%6) direnci bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *P.multocida* izolatları disk difüzyon testi ile incelendiğinde (Çizelge 3.1)izolatlarda kanamisin (%33), streptomisin (%55), kloramfenikol (%22), trimetoprim/sülfametoksazol (%33), tetrasiklin (%55), spektinomisin (%11) ve ampisilin (%11) fenotipik direnci tespit edilmiştir. Direnç genleri PZR ile incelendiğinde ise tetrasiklin dirençli 5 izolatın 3'ünde *tet(H)* geni, 2'sinde *tet(B)* saptanmış, kanamisin dirençli 3 izolatta *aphA1* geni, kloramfenikol dirençli 2 izolatta *cat3a* geni ve ampisilin dirençli 1 izolatta *bla<sub>rob1</sub>* geni tespit edilmiştir. Bu bulgular eşliğinde fenotipik direnç sonuçlarının genotip ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

Avrupa'daki dokuz klinik laboratuvarından temin edilen 98 adet *M. haemolytica* izolatını Lasheras ve ark. (2019) broth dilüsyon metodu ile incelediğinde MİK değerlerine göre izolatlarda enrofloksasin (%2), oksitetrasiklin (%17.3), penisillin (%22.4), tilmikosin (%16.3), tulathromisin (%13.3) direnci tespit ettiklerini, tüm izolatlarda ampisilin, klindamisin, klortetrasiklin, danofloksasin, gentamisin, neomycin, sülfadimetoksin, spektinomisin, trimetoprim/sülfametoksazol, tiamulin ve tilmikosin direncinin olmadığını bildirmişlerdir.

Avrupa Birliği ülkelerinde 2002-2012 yılları arasında sığırların solunum sisteminden izole edilen (nazofaringeal veya ölü hayvan örnekleri) *M. haemolytica*

izolatlarını Garch ve ark. (2016) broth dilüsyon testi ile incelediğinde 2002-2006 yıllarındaki 138 adet izolatta tetrasiklin (%14.6), tilmikosin (%1.4), 2009-2012 yıllarındaki 149 adet izolatta ise enrofloksasin (%0.7), tetrasiklin (%12.1) ve tilmikosin (%4) direnci tespit etmişlerdir.

Kanada'da Klima ve ark. (2014) sığırlara ait burun svablarından izole ettiği 90 adet *M. haemolytica* izolatını broth dilüsyon testi ile incelediğinde izolatlarda oksitetrasiklin (%18.2), neomisin (%14.8), ampisilin (%5.7), penisilin (%5.7) ve tilmikosin (%5.7) direnci saptamışlardır. İzolatların direnç genleri PZR ile incelendiğinde tetrasiklin dirençli izolatlarda *tetH* geni tespit edilmiş, *tetB* geni ise tespit edilememiştir, neomisin dirençli izolatlarda *aphA1* geni tespit edilmiş, ampisilin dirençli izolatlarda *bla<sub>ROB-1</sub>* geni tespit edilmiş, tilmikosin dirençli izolatlarda ise *erm(X)* ve *erm(42)* tespit edilememiştir.

Kanada'da Klima ve ark. (2011) nazofaringeal svablardan izole ettiği 409 *M. haemolytica* izolatını disk difüzyon metodu ile incelediğinde izolatların 16'sında oksitetrasiklin (%3.9), 10'unda tilmikosin (%2.44), 7'sinde amoksisilin/klavulanik asit (%1.71), 2'sinde oksitetrasiklin (%0.48) ve 1'inde tilmikosin (%0.24) direncini fenotipik olarak tespit etmişlerdir.

Japonya'da Katsuda ve ark. (2013) 2002-2010 yılları arasında pnömonik akciğerlerden izole ettikleri 310 *M. haemolytica* izolatında broth dilüsyon testi ile MİK değerleri incelendiğinde izolatlarda ampisilin (%20.3), amoksisilin (%14.5), dihidrostreptomisin (%43.5), kanamisin (%23.5), kolistin (%0), oksitetrasiklin (%24.8), doksisiklin (%21.9), kloramfenikol (%23.2), tiamfenikol (%23.9), florfenikol (%0.3), sefazolin (%0), seftiofur (%0), sefkuinom (%0), nalidiksik asit % (47.1), enrofloksasin (%18.7) ve danofloksasin (%18.7) direnci saptadıklarını ifade etmişlerdir.

Amerika ve Kanada'da Portis ve ark. (2012) 2000-2009 yılları arasındaki on yıllık süreçte yürütülen çalışmada seftiofur, penisillin, danofloksasin, enrofloksasin, florfenikol, tetrasiklin, tilmikosin ve tulathromisin etkenlerini sığır kökenli 304 adet *M. haemolytica* izolatlarında test etmiştir. Çalışma bulguları değerlendirildiğinde izolatlarda penisillin (%27.3), florfenikol (%8.6), enrofloksasin (%6.6), tetrasiklin (%43.7), tilmikosin (%27.3), tulathromisin (%8.9) direnci saptadıklarını ayrıca on

yıllık süreçte *M. haemolytica* izolatlarının duyarlılığında danofloksasin, florfenikol, tilmikosin ve tulathromisin'e azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Japonya'da Katsuda ve ark. (2009) solunum sistemi şikayeti olan sığırlardan izole edilen 229 *M. haemolytica* izolatının antimikrobiyal profilini MİK metodu ile incelediğinde izolatlarda sırasıyla ampisilin (%19.2), amoksisilin (%16.6), dihidrostreptomisin (%31.4), kanamisin (%11.4), kolistin (%0), oksitetrasiklin (%20.5), doksisisiklin (%18.3), kloramfenikol (%10.5), tiamfenicol (%10.9), sefazolin (%0), sephalotin (%0), nalidiksit acit (%17), enrofloksasin (%4.8) ve danofloksasin (%4.8) direnci tespit ettiklerini bildirmiştir.

Amerika'da Welsh ve ark. (2004) 1994-2002 yılları arasında pnömoni tablosu olan 6-18 aylık besi sığırlarına ait akciğer örneklerini incelemiştir. Kirby Bauer Disk difüzyon metodu ile antibiyogram testi yaptığında 390 adet *M. haemolytica* izolatında ampisilin (%42-82) ve tetrasiklin (%23-74) duyarlılıklarının oldukça değişken olduğunu ancak seftiofur (%96-100), tetrasiklin (%23-74) ve enrofloksasin (%89-98), enrofloksasin (%89-98), trimetoprim-sulfametoksazole (%90-99) duyarlılıklarının stabil olduğu, eritromisin, florfenikol, spektinomisin ve tilmikosin duyarlılığında ise önemli derecede azalma eğilimi olduğunu rapor etmiştir.

Almanya'da Michael ve ark. (2017) buzağılardan izole edilen 63 adet *M. haemolytica* suşunda penisillin (%11.1), florfenikol (%1.6), tetrasiklin (%22.2), tilmikosin (%1.6) direnci, yetişkin sığırlardan izole edilen 35 adet suşta ise penisillin (%8.8), tilmikosin (%2.9) ve tulathromisin (%2.9) direnci saptadıklarını bildirmişlerdir.

Kanada'da Anholt ve ark. (2017) tarafından yürütülen çalışmada solunum sistemi problemi olan yada ölmüş sığırlara ait 480 adet akciğer örneğinden kültüre ettiği 213 adet *M. haemolytica* izolatında gentamisin (%3.4), neomisin (%49.4), spektinomisin (%4.3), enrofloksasin (%3), danofloksasin(%3.9), tilosin (%99.1), tulathromisin (%37.8), tilmikosin (%44.2), seftiofur (%0.9), penisillin (%7.2), ampisillin (%5.1), klindamisin (%77.7), florfenikol (%4.3), oksitetrasiklin (%53.6), klortetrasiklin (%11.2) ve tiamulin (%19.7) direnci tespit ettiklerini ifade etmişlerdir.



Kanada'da Timsit ve ark. (2017) solunum problemi olan 107 sığırdan aldıkları transtrakeal aspirat ve sağlıklı sığırlardan alınan 210 adet aspirat örneklerinden izole ettiği 78 adet *M. haemolytica* izolatında mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal ajanlar test edildiğinde oksitetrasiklin (%74.4), tilmikosin (%79.5), tulathromisin (%71.8), penisillin (%2.6) direnci tespit edilmiş, ancak seftiofur, enrofloksasin ve florfenikol direnci saptanamamıştır.

Özdemir ve ark. (2019) Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne incelenmek üzere gelen pnömonik akciğerlerden izole ettikleri 11 adet *M. haemolytica* izolatını disk difüzyon testi ile incelediğinde izolatlarda eritromisin (%90), tilosin (%73), tetrasiklin (%64), trimetoprim-sülfametoksazol (%55), tilmikosin (%36), enrofloksasin (%18), marbofloksasin (%9), florfenikol (%9), ampisilin (%9) ve penisilin (%9) fenotipik direnci bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *M. haemolytica* izolatları disk difüzyon testi ile incelediğinde (Çizelge 3.2) izolatlarda oksitetrasiklin (%25), tetrasiklin (%25) ve neomisin (%12) fenotipik direnci tespit edilmiştir. Direnç genleri PZR ile incelendiğinde ise neomisin dirençli izolatta *aphA1* geni tespit edilmiş ancak izolatlarda *bla<sub>rob</sub>* ve *tet(H)* genleri tespit edilememiştir. Beklenen genotipik dirence yönelik direnç genlerinin tespit edilememesi durumunun belirtilen direnç geni varyasyonlarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Direnç genleri varyasyonlarını görebilecek farklı primerler ile direnç genotipleri PZR'da incelendiğinde bahsedilen direnç genlerinin tespit edilebilmesini mümkün kılmaktadır. Bu sebeple antimikrobiyal direnç fenotipi ile antimikrobiyal direnç geni arasında uyum sağlandığı düşünülmektedir. Literatürde solunum sistemi tedavisine cevap vermeyen ve ölümlerle sonuçlanan vakalardan izole edilen suşlarda sağlıklı veya tedavi öncesi vakalardan elde edilen izolatlara göre daha fazla oranda direnç tespit edildiği bildirilmektedir (McClary ve ark. 2011). Bu çalışma mezbahe materyalinde yapıldığından dolayı mezbahaya gelen hayvanların uzun süre solunum sistemi tedavisi gördüğüne dair veri bulunmamaktadır. Enstitülere ölümlerle sonuçlanan pnömonik vakalardan gelen örneklerde yine benzer şekilde çoklu dirençli izolatlarda direnç profilinin fazlaca olduğu literatürden anlaşılmaktadır. Ayrıca izolat sayısının sınırlı olmasından dolayı fenotipik direnç sonuçlarının izolat sayısı ve bölgelere göre farklı çıkmasının muhtemel olduğu düşünülmektedir.

CLSI ve EUCAST gibi referans kuruluşlar tarafından MİK değerlerinin standart olarak belirlenmemesi veya veteriner hekimliği açısından önemli Mikoplazma türlerinin antimikrobiyal duyarlılığını belirlemede standart metotların olmaması in vitro şartlarda antimikrobitale aktivite etkinliğini yorumlamada güçlük yaşanmasına neden olmaktadır. Sığırların diğer patojen etkenleri için belirlenen CLSI kriterlerinin kullanılması mikoplazmaların in vitro şartlarda duyarlılıklarını belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır (Rosenbusch ve ark. 2005). Mikoplazma etkenleri MİK değerleri veteriner hekimliğinde önemli patojenler için CLSI tarafından belirlenen MİK değerlerinden önemli ölçüde yüksek ise bu antibiyotik kullanımının etkili olmayacağı sonucunu göstermektedir (Ayling ve ark. 2000). Buna göre *M. bovis* suşlarında MİK değeri sonuçları değerlendirildiğinde CLSI tarafından diğer patojenler için duyarlı belirlenen kategoride yer alırsa eğer duyarlı kategorisinde yer alabileceği bildirilmiştir.

Macaristan'da Sulyok ve ark. (2014) 2010-2013 yılları arasında farklı bölgelerdeki sığırlardan alınan burun svabı ve akciğer örneklerinden izole edilen 35 adet *M. bovis* suşunda 11 antimikrobiyal ajanın etkinliğini MİK metodu ile araştırmıştır. Çalışma sonucunda danofloksasin, marbofloksasin ve enrofloksasin izolatlarına en etkili bulunmuştur (MİK<sub>90</sub> değerleri danofloksasin, enrofloksasin, marbofloksasin için sırasıyla 0.312 µg/ml, 0.312 µg/ml, 0.625 µg/ml). Mikoplazma enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın kullanılan tetrasiklin (MİK<sub>90</sub> 16 µg/ml), oksitetrasiklin (MİK<sub>90</sub> 64 µg/ml), tilosin (MİK<sub>90</sub> 128 µg/ml) ve tilmikosin (MİK<sub>90</sub> 128 µg/ml) değerlerinin yüksek olduğu ifade edilmiştir. Gentamisin, spektinomisin, florfenikol ve linkomisin MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 8 µg/ml, 256 µg/ml, 8 µg/ml, 64 µg/ml tespit edildiğinden bu antimikrobiyal etkenlerin çoğunun suşların üremesini inhibe edemediği ifade edilmiştir.

İngiltere'de Ayling ve ark. (2000) 62 adet *M. bovis* izolatında florokinolonlardan danofloksasin, geniş spektrumlu sentetik bir antimikrobiyal olan florfenikol, tetrasiklin grubundan oksitetrasiklin, aminosiklitol grubundan spektinomisin ve bir makrolid grubu üyesi tilmikosin etkinliğini araştırmıştır. *M. bovis* suşları broth dilüsyon metodu ile test edildiğinde danofloxacin'in izolatlarına en etkili olduğu (MİK aralığı 0.125-2 µg/ml), oksitetrasiklin ve spektinomisin'in ise sınırlı etkisi olduğunu, florfenikol, oksitetrasiklin, spektinomisin ve tilmikosin MİK<sub>90</sub>

değerlerinin 8µg/ml'nin üzerinde olduğu bildirmişlerdir. İzolatların %20'sinde spektinomisin, çoğunda ise tilmikosin direnci tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Belçika'da Thomas ve ark. (2003) nükseden solunum problemi olan sürülere ait sığırların solunum sisteminden izole edilen 40 adet *M. bovis* izolatında kinolonlardan danofloksasin, enrofloksasin ve marbofloksasin, pleromutilinlerden tiamulin, tetrasiklinlerden tetrasiklin ve oksitetrasiklin, makrolidlerden tilosin, aminoglikozidlerden gentamisin ve spektinomisin, linkozamidlerden linkomisin olmak üzere 10 etkenin etkinliğini araştırmıştır. Tiamulin'in en etkili antimikrobiyal etken olduğunu ancak sığırlarda kullanımının lisansı olmadığını, danofloksasin, marbofloksasin ve enrofloksasin'in suşlarda etkin olduğunu, suşların çoğunda tilosin, gentamisin ve spektinomisin, tetrasiklin ve oksitetrasiklin, linkomisin direncinin yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

Amerika'da Rosenbusch ve ark. (2005)beş farklı coğrafik bölgedeki sığırlardan izole edilen 233 adet *M. bovis* suşunda 9 farklı antimikrobiyal madde etkinliğini broth dilüsyon metodu ile (sensititre) değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda suşların enrofloksasin, florfenikol ve spektinomisin'e duyarlı, izolatların yarısından fazlasında oksitetrasiklin ve klortetrasiklin'in etkili olduğu ancak eritromisin, ampisilin ve seftiofur'un izolatlarda antimikrobiyal etkinlik göstermediği bildirilmiştir.

İsrail'de Gerchman ve ark. (2009) sığırlara air akciğer ve süt örneklerinden izole ettiği 17 adet *M. bovis* suşunda 12 antimikrobiyal etken maddenin etkinliğini broth dilüsyon ve E-Test metodu ile incelemiştir. Çalışma neticesinde suşların spektinomisin, enrofloksasin, danofloksasin'e duyarlı, gentamisin ve oksitetrasiklin'e orta derecede duyarlı ancak tilosin, tilmikosin, streptomisin'e dirençli olduğu bildirilmiştir.

Hollanda'da Heuvelink ve ark. (2016) sığırlara ait akciğer, süt ve eklem sıvısı örneklerini incelemiş ve sığır akciğerlerinden 56 adet *M. bovis* izolasyonu yapmıştır. Broth dilüsyon metodu ile suşların 6 farklı antimikrobiyale olan duyarlılığını incelediğinde çalışma neticesinde suşların enrofloksasin'e duyarlı, oksitetrasiklin'e orta derecede duyarlı, eritromisin (%100), tilmikosin (%95) , tulathromisin (%27) ve tilosin'e (%100) dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Japonya’da 87 sığıra ait süt örneklerinden izole edilen 30 *M. bovis* suşu üzerinde yapılan bir çalışmada pirlimisin, danofloksasin, enrofloksasin, kanamisin, oksitetrasikline, tilmikosin ve tilosin’in etkinliğini değerlendirilmiştir. İzolatlara pirlimisin, danofloksasin ve enrofloksasin’in etkili (MİK aralığı 0.25-0.5 µg/mL), kanamisin, oksitetrasiklin, tilmikosin ve tilosin MİK50 değerlerinin 32 µg/mL ve üzerinde olduğunu dolayısıyla bu antibiyotiklerin suşlara etkili olmadığı bildirilmiştir (Kawai ve ark. 2014).

Japonya’da yapılan başka bir çalışmada sığırlardan izole edilen 29 adet *M. bovis* suşunda 13 antimikrobiyal maddenin (kanamisin, spektinomisin, eritromisin, tilosin, tilmikosin, linkomisin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, kloramfenikol, tiamfenikol, flumekuın, enrofloksasin ve danofloksasin) etkinliğini araştırılmıştır. Suşların enrofloksasin ve danofloksasin’e duyarlı, linkomisin ve spektinomisin’e orta derecede duyarlı, makrolid (eritromisin, tilosin, tilmikosin) ve tetrasiklin (oksitetrasiklin, klortetrasiklin), tiamfenikol, flumekuın ve kanamisin’e dirençli olduğu rapor edilmiştir (Uemura ve ark. 2010)

Çin’de Kong ve ark.(2016) 8 eyalette besi sığırı işletmelerindeki solunum sistemi salgınlarından 32 adet *M. bovis* izolasyonu yaptığını, suşların doksisisiklin,siprofloksasin, enrofloksasin ve florfenikol’e duyarlı ancak eritromisin, tilmikosin, tilosin’e dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Fransa’daGautier ve ark. (2014)sığırlarda solunum sistemi salgını vakalarından izole ettiği 46 adet *M. bovis* suşunda 8 farklı antimikrobiyal madde etkinliğini agar dilüsyon metodu ile araştırmıştır. Suşların spektinomisin, tilmikosin, tulathromisin, tilosin, florfenikol ve oksitetrasiklin’e dirençli, enrofloksasin ve danofloksasin’e duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Amerika’da Soehlnen ve ark. (2011) sığır akciğerlerinden izole edilen 33 adet *M. bovis* suşunda 7 antimikrobiyal etken maddeyi kullanarak broth dilüsyon metodu ile incelendiğinde enrofloksasin, spektinomisin, seftiofur, eritromisin, tetrasiklin, oksitetrasiklin ve florfenikol’e sırasıyla %2.1, %58.3, %100, %100, %12.5, %22.4 ve %11.4 oranında direnç saptadıklarını, suşlara karşı en etkili antibiyotiklerin enrofloksasin, tetrasiklin ve florfenikol olduğunu bildirmişlerdir.

Fransa’da Francoz ve ark. (2005) sığırlara ait çeşitli örneklerden izole ettiği 58 *M. bovis* izolatında 6 farklı antibiyotik etkinliğini E-test metodu ile değerlendirdiğinde suşların enrofloksasin’e duyarlı olduğunu, eritromisin’e ise tüm suşların dirençli olduğunu, suşlarda tetrasiklin (%5), spektinomisin (%34), azitromisin (%34) ve klindamisin’e (%24) düzeyinde direnç saptadığını bildirmiştir.

Türkiye’de Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü’nde Mikoplazma Referans Laboratuvarı’na gelen akciğer örneklerinden izole edilen 20 adet *M. bovis* suşunda tilosin, tilmikosin, linkomisin, klindamisin, eritromisin, kloramfenikol, florfenikol, spektinomisin, oksitetrasiklin, danofloksasin, enrofloksasin, siprofloksasin, tulathromisin ve marbofloksasin etkinliğini broth dilüsyon metodu (sensititre) ile değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda suşların tilosin, tilmikosin, eritromisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve siprofloksasin’e dirençli (MİK<sub>50</sub> değerlerini 32 µg/ml’nin üzerinde), florfenikol, spektinomisin, danofloksasin, enrofloksasin ve marbofloksasin’e orta derecede duyarlı (MİK<sub>50</sub> değerleri 8 µg/ml), linkomisin, klindamisin ve tulathromisin’e duyarlı (MİK<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1, 0.25, 0.25 µg/ml) olduğu saptanmıştır. (Özdemir ve ark. 2019).

Yukarıda belirtilen çalışmalarda sonuçların farklı çıkmasının ana sebepleri olarak; belirlenen örnekleme planına göre seçilmeyen izolatlar, antimikrobiyal etkinlik belirleme metotlarının farklı olması, sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan kriterlerin farklı yorumlanmasına bağlı olduğu literatürde ifade edilmektedir (Anholt ve ark. 2017).

Bu çalışmanın bulgularına göre (Çizelge 3.3)*M. bovis* izolatlarının gentamisin, tilosin ve oksitetrasiklin’e dirençli, enrofloksasin ve danofloksasin’e orta derecede duyarlı olduğu tespit edilmiştir ve izolatlarda bazı antibiyotiklere karşı direnç kazanımı olduğu anlaşılmaktadır. Ancak ilacın enfeksiyon bölgesinde inhibitör konsantrasyona ulaşma kapasitesi, konakçının immun yanıtı ve diğer bakterilerin vakada bulunması gibi faktörler antibiyotiklerin in vivo etkinliğini belirleyen esas etmenlerdir.

Tilosin için sığır solunum sistemi patojenlerine yönelik CLSI onaylı MİK değeri belirlenmemiştir ancak saha tecrübelerinden de faydalanarak MİK<sub>50</sub> değerleri baz alındığında etken maddenin terapötik dozda etkili olamayacağı durumu olasıdır.

MİK değeri belirli bir etken maddenin spesifik bir patojene olan potensini ifade etmektedir ancak antimikrobiyal tedavi etkinliğinin göstergesi değildir. Farmakokinetik ve dinamik ilaç parametreleri, tedavinin başlangıç zamanı ve dozajı, konakçı özellikleri gibi faktörler tedavi etkinliğinde önemli rol oynayan parametrelerdir ve tedavi etkinliği değerlendirilirken dikkate alınmalıdır (Heuvelink ve ark. 2016).

Bu çalışmanın bulguları neticesinde *M. bovis* izolasyon oranının *P. multocida* ve *M. haemolytica* izolasyon oranlarına göre anlamlı olduğu ( $p<0.05$ ), *M. bovis* enfeksiyonu ile mücadele aşamasında sadece antibiyotiklerin yeterli olamayacağı, saha suşlarına etkili olabilecek aşuların uygulanması gerektiği, bulaşın azaltılmasına ve stres faktörlerinin minimize edilmesine önem verilmesi gerekliliği, ulusal bazda daha geniş kapsamlı projeler yapılarak izole edilen suşlara karşı etkili olabilecek aşuların geliştirilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Ayrıca direnç gelişimini önlemek amacıyla güncel antimikrobiyal kullanım politikalarına uyulması gerekliliği de tavsiye edilmektedir.

BRD vakalarında uygun antibiyotik seçme aşamasında veteriner hekimlere antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları rehber olma niteliğindedir, bu sebeple BRD etkenlerine yönelik direnç gelişimini önlemek amacıyla antibiyotik duyarlılık çalışmaları periyodik aralıklarla yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- AARTS HJ, BOUMEDINE KS, NESME X, CLOECKAERT A (2001) Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Veterinary Research*, 32, 363-380.
- ABERA D, SISAY T, BIRHANU T (2014) Isolation and identification of *Mannheimia* and *Pasteurella* species from pneumonic and apparently healthy cattle and their antibiogram susceptibility pattern in Bedelle district, Western Ethiopia. *African Journal of Bacteriology Research*, 6, 32-41.
- ACKERMANN MR, BROGDEN KA (2000) Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. *Microbes and Infection*, 2, 1079-1088.
- ADAMU J (2007) *Mannheimia haemolytica*: Phylogeny and genetic analysis of its major virulence factors. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 62, 6.
- ADEGBOYE D, HALBUR P, NUTSCH R, KADLEC R, ROSENBUSCH R (1996) *Mycoplasma bovis* associated pneumonia and arthritis complicated with pyogranulomatous tenosynovitis in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209, 647-649.
- AKAN M, BABACAN O, TORUN E, MÜŞTAK H, ÖNCEL T (2014) Diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle by ELISA and PCR. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20, 249-252.
- ALEXANDER TW, COOK SR, YANKE LJ, BOOKER CW, MORLEY PS, READ RR, GOW SP, MCALLISTER TA (2008) A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. *Veterinary Microbiology*, 130, 165-175.

- ALI HA-H, SAWADA T, HATAKEYAMA H, OHTSUKI N, ITOH O (2004) Characterization of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*, 100, 43-53.
- ALLEN J, VIEL L, BATEMAN K, ROSENDAL S, SHEWEN P (1992) Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves: Associations with pulmonary microbial flora. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56, 122.
- ANDRÉS-LASHERAS S, ZAHEER R, KLIMA C, SANDERSON H, POLO RO, MILANI MRM, VERTENTEN G, MCALLISTER TA (2019) Serotyping and antimicrobial resistance of *Mannheimia haemolytica* strains from European cattle with bovine respiratory disease. *Research in Veterinary Science*, 124, 10-12.
- ANGEN Ø, AHRENS P, BISGAARD M (2002) Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Veterinary Microbiology*, 84, 103-114.
- ANGEN Ø, THOMSEN J, LARSEN LE, LARSEN J, KOKOTOVIC B, HEEGAARD PM, ENEMARK JM (2009) Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Veterinary Microbiology*, 137, 165-171.
- ANHOLT RM, KLIMA C, ALLAN N, MATHESON-BIRD H, SCHATZ C, AJITKUMAR P, OTTO SJ, PETERS D, SCHMID K, OLSON M (2017) Antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex in Alberta, Canada. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 207.
- APLEY M (2006) Bovine respiratory disease: Pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 22, 399-411.
- APLEY MD, COETZEE JF (2013) Antimicrobial drug use in cattle. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine (Fifth Edit.)*. Ed. S GIGUÉRE, J PRESCOTT, P DOWLING, Wiley, New Jersey, p: 495-518.
- ARCANGIOLI M-A, ASLAN H, TARDY F, POUMARAT F, LE GRAND D (2012) The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in French calf feedlots. *The Veterinary Journal*, 192, 96-100.
- ARCANGIOLI M-A, DUET A, MEYER G, DERNBURG A, BÉZILLE P, POUMARAT F, LE GRAND D (2007) The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *The Veterinary Journal*, 177, 89-93.
- ASKI HS, TABATABAEI M (2016) Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts. *Microbial Pathogenesis*, 96, 52-57.



- ASSUNÇÃO P, ROSALES RS, RIFATBEGOVIC M, ANTUNES NT, DE LA FE C, RUIZ DE GALARRETA C, POVEDA J (2006) Quantification of mycoplasmas in broth medium with sybr green and flow cytometry. *Front Biosci*, 11, 492-497.
- AUTIO T, POHJANVIRTA T, HOLOPAINEN R, RIKULA U, PENTIKÄINEN J, HUOVILAINEN A, RUSANEN H, SOVERI T, SIHVONEN L, PELKONEN S (2007) Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Veterinary Microbiology*, 119, 256-265.
- AYLING R, ROSALES R, BARDEN G, GOSNEY F (2014) Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain. *Veterinary Record*, 175, 486-486.
- AYLING R, BAKER S, NICHOLAS RA, PEEK M, SIMON A (2000) Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony type. *Veterinary Record*, 146, 243-246.
- AYLING R, NICHOLAS R, HOGG R, WESSELS J, SCHOLLES S, BYRNE W, HILL M, MORIARTY J, O'BRIEN T (2005) *Mycoplasma bovis* isolated from brain tissue of calves. *Veterinary Record*, 156, 391-392.
- BABCOCK A, WHITE B, DRITZ S, THOMSON D, RENTER D (2008) Feedlot health and performance effects associated with the timing of respiratory disease treatment. *Journal of Animal Science*, 87, 314-327.
- BARBOSA TM, LEVY SB (2000) The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, 3, 303-311.
- BARTRAM DJ, MOYAERT H, VANIMISSETTI BH, RAMAGE CP, REDDICK D, STEGEMANN MR (2016) Comparative efficacy of tulathromycin and tildipirosin for the treatment of experimental *Mycoplasma bovis* infection in calves. *Veterinary Medicine and Science*, 2, 170-178.
- BASHIRUDDIN JB, FREY J, KÖNIGSSON MH, JOHANSSON K-E, HOTZEL H, DILLER R, DE SANTIS P, BOTELHO A, AYLING RD, NICHOLAS RA (2005) Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. *The Veterinary Journal*, 169, 268-275.
- BEBEAR CM, BOVE JM, BEBEAR C, RENAUDIN J (1997) Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 269-273.
- BEHRENS A, POUMARAT F, LE GRAND D, HELLER M, ROSENGARTEN R (1996) A newly identified immunodominant membrane protein (pmb67) involved in *Mycoplasma bovis* surface antigenic variation. *Microbiology*, 142, 2463-2470.

- BELL CJ, BLACKBURN P, ELLIOTT M, PATTERSON TI, ELLISON S, LAHUERTA-MARIN A, BALL HJ (2014) Investigation of polymerase chain reaction assays to improve detection of bacterial involvement in bovine respiratory disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26, 631-634.
- BENNETT R, JASPER D (1977) Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals. *The Cornell Veterinarian*, 67, 361-373.
- BERGE A, ATWILL E, SISCHO W (2001) Assessing the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* and in young calves using cluster analysis techniques. *Proceedings-Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*, 86-91.
- BERTONE I, BELLINO C, ALBORALI G, CAGNASSO A, CAGNOTTI G, DAPPIANO E, LIZZI M, MICILETTA M, RAMACCIOTTI A, GIANELLA P (2015) Clinical-pathological findings of otitis media and media-interna in calves and (clinical) evaluation of a standardized therapeutic protocol. *BMC Veterinary Research*, 11, 297.
- BIBERSTEIN E, GILLS M, KNIGHT H (1960) Serological types of *Pasteurella hemolytica*. *Cornell Veterinarian*, 50, 283-300.
- BLANCO-VIERA F, TRIGO F, JARAMILLO-MEZA L, AGUILAR-ROMERO F (1995) Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from México. *Revista Latinoamericana De Microbiologia*, 37, 121-126.
- BOGAARD A, STOBBERINGH E (1999) Antibiotic usage in animals: Impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*, 58, 589-607.
- BOONYAYATRA S, FOX L, BESSER T, SAWANT A, GAY J, RAVIV Z (2012) A PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism combination identifying the 3 primary mycoplasma species causing mastitis. *Journal of Dairy Science*, 95, 196-205.
- BOOTHBY J, JASPER D, ZINKL J, THOMAS C, DELLINGER J (1983) Prevalence of mycoplasmas and immune responses to *Mycoplasma bovis* in feedlot calves. *American Journal of Veterinary Research*, 44, 831-838.
- BORRATHYBAY E, SAWADA T, KATAOKA Y, OHTSU N, TAKAGI M, NAKAMURA S, KAWAMOTO E (2003) A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Veterinary Microbiology*, 97, 229-243.
- BOSCH M, GARRIDO ME, DE ROZAS AMP, BADIOLA I, BARBÉ J, LLAGOSTERA M (2004) *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin-and haemoglobin-binding proteins. *Veterinary Microbiology*, 99, 103-112.
- BOSCH M, TARRAGÓ R, GARRIDO ME, CAMPOY S, FERNÁNDEZ DE HENESTROSA AR, PÉREZ DE ROZAS AM, BADIOLA I, BARBÉ J (2001) Expression of the *Pasteurella*

*multocida* ompH gene is negatively regulated by the fur protein. *FEMS Microbiology Letters*, 203, 35-40.

BOURÉLY C, CAZEAU G, JOUY E, HAENNI M, MADEC J-Y, JARRIGE N, LEBLOND A, GAY E (2019) Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets. *Veterinary Microbiology*, 235, 280-284.

BOWLAND SL, SHEWEN PE (2000) Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 41, 33.

BRANK M, LE GRAND D, POUMARAT F, BEZILLE P, ROSENGARTEN R, CITTI C (1999) Development of a recombinant antigen for antibody-based diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6, 861-867.

BROOKS B, LUTZE-WALLACE C, LU P, ROBERTSON R (2004) Identification and serological specificity of a polysaccharide component from *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Research Communications*, 28, 197-208.

BUSH TJV, ROSENBUSCH RF (2003) Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 94, 23-33.

BUSHNELL RB (1984) Mycoplasma mastitis. *The Veterinary Clinics of North America Large Animal Practice*, 6, 301-312.

BUTLER J, SICKLES S, JOHANNIS C, ROSENBUSCH R (2000) Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feed calves: Thermal effects on various mycoplasma. *Journal of Dairy Science*, 83, 2285-2288.

BÜRKI S, FREY J, PILO P (2015) Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, 179, 15-22.

BYRNE W, MCCORMACK R, EGAN J, BRICE N, BALL H, MARKEY B (2001) Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical samples in the Republic of Ireland. *Veterinary Record*, 148, 331-333.

CAI HY, BELL-ROGERS P, PARKER L, PRESCOTT JF (2005) Development of a Real-Time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 537-545.

CAPITINI CM, HERRERO IA, PATEL R, ISHITANI MB, BOYCE TG (2002) Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clinical Infectious Diseases*, 34, e74-e76.

CASWELL JL, ARCHAMBAULT M (2008) *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Animal Health Research Reviews*, 8, 161-186.

- CATRY B, LAEVENS H, DEVRIESE L, OPSOMER G, DE KRUIF A (2003) Antimicrobial resistance in livestock. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26, 81-93.
- CATRY B, BAELE M, OPSOMER G, DE KRUIF A, DECOSTERE A, HAESEBROUCK F (2004) tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. *Veterinary Microbiology*, 98, 251-260.
- CATRY B, CHIERS K, SCHWARZ S, KEHRENBURG C, DECOSTERE A, DE KRUIF A (2005) Fatal peritonitis caused by *Pasteurella multocida* capsular type F in calves. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1480-1483.
- CATRY B, DECOSTERE A, SCHWARZ S, KEHRENBURG C, DE KRUIF A, HAESEBROUCK F (2006) Detection of tetracycline-resistant and susceptible *Pasteurellaceae* in the nasopharynx of loose group-housed calves. *Veterinary Research Communications*, 30, 707-715.
- CATRY B, HAESEBROUCK F, Vliegheer SD, FEYEN B, VANROBAEYS M, OPSOMER G, SCHWARZ S, KRUIF AD (2005) Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types. *Microbial Drug Resistance*, 11, 387-394.
- CATRYL B, GOVAEREL J, DEVRIESE L, LAEVENSL H, HAESEBROUCKZ F, DE KRUIF A (2002) Prevalence of pathogens and their antimicrobial susceptibility. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 71, 348-354.
- CHASLUS-DANCLA E, LESAGE-DESCAUSES M-C, LEROY-SÉTRIN S, MARTEL J-L, LAFONT J-P (1995) Tetracycline resistance determinants, tet B and tet M, detected in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* from bovine herds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36, 815-819.
- CHERNOVA O, MEDVEDEVA E, MOUZYKANTOV A, BARANOVA N, CHERNOV V (2016) Mycoplasmas and their antibiotic resistance: The problems and prospects in controlling infections. *Acta Naturae*, 8, 24-34.
- CHOI-KIM K, MAHESWARAN SK, FELICE LJ, MOLITOR TW (1991) Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 28, 75-92.
- CHOUHDARY M, CHOUHDARY BK, GHOSH RC, BHOYAR S, CHAUDHARI S, BARBUDDHE SB (2019) Cultivable microbiota and pulmonary lesions in polymicrobial bovine pneumonia. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103577.
- CHUNG JY, WILKIE I, BOYCE JD, TOWNSEND KM, FROST AJ, GHODDUSI M, ADLER B (2001) Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infection and Immunity*, 69, 2487-2492.

- CLOTHIER KA, JORDAN DM, THOMPSON CJ, KINYON JM, FRANA TS, STRAIT EL (2010) *Mycoplasma bovis* real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 956-960.
- CONFER A, SIMONS K, PANCIERA R, MORT A, MOSIER D (1989) Serum antibody response to carbohydrate antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: Relation to experimentally induced bovine pneumonic pasteurellosis. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 98-105.
- CONFER AW, AYALEW S, PANCIERA RJ, MONTELONGO M, WRAY JH (2006) Recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein plpE enhances commercial *M. haemolytica* vaccine-induced resistance against serotype 6 challenge. *Vaccine*, 24, 2248-2255.
- CORNEY B, DIALLO I, WRIGHT L, HEWITSON G, DE JONG A, BURRELL P, DUFFY P, STEPHENS C, RODWELL B, BOYLE D (2007) *Pasteurella multocida* detection by 5' Taq nuclease assay: A new tool for use in diagnosing fowl cholera. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 376-380.
- CORSTVET R, GENTRY M, NEWMAN P, RUMMAGE J, CONFER AW (1982) Demonstration of age-dependent capsular material on *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 16, 1123-1126.
- CUCCO L, MASSACCI FR, SEBASTIANI C, MANGILI P, BANO L, COCCHI M, LUPPI A, ORTENZI R, PEZZOTTI G, MAGISTRALI CF (2017) Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* strains isolated from hosts affected by various diseases in Italy. *Vet Ital*, 53, 21-27.
- CUSACK P, MCMENIMAN N, LEAN I (2003) The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Australian Veterinary Journal*, 81, 480-487.
- DABO S, CONFER A, MURPHY G (1997) Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Veterinary Microbiology*, 54, 167-183.
- DABO S, CONFER A, QUIJANO-BLAS R (2003) Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A: 3 ompA: Evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathogenesis*, 35, 147-157.
- DABO S, CONFER A, HARTSON S (2005) Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Veterinary Microbiology*, 110, 265-275.
- DABO SM, CONFER A, MONTELONGO M, YORK P, WYCKOFF III JH (2008) Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant ompA induces strong but non-protective and deleterious th2-type immune response in mice. *Vaccine*, 26, 4345-4351.

- DAGAN R, KLUGMAN KP, CRAIG WA, BAQUERO F (2001) Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 47, 129-140.
- DASSANAYAKE RP, MAHESWARAN SK, SRIKUMARAN S (2007) Monomeric expression of bovine  $\beta$ 2-integrin subunits reveals their role in *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced biological effects. *Infection and Immunity*, 75, 5004-5010.
- DAVIES R, PASTER B, DEWHIRST F (1996) Phylogenetic relationships and diversity within the *Pasteurella haemolytica* complex based on 16S rRNA sequence comparison and outer membrane protein and lipopolysaccharide analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 736-744.
- DAVIES RL, BAILLIE S (2003) Cytotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA. *Veterinary Microbiology*, 92, 263-279.
- DAVIES RL, WHITTAM TS, SELANDER RK (2001) Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lktA) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Journal of Bacteriology*, 183, 1394-1404.
- DAVIES RL, MACCORQUODALE R, REILLY S (2004) Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Veterinary Microbiology*, 99, 145-158.
- DOUGHTY SW, RUFFOLO CG, ADLER B (2000) The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 72, 79-90.
- DUFF GC, GALYEAN ML (2007) Board-invited review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 85, 823-840.
- EL GARCH F, DE JONG A, SIMJEE S, MOYAERT H, KLEIN U, LUDWIG C, MARION H, HAAG-DIERGARTEN S, RICHARD-MAZET A, THOMAS V (2016) Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009–2012: Vetpath results. *Veterinary Microbiology*, 194, 11-22.
- ERBAŞ G, KAYA O (2008) The isolation, serotyping and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* strains in cattle in Aydin and Izmir provinces. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 30, 7-14.
- EWERS C, LÜBKE-BECKER A, BETHE A, KIEBLING S, FILTER M, WIELER LH (2006) Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology*, 114, 304-317.
- FAJFAR-WHETSTONE C, COLEMAN L, BIGGS DR, FOX BC (1995) *Pasteurella multocida* septicemia and subsequent *Pasteurella dagmatis* septicemia in a diabetic patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 202-204.

- FARLEY H (1932) An epizootological study of shipping fever in Kansas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 52, 165-172.
- FILION L, WILLSON P, BIELEFELDT-OHMANN H, BABIUK L, THOMSON R (1984) The possible role of stress in the induction of pneumonic pasteurellosis. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 48, 268.
- FISCHER H, YAMAMOTO M, AKIRA S, BEUTLER B, SVANBORG C (2006) Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: Fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *European Journal of Immunology*, 36, 267-277.
- FLITMAN-TENE R, MUDAHI-ORENSTEIN S, LEVISOHN S, YOGEV D (2003) Variable lipoprotein genes of *Mycoplasma agalactiae* are activated in vivo by promoter addition via site-specific DNA inversions. *Infection and Immunity*, 71, 3821-3830.
- FRANCOZ D, FORTIN M, FECTEAU G, MESSIER S (2005) Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Veterinary Microbiology*, 105, 57-64.
- FRANK GH, BRIGGS R, ZEHR E (1995) Colonization of the tonsils and nasopharynx of calves by a rifampicin-resistant *Pasteurella haemolytica* and its inhibition by vaccination. *American Journal of Veterinary Research*, 56, 866-869.
- FULLER TE, KENNEDY MJ, LOWERY DE (2000) Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microbial Pathogenesis*, 29, 25-38.
- FULTON RW, PURDY C, CONFER AW, SALIKI J, LOAN RW, BRIGGS RE, BURGE LJ (2000) Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64, 151.
- FULTON RW, BLOOD KS, PANCIERA RJ, PAYTON ME, RIDPATH JF, CONFER AW, SALIKI JT, BURGE LT, WELSH RD, JOHNSON BJ (2009) Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21, 464-477.
- GAGEA MI, BATEMAN KG, SHANAHAN RA, VAN DREUMEL T, MCEWEN BJ, CARMAN S, ARCHAMBAULT M, CASWELL JL (2006) Naturally occurring *Mycoplasma bovis*—associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 29-40.
- GAGEA MI, BATEMAN KG, VAN DREUMEL T, MCEWEN BJ, CARMAN S, ARCHAMBAULT M, SHANAHAN RA, CASWELL JL (2006) Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 18-28.

- GALDIERO M, FOLGORE A, NUZZO I, GALDIERO E (2000) Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells in vitro by protein H and LPS of *Pasteurella multocida*. *Immunobiology*, 202, 226-238.
- GARCÍA-ALVAREZ A, FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL JF, CHAVES F, PINTO C, CID D (2018) Ovine *Mannheimia haemolytica* isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. *Veterinary Microbiology*, 219, 80-86.
- GAUTIER-BOUCHARDON AV, FERRE S, LE GRAND D, PAOLI A, GAY E, POUMARAT F (2014) Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PLoS One*, 9, e87672
- GAUTIER-BOUCHARDON AV (2018) Antimicrobial resistance in mycoplasma spp. In: Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals. Ed. S SCHWARZ, LM CAVACO, J SHEN, p: 425-446.
- GAUTIER A-L, DUBOIS D, ESCANDE F, AVRIL J-L, TRIEU-CUOT P, GAILLOT O (2005) Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the sodA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2307-2314.
- GEARY SJ, TOURTELLOTTE ME, CAMERON J (1981) Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*: Isolation and characterization. *Science*, 212, 1032-1033.
- GERARDO SH, CITRON DM, CLAROS MC, FERNANDEZ HT, GOLDSTEIN EJ (2001) *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and  $\alpha$ -glucosidase activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2558-2564.
- GERCHMAN I, LEVISOHN S, MIKULA I, LYSNYANSKY I (2009) In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle. *Veterinary Microbiology*, 137, 268-275.
- GEVAERT D (2006) The importance of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 131, 124-126.
- GHADERSOHI A, FAYAZI Z, HIRST RG (2005) Development of a monoclonal blocking ELISA for the detection of antibody to *Mycoplasma bovis* in dairy cattle and comparison to detection by PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104, 183-193.
- GIOIA J, HIGHLANDER SK (2007) Identification and characterization of transcriptional regulation of the *Mannheimia haemolytica* ferric uptake regulator. *Veterinary Microbiology*, 124, 298-309.
- GLISSON JR HC, CHRISTENSEN J (2003) *Pasteurella* and other related bacterial infections. In: Diseases of Poultry. Ed. M BOULIANNE, CM LOGUE, LR MCDUGALD, V NAIR, DL SUAREZ, Iowa State University Press Ames, Iowa, p: 657-690.



- GLORIOSO J, JONES G, RUSH H, PENTLER L, DARIF C, COWARD J (1982) Adhesion of type a *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infection and Immunity*, 35, 1103-1109.
- GODINHO K, RAE A, WINDSOR G, TILT N, ROWAN T, SUNDERLAND S (2005) Efficacy of tulathromycin in the treatment of bovine respiratory disease associated with induced *Mycoplasma bovis* infections in young dairy calves. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*, 6, 96-112.
- GOSSELIN VB, FRANCOZ D, BABKINE M, DESROCHERS A, NICHOLS S, DORÉ E, BÉDARD C, PARENT J, FAIRBROTHER J-H, FECTEAU G (2012) A retrospective study of 29 cases of otitis media/interna in dairy calves. *The Canadian Veterinary Journal*, 53, 957.
- GOURLAY R, THOMAS L, HOWARD C (1976) Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with *Mycoplasma agalactiae* subsp *bovis*. *Veterinary Record*, 98, 506-507.
- GOURLAY R, THOMAS L, WYLD S (1989) Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Veterinary Record*, 124, 420-422.
- GRIFFIN D (1997) Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 13, 367-377.
- GULER L, GUNDUS K, SARISAHIN AS (2013) Capsular typing and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from different hosts. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19, 843-849.
- GÜLAYDIN Ö, GÜRTÜRK K (2018) Identification of *Pasteurella multocida* strains isolated from respiratory tract of healthy and diseased cattle and determination of capsular types by PCR in Van region. *Van Veterinary Journal*, 29,
- HALE H, HELMBOLDT C, PLASTRIDGE W, STULA E (1962) Bovine mastitis caused by a mycoplasma species. *The Cornell Veterinarian*, 52, 582-591.
- HANNAN PC (2000): Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Veterinary Research*, 31, 373-395.
- HANSEN LM, BLANCHARD PC, HIRSH DC (1996) Distribution of tet (H) among pasteurella isolates from the United States and Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1558-1560.
- HARMON B, GLISSON J, LATIMER K, STEFFENS W, NUNNALLY J (1991) Resistance of *Pasteurella multocida* A: 3, 4 to phagocytosis by Turkey macrophages and heterophils. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 1507-1511.

- HARPER M, BOYCE JD, ADLER B (2006) *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*, 265, 1-10.
- HELLER M, BERTHOLD E, PFÜTZNER H, LEIRER R, SACHSE K (1993) Antigen capture ELISA using a monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Veterinary Microbiology*, 37, 127-133.
- HENDRICK SH, BATEMAN KG, ROSENGREN LB (2013) The effect of antimicrobial treatment and preventive strategies on bovine respiratory disease and genetic relatedness and antimicrobial resistance of *Mycoplasma bovis* isolates in a Western Canadian feedlot. *The Canadian Veterinary Journal*, 54, 1146.
- HENDRIKSEN RS, MEVIUS DJ, SCHROETER A, TEALE C, MEUNIER D, BUTAYE P, FRANCO A, UTINANE A, AMADO A, MORENO M (2008) Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50, 28.
- HEUVELINK A, REUGEBRINK C, MARS J (2016) Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 189, 1-7.
- HIGHLANDER SK (2001) Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci*, 6, D1128-D1150.
- HIROSE K, KOBAYASHI H, ITO N, KAWASAKI Y, ZAKO M, KOTANI K, OGAWA H, SATO H (2003) Isolation of mycoplasmas from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 50, 347-351.
- HJERPE CA (1990) Bovine vaccines and herd vaccination programs. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 6, 167-260.
- HODGINS DC, CONLON JA, SHEWEN PE (2002) Respiratory viruses and bacteria in cattle. In: Polymicrobial diseases. Ed. KA BROGDEN, JM GUTHMILLER, ASM Press, Washington.
- HOTCHKISS E, DAGLEISH M, WILLOUGHBY K, MCKENDRICK I, FINLAYSON J, ZADOKS R, NEWSOME E, BRULISAUER F, GUNN G, HODGSON J (2010) Prevalence of *Pasteurella multocida* and other respiratory pathogens in the nasal tract of Scottish calves. *Veterinary Record*, 167, 555-560.
- HOTZEL H, SACHSE K, PFÜTZNER H (1996) Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 505-510.

- HOWARD C, PARSONS K, THOMAS L (1986) Systemic and local immune responses of gnotobiotic calves to respiratory infection with *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 11, 291-300.
- HUNT ML, ADLER B, TOWNSEND KM (2000) The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 72, 3-25.
- HUNT ML, BOUCHER DJ, BOYCE JD, ADLER B (2001) In vivo-expressed genes of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 69, 3004-3012.
- IOVANE G, PAGNINI P, GALDIERO M, DE L'ERO GC, VITIELLO M, D'ISANTO M, MARCATILI A (1998) Role of *Pasteurella multocida* porin on cytokine expression and release by murine splenocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66, 391-404.
- JAMALI H, REZAGHOLIPOUR M, FALLAH S, DADRASNIA A, CHELLIAH S, VELAPPAN RD, WEI KSC, ISMAIL S (2014) Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Pasteurella multocida* isolated from bovine respiratory infection. *The Veterinary Journal*, 202, 381-383.
- JASPER D, ROSENDAL S, BARNUM D (1984) Acridine orange staining for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cow milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, 624-625.
- JEYASEELAN S, SREEVATSAN S, MAHESWARAN SK (2002) Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Animal Health Research Reviews*, 3, 69-82.
- KALE M, OZTURK D, HASIRCIOGLU S, PEHLIVANOGLU F, TURUTOGLU H (2013) Some viral and bacterial respiratory tract infections of dairy cattle during the summer season. *Acta Veterinaria*, 63, 227-236.
- KAOUH H, EL-DAHSHAN A, ZAKI M, NASR SA (2010) Occurrence of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* among ruminants in Egypt. *New York Science Journal*, 3, 135-141.
- KARAHAN M, KALIN R, ATIL E, ÇETINKAYA B (2010) Detection of *Mycoplasma bovis* in cattle with mastitis and respiratory problems in eastern Turkey. *Veterinary Record*, 166, 827-829.
- KASTEN RW, CARPENTER TE, SNIPES KP, HIRSH DC (1997) Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 676-682.
- KATSUDA K, KOHMOTO M, MIKAMI O (2013) Relationship between serotype and the antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates collected between 1991 and 2010. *Research in Veterinary Science*, 94, 205-208.

- KATSUDA K, KOHMOTO M, MIKAMI O, UCHIDA I (2009) Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. *Veterinary Microbiology*, 139, 74-79.
- KATSUDA K, HOSHINO K, UENO Y, KOHMOTO M, MIKAMI O (2013) Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. *Veterinary Microbiology*, 167, 737-741.
- KATSUDA K, KAMIYAMA M, KOHMOTO M, KAWASHIMA K, TSUNEMITSU H, EGUCHI M (2008) Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987–2006. *The Veterinary Journal*, 178, 146-148.
- KAWAI K, HIGUCHI H, IWANO H, IWAKUMA A, ONDA K, SATO R, HAYASHI T, NAGAHATA H, OSHIDA T (2014) Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma* isolated from bovine mastitis in Japan. *Animal Science Journal*, 85, 96-99.
- KEHRENBURG C, SCHWARZ S, WALKER RD, WU CC (2006) Antimicrobial resistance in members of the family *Pasteurellaceae*. In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Ed. FM AARESTRUP, American Society of Microbiology, Washington, p: 167-186.
- KEHRENBURG C, SCHULZE-TANZIL G, MARTEL J-L, CHASLUS-DANCLA E, SCHWARZ S (2001) Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: Epidemiology and genetic basis. *Veterinary Research*, 32, 323-339.
- KEHRENBURG C, CATRY B, HAESEBROUCK F, DE KRUIF A, SCHWARZ S (2005) Tet (L)-mediated tetracycline resistance in bovine *Mannheimia* and *Pasteurella* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 403-406.
- KEHRENBURG C, CATRY B, HAESEBROUCK F, DE KRUIF A, SCHWARZ S (2005) Novel spectinomycin /streptomycin resistance gene, aada14, from *Pasteurella multocida*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 49, 3046-3049.
- KELLEY ST, CASSIRER EF, WEISER GC, SAFAEE S (2007) Phylogenetic diversity of *Pasteurellaceae* and horizontal gene transfer of leukotoxin in wild and domestic sheep. *Infection, Genetics and Evolution*, 7, 13-23.
- KHAMESIPOUR F, MOMTAZ H, AZHDARY MAMOREH M (2014) Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Frontiers in Microbiology*, 5, 536.
- KHAN L, MILES R, NICHOLAS R (2005) Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of in vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Veterinary Research Communications*, 29, 181-188.

- KHAN LA, LORIA GR, RAMIREZ AS, NICHOLAS RA, MILES RJ, FIELDER MD (2005) Biochemical characterisation of some non fermenting, non arginine hydrolysing mycoplasmas of ruminants. *Veterinary Microbiology*, 109, 129-134.
- KILIÇ A, MUZ A (2004) Isolation of bacterial agents from the lungs of cattle with pneumonia and detection of *Pasteurella* spp. by polymerase chain reaction. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28, 217-223.
- KITT T (1885) Über eine experimentelle, der rinderseuche ähnliche infektionskrankheit. *Sitzunbsber Ges Morphol Physiol Muenchen*, 140-168.
- KLEIN U, DE JONG A, MOYAERT H, EL GARCH F, LEON R, RICHARD-MAZET A, ROSE M, MAES D, PRIDMORE A, THOMSON JR (2017) Antimicrobial susceptibility monitoring of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma bovis* isolated in Europe. *Veterinary Microbiology*, 204, 188-193.
- KLEINSCHMIDT S, SPERGSER J, ROSENGARTEN R, HEWICKER-TRAUTWEIN M (2013) Long-term survival of *Mycoplasma bovis* in necrotic lesions and in phagocytic cells as demonstrated by transmission and immunogold electron microscopy in lung tissue from experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology*, 162, 949-953.
- KLIMA C, ALEXANDER T, SELINGER L, READ R, SHEWAN P, GOW S, BOOKER C, MCALLISTER T (2010) Comparison of repetitive PCR and pulsed-field gel electrophoresis for the genotyping of *Mannheimia haemolytica*. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 39-47.
- KLIMA C, ALEXANDER T, READ R, GOW S, BOOKER C, HANNON S, SHEEDY C, MCALLISTER T, SELINGER L (2011) Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolated from the nasopharynx of feedlot cattle. *Veterinary Microbiology*, 149, 390-398.
- KLIMA CL, ALEXANDER TW, HENDRICK S, MCALLISTER TA (2014) Characterization of *Mannheimia haemolytica* isolated from feedlot cattle that were healthy or treated for bovine respiratory disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78, 38-45.
- KLIMA CL, ZAHEER R, BRIGGS RE, MCALLISTER TA (2017) A multiplex PCR assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2 and 6. *Journal of Microbiological Methods*, 139, 155-160.
- KLIMA CL, ZAHEER R, COOK SR, BOOKER CW, HENDRICK S, ALEXANDER TW, MCALLISTER TA (2014) Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 438-448.
- KOBAYASHI H, MOROZUMI T, MUNTHALI G, MITANI K, ITO N, YAMAMOTO K (1996) Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1030-1032.

- KONG L-C, GAO D, JIA B-Y, WANG Z, GAO Y-H, PEI Z-H, LIU S-M, XIN J-Q (2016) Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma bovis* isolates from multiple provinces in China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78, 293-296.
- KÖNDGEN S, LEIDER M, LANKESTER F, BETHE A, LÜBKE-BECKER A, LEENDERTZ FH, EWERS C (2011) *Pasteurella multocida* involved in respiratory disease of wild chimpanzees. *PLoS One*, 6, e24236
- KUMAR A, SHIVACHANDRA S, BISWAS A, SINGH V, SINGH VP, SRIVASTAVA S (2004) Prevalent serotypes of *Pasteurella multocida* isolated from different animal and avian species in India. *Veterinary Research Communications*, 28, 657-667.
- KUMAR P, SINGH V, AGRAWAL R, SINGH S (2009): Identification of *Pasteurella multocida* isolates of ruminant origin using polymerase chain reaction and their antibiogram study. *Tropical Animal Health and Production*, 41, 573-578.
- LAMM CG, LOVE BC, KREHBIEL CR, JOHNSON NJ, STEP DL (2012) Comparison of antemortem antimicrobial treatment regimens to antimicrobial susceptibility patterns of postmortem lung isolates from feedlot cattle with bronchopneumonia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24, 277-282.
- LANGLOIS BE, DAWSON KA, LEAK I, AARON DK (1988) Effect of age and housing location on antibiotic resistance of fecal coliforms from pigs in a non-antibiotic-exposed herd. *Appl Environ Microbiol*, 54, 1341-1344.
- LARSON RL, TYLER JW (2005) Reducing calf losses in beef herds. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 21, 569-584.
- LE GRAND D, BÉZILLE P, CALAVAS D, POUMARAT F, BRANK M, CITTI C, ROSENGARTEN R (2002) Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France. *Veterinary Record*, 150, 268-273.
- LEE CW, SHEWEN PE (1996) Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 60, 127.
- LEE RW, STROMMER J, HODGINS D, SHEWEN PE, NIU Y, LO RY (2001) Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infection and Immunity*, 69, 5786-5793.
- LI J, CLINKENBEARD KD (1999) Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infection and Immunity*, 67, 2920-2927.

- LILLIE L, THOMSON R (1972) The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 36, 129.
- LONERAGAN GH, THOMSON DU, MONTGOMERY DL, MASON GL, LARSON RL (2005) Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in feedlot cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 595-601.
- LYSNYANSKY I, AYLING RD (2016) *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, 7, 595.
- MADOFF S, PIXLEY BQ, DELGIUDICE R, MOELLERING R (1979) Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 9, 709-711.
- MARANDI MV, MITTAL K (1997) Role of outer membrane protein H (ompH)-and ompA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 65, 4502-4508.
- MARQUES R, BONECA IG (2011) Expression and functional importance of innate immune receptors by intestinal epithelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 3661.
- MARTEL J, VANDAELE E (1999) Épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes chez les bovins. *Point Veterinaire*, 30, 15-22.
- MASLOG FS, MOTOBU M, HAYASHIDA N, YOSHIHARA K, MOROZUMI T, MATSUMURA M, HIROTA Y (1999) Effects of the lipopolysaccharide-protein complex and crude capsular antigens of *Pasteurella multocida* serotype a on antibody responses and delayed type hypersensitivity responses in the chicken. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61, 565-567.
- MATTSSON JG, GUSS B, JOHANSSON K-E (1994) The phylogeny of *Mycoplasma bovis* as determined by sequence analysis of the 16S rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters*, 115, 325-328.
- MAUNSELL F, WOOLUMS A, FRANCOZ D, ROSENBUSCH R, STEP D, WILSON DJ, JANZEN E (2011) *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 772-783.
- MAUNSELL FP, DONOVAN GA, RISCO C, BROWN MB (2009) Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine*, 27, 2781-2788.
- MAY BJ, ZHANG Q, LI LL, PAUSTIAN ML, WHITTAM TS, KAPUR V (2001) Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, pm70. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 98, 3460-3465.

- MAZZOLINI E, AGNOLETTI F, FRISO S (1997) Drug susceptibility of respiratory mycoplasmas of cattle. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 18, 61-66.
- MCAULIFFE L, KOKOTOVIC B, AYLING RD, NICHOLAS RA (2004) Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4556-4565.
- MCAULIFFE L, ELLIS RJ, LAWES JR, AYLING RD, NICHOLAS RA (2005) 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating mycoplasma species. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 731-739.
- MCAULIFFE L, ELLIS RJ, MILES K, AYLING RD, NICHOLAS RA (2006) Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*, 152, 913-922.
- MCCLARY DG, LONERAGAN GH, SHRYOCK TR, CARTER BL, GUTHRIE CA, CORBIN MJ, MECHOR GD (2011) Relationship of in vitro minimum inhibitory concentrations of tilmicosin against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* and in vivo tilmicosin treatment outcome among calves with signs of bovine respiratory disease. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, 239, 129-135.
- MICHAEL GB, BOSSÉ JT, SCHWARZ S (2018) Antimicrobial resistance in *Pasteurellaceae* of veterinary origin. In: Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals. Ed. S SCHWARZ, LM CAVACO, J SHEN, ASM Press, Washington, p: 331-363.
- MIZAN S, HENK A, STALLINGS A, MAIER M, LEE MD (2000) Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology*, 182, 6874-6883.
- MOHAMED R, ABDELSALAM E (2008) A review on pneumonic pasteurellosis (respiratory manheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 11, 139-160.
- MOORE MK, CICNJAK-CHUBBS L, GATES RJ (1994) A new selective enrichment procedure for isolating *Pasteurella multocida* from avian and environmental samples. *Avian Diseases*, 317-324.
- MORAES TF, YU R-H, STRYNADKA NC, SCHRYVERS AB (2009) Insights into the bacterial transferrin receptor: The structure of transferrin-binding protein B from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Molecular Cell*, 35, 523-533.
- MOSSMAN KL, MIAN MF, LAUZON NM, GYLES CL, LICHTY B, MACKENZIE R, GILL N, ASHKAR AA (2008) Cutting edge: FimH adhesin of type 1 fimbriae is a novel TLR4 ligand. *The Journal of Immunology*, 181, 6702-6706.



- MULONGO M, PRYSLIAK T, SCRUTEN E, NAPPER S, PEREZ-CASAL J (2014) In vitro infection of bovine monocytes with *Mycoplasma bovis* delays apoptosis and suppresses production of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha but not interleukin-10. *Infection and Immunity*, 82, 62-71.
- MURRAY PR, BARON E, JORGENSEN J, PFALLER M, YOLKEN R (2003) Manual of Clinical Microbiology, 8th ed, American Society of Microbiology, Washington.
- NAGAI S, SOMENO S, YAGIHASHI T (1994) Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1004-1010.
- NAGATOMO H, SHIMIZU T, HIGASHIYAMA Y, YANO Y, KUROKI H, HAMANA K (1996) Antibody response to *Mycoplasma bovis* of calves introduced in a farm contaminated with the organism. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58, 919-920.
- NARDINI PM, MELLORS A, LO RY (1998) Characterization of a fourth lipoprotein from *Pasteurella haemolytica* A1 and its homology to the ompA family of outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 165, 71-77.
- NEFEDCHENKO A, SHIKOV A, GLOTOV A, GLOTOVA T, TERNOVOY V, AGAFONOV A, SERGEEV A, DONCHENKO N (2016) Development of a method for identification and genotyping of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* bacteria using polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of bacterial cultures isolated from cattle. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 31, 75-81.
- NEGRETE-ABASCAL E, TENORIO VR, DE LA GARZA M (1999) Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current Microbiology*, 38, 64-67.
- NICHOLAS R (2011) Bovine mycoplasmosis: Silent and deadly. *Veterinary Record*, 168, 459-462.
- NICHOLAS R, BAKER S (1998) Recovery of mycoplasmas from animals. In: *Mycoplasma Protocols*. Ed. R MILES, R NICHOLAS, Springer, 37-43
- NICHOLAS R, AYLING R (2003) *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, 74, 105-112.
- NICHOLAS RA (2004) Recent developments in the diagnosis and control of mycoplasma infections in cattle. *Medecin Veterinaire Du Quebec*, 34, 21-22.
- NICHOLAS RA, AYLING RD, STIPKOVITS LP (2002) An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: Clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine*, 20, 3569-3575.
- NICHOLAS RA, FOX LK, LYSNYANSKY I (2016) Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull. *The Veterinary Journal*, 216, 142-147.

- NIKUNEN S, HÄRTEL H, ORRO T, NEUVONEN E, TANSKANEN R, KIVELÄ S-L, SANKARI S, AHO P, PYÖRÄLÄ S, SALONIEMI H (2007) Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30, 143-151.
- NYARKO KA, COOMBER BL, MELLORS A, GENTRY PA (1998) Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Veterinary Microbiology*, 61, 81-91.
- OZDEMIR U, TURKYILMAZ M, NICHOLAS A (2019) Detection and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* and other respiratory disease pathogens from pneumonic lung samples in a calf rearing unit. *Madridge J Vet Med Res*, 1, 8-12.
- ÖNAT K, KAHYA S, ÇARLI KT (2010) Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 34, 91-94.
- ÖZEN H, KARAMAN M, ŞAHİN M, ÖZCAN K (2009) PCR detection of *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* and *M. mycoides* subsp. *mycoides* (small colony type) and investigations of pathological findings in pneumonic cattle. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15, 125-133.
- PANDHER K, CONFER AW, MURPHY GL (1998) Genetic and immunologic analyses of plpE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Infection and Immunity*, 66, 5613-5619.
- PARKER AM, SHEEHY PA, HAZELTON MS, BOSWARD KL, HOUSE JK (2018) A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32, 1241-1252.
- PFÜTZNER H (1990) Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie*, Supplement 20, 394-399.
- PFÜTZNER H, SACHSE K (1996) *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 15, 1477-1494.
- PORTIS E, LINDEMAN C, JOHANSEN L, STOLTMAN G (2012) A ten-year (2000–2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex—*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Histophilus somni*—in the United States and Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24, 932-944.
- POST KW, COLE NA, RALEIGH RH (1991) In vitro antimicrobial susceptibility of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* recovered from cattle with bovine respiratory disease complex. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3, 124-126.

- POUMARAT F, LE GRAND D, SOLSONA M, ROSENGARTEN R, CITTI C (1999) Vsp antigens and vsp-related DNA sequences in field isolates of *Mycoplasma bovis*. *FEMS Microbiology Letters*, 173, 103-110.
- POUMARAT F, LE GRAND D, PHILIPPE S, CALAVAS D, SCHELCHER F, CABANIÉ P, TESSIER P, NAVETAT H (2001) Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. *Veterinary Microbiology*, 80, 23-35.
- POVEDA JB (1998) Biochemical characteristics in mycoplasma identification. In: *Mycoplasma Protocols*. Ed. R MILES, R NICHOLAS, Springer, p: 69-78.
- POVEDA JB, NICHOLAS R (1998) Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolism inhibition tests. In: *Mycoplasma Protocols*. Ed. R MILES, R NICHOLAS, Springer, p: 105-111.
- PRATT J, COOLEY JD, PURDY CW, STRAUS DC (2000) Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. *Current Microbiology*, 40, 306-309.
- PRUIMBOOM IM, RIMLER RB, ACKERMANN MR, BROGDEN KA (1996) Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to Turkey air sac macrophages. *Avian Diseases*, 887-893.
- QUINN J, CARTER E, MARKEY B, CARTER R (2002) *Clinical Veterinary Microbiology and Diseases*, 1<sup>st</sup> Ed, Mosby, London.
- REEVE-JOHNSON L (1999) The impact of mycoplasma infections in respiratory disease in cattle in Europe. In: *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*. Ed. L. STIPKOVITS, R. ROSENGARTEN, J. FREY, p: 18-31.
- RIBBLE C, MEEK A, SHEWEN P, GUICHON P, JIM G (1995) Effect of pretransit mixing on fatal fibrinous pneumonia in calves. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, 207, 616-619.
- RICE J, CARRASCO-MEDINA L, HODGINS D, SHEWEN P (2007) *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 8, 117-128.
- ROBINO P, ALBERTI A, PITTAU M, CHESSA B, MICILETTA M, NEBBIA P, LE GRAND D, ROSATI S (2005) Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein p48 of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, 109, 201-209.
- ROEHRIG SC, TRAN HQ, SPEHR V, GUNKEL N, SELZER PM, ULLRICH HJ (2007) The response of *Mannheimia haemolytica* to iron limitation: Implications for the acquisition of iron in the bovine lung. *Veterinary Microbiology*, 121, 316-329.

- ROSENBUSCH RF, KINYON JM, APLEY M, FUNK ND, SMITH S, HOFFMAN LJ (2005) In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 436-441.
- ROSENGARTEN R, BEHRENS A, STETEFELD A, HELLER M, AHRENS M, SACHSE K, YOGEV D, KIRCHHOFF H (1994) Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. *Infection and Immunity*, 62, 5066-5074.
- ROSSETTI BC, FREY J, PILO P (2010) Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 24, 321-323.
- ROSSI C, KIESEL G (1977) Susceptibility of bovine macrophage and tracheal-ring cultures to bovine viruses. *American Journal of Veterinary Research*, 38, 1705-1708.
- RUFFOLO CG, TENNENT JM, MICHALSKI WP, ADLER B (1997) Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 65, 339-343.
- RYU HI, KIM CJ (2000) Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide-protein complex of type a *Pasteurella multocida* in mice. *Journal of Veterinary Science*, 1, 87-95.
- SACHSE K, GRAJETZKI C, ROSENGARTEN R, HÄNEL I, HELLER M, PFÜTZNER H (1996) Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 284, 80-92.
- SACHSE K, SALAM HS, DILLER R, SCHUBERT E, HOFFMANN B, HOTZEL H (2010) Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *The Veterinary Journal*, 186, 299-303.
- SACHSE K, HELBIG J, LYSNYANSKY I, GRAJETZKI C, MÜLLER W, JACOBS E, YOGEV D (2000) Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infection and Immunity*, 68, 680-687.
- SAYIN Z, SAKMANOĞLU A, UÇAN US, USLU A, HADIMLI HH, ARAS Z, ÖZDEMİR Ö, ERGANIŞ O (2016) Mycoplasma infections in dairy cattle farms in turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40, 569-574.
- SCHERM B, GERLACH G-F, RUNGE M (2002) Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigations concerning their role in immunity and infection. *Veterinary Microbiology*, 89, 141-150.
- SCHWARZ S (2008) Mechanisms of antimicrobial resistance in *Pasteurellaceae*. In: *Biology, Genomics and Molecular Aspects*. Ed. P KUHNERT, H CHRISTENSEN, Caister Academic Press, U.K.

- SCHWARZ S, KEHRENBURG C, WALSH T (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 431-437.
- SCHWARZ S, KEHRENBURG C, SALMON SA, WATTS JL (2004) In vitro activities of spectinomycin and comparator agents against *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* from respiratory tract infections of cattle. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 379-382.
- SCHWARZ S, SILLEY P, SIMJEE S, WOODFORD N, VAN DUIJKEREN E, JOHNSON AP, GAASTRA W (2010) Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 601-604.
- SEBBAR G, ZRO K, KICHOU F, MALTOUF AF, BELKADI B (2018) Isolation and identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* species from ruminants in six different regions in Morocco. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 8, 398-405.
- SEKER E, KUYUCUOGLU Y, KONAK S (2009) Bacterial examinations in the nasal cavity of apparently healthy and unhealthy holstein cattle. *J Ani Vet Adv*, 8, 2355-2359.
- SHAYEGH J, ATASHPAZ S, SALEHI TZ, HEJAZI MS (2010) Potential of *Pasteurella multocida* isolated from healthy and diseased cattle. *Bull Vet Inst Pulawy*, 54, 299-304.
- SHEWEN PE, WILKIE BN (1988) Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52, 30.
- SHIVACHANDRA S, KUMAR A, AMARANATH J, JOSEPH S, SRIVASTAVA S, CHAUDHURI P (2005) Cloning and characterization of *tbpa* gene encoding transferrin-binding protein (*tbpA*) from *Pasteurella multocida* serogroup B: 2. *Veterinary Research Communications*, 29, 537.
- SNOWDER G, VAN VLECK LD, CUNDIFF L, BENNETT G (2006) Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *Journal of Animal Science*, 84, 1999-2008.
- SOEHNLEN MK, KUNZE ME, KARUNATHILAKE KE, HENWOOD BM, KARIYAWASAM S, WOLFGANG DR, JAYARAO BM (2011) In vitro antimicrobial inhibition of *Mycoplasma bovis* isolates submitted to the Pennsylvania animal diagnostic laboratory using flow cytometry and a broth microdilution method. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 547-551.
- SOEHNLEN MK, AYDIN A, LENGERICH EJ, HOUSER BA, FENTON GD, LYSCZEK HR, BURNS CM, BYLER LI, HATTEL AL, WOLFGANG DR (2011) Blinded, controlled field trial of two commercially available *Mycoplasma bovis* bacterin vaccines in veal calves. *Vaccine*, 29, 5347-5354.

- STALHEIM O, PROCTOR S (1976) Experimentally induced bovine abortion with *Mycoplasma agalactiae* subsp *bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, 37, 879-883.
- STIPKOVITS L, GLÁVITS R, RIPLEY P, MOLNÁR T, TENK M, SZEREDI L (2000) Pathological and immunohistochemical studies of pneumonia in calves experimentally induced by *Mycoplasma bovis*. In: *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*. Ed. D BERGONIER, J FREY, Brussels, European Commission, p:27-30.
- STIPKOVITS L, RIPLEY PH, TENK M, GLÁVITS R, MOLNÁR T, FODOR L (2005) The efficacy of valnemulin (econor®) in the control of disease caused by experimental infection of calves with *Mycoplasma bovis*. *Research in Veterinary Science*, 78, 207-215.
- SULYOK KM, KREIZINGER Z, FEKETE L, HRIVNÁK V, MAGYAR T, JÁNOSI S, SCHWEITZER N, TURCSÁNYI I, MAKRAI L, ERDÉLYI K (2014) Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe. *BMC Veterinary Research*, 10, 256.
- SULYOK KM, BEKŐ K, KREIZINGER Z, WEHMANN E, JERZSELE Á, RÓNAI Z, TURCSÁNYI I, MAKRAI L, SZEREDI L, JÁNOSI S (2018) Development of molecular methods for the rapid detection of antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, 213, 47-57.
- SZACAWA E, SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA M, NIEMCZUK K, DUDEK K, BEDNAREK D, AYLING RD (2016) Comparison of serological, molecular and cultural diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *Animal Science Papers & Reports*, 34,
- TER LAAK E, NOORDERGRAAF J, BOOMSLUITER E (1992) The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 39, 610-616.
- THOMAS A, DIZIER I, TROLIN A, MAINIL J, LINDEN A (2002) Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Veterinary Research Communications*, 26, 333-339.
- THOMAS A, NICOLAS C, DIZIER I, MAINIL J, LINDEN A (2003) Antibiotic susceptibilities of recent isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium. *Veterinary Record*, 153, 428-431.
- THOMAS A, DIZIER I, TROLIN A, MAINIL J, LINDEN A, BALL H, BELL C (2002) Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Veterinary Record*, 151, 472-476.
- THOMAS A, SACHSE K, DIZIER I, GRAJETZKI C, FARNIR F, MAINIL J, LINDEN A (2003) Adherence to various host cell lines of *Mycoplasma bovis* strains differing in pathogenic and cultural features. *Veterinary Microbiology*, 91, 101-113.

- THOMAS A, LINDEN A, MAINIL J, DIZIER I, BASEMAN JB, KANNAN TR, FLEURY B, FREY J, VILEI EM (2004) The p40 adhesin pseudogene of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, 104, 213-217.
- THOMAS L, HOWARD C, STOTT E, PARSONS K (1986) *Mycoplasma bovis* infection in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. *Veterinary Pathology*, 23, 571-578.
- THOMSON DU, WHITE BJ (2006) Backgrounding beef cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 22, 373-398.
- THORLAKSON B, MARTIN W, PETERS D (1990) A field trial to evaluate the efficacy of a commercial *Pasteurella haemolytica* bacterial extract in preventing bovine respiratory disease. *The Canadian Veterinary Journal*, 31, 573.
- TIMSIT E, CHRISTENSEN H, BAREILLE N, SEEGER H, BISGAARD M, ASSIÉ S (2013) Transmission dynamics of *Mannheimia haemolytica* in newly-received beef bulls at fattening operations. *Veterinary Microbiology*, 161, 295-304.
- TIMSIT E, HALLEWELL J, BOOKER C, TISON N, AMAT S, ALEXANDER TW (2017) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, 208, 118-125.
- TOWNSEND KM, FROST AJ, LEE CW, PAPADIMITRIOU JM, DAWKINS HJ (1998) Development of PCR assays for species-and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1096-1100.
- TOWNSEND KM, BOYCE JD, CHUNG JY, FROST AJ, ADLER B (2001) Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 924-929.
- TSCHOPP R, BONNEMAIN P, NICOLET J, BURNENS A (2001) Epidemiological study of risk factors associated with *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 143(9), 461-467.
- TULLY JG, RAZIN S (1983) *Methods in Mycoplasmaology*, Volume I, Mycoplasma Characterization, Academic Press, New York.
- UEMURA R, SUEYOSHI M, NAGATOMO H (2010) Antimicrobial susceptibilities of four species of mycoplasma isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1007300303-1007300303.

- ULKER H, KUCUK D, CANTEKIN Z, SOLMAZ H (2012) Hatay yöresinde kesimhanede kesilen sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. *AVKAE Derg*, 2, 10-14.
- VAN DER MERWE J, PRYSLIAK T, PEREZ-CASAL J (2010) Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. *Infection and Immunity*, 78, 4570-4578.
- VANDEN TB, ROSENBUSCH R (2004) Characterization of a lympho-inhibitory peptide produced by *Mycoplasma bovis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 336-341.
- VERMA S, SHARMA M, KATOCH S, VERMA L, KUMAR S, DOGRA V, CHAHOTA R, DHAR P, SINGH G (2013) Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Veterinary Research Communications*, 37, 83-89.
- VIRTALA A-MK, GRÖHN Y, MECHOR G, ERB H, DUBOVI E (2000) Association of seroconversion with isolation of agents in transtracheal wash fluids collected from pneumonic calves less than three months of age. *Bovine Practitioner*, 34, 77-80.
- VIRTALA A, MECHOR G, GRÖHN Y, ERB H, DUBOVI E (1996) Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, 208, 2035-2042.
- WACHOWSKI C, KIRCHHOFF H (1986) Studies of sensitivity of *Mycoplasma bovis* field strains to various antibiotics and chemotherapeutics. *Berliner und Muenchener Tieraerztliche Wochenschrift* (Germany, FR), 99, 41-44.
- WAITES K (2007) *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: *Mycoplasmas and Obligate Intracellular Bacteria*. Ed. EJ BARON, PR MURRAY, ASM Press, Washington, p: 1004-1020.
- WALSON JL, MARSHALL B, POKHREL B, KAFLE K, LEVY SB (2001) Carriage of antibiotic-resistant fecal bacteria in nepal reflects proximity to Kathmandu. *The Journal of Infectious Diseases*, 184, 1163-1169.
- WANDERSMAN C, DELEPELAIRE P (2004) Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol*, 58, 611-647.
- WANG C, GLISSON J (1994) Passive cross-protection provided by antisera directed against in-vivo-expressed antigens of *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases*, 506-514.
- WATT JM, SWIATLO E, WADE MM, CHAMPLIN FR (2003) Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiology Letters*, 225, 9-14.



- WATTS JL, YANCEY R, SALMON SA, CASE CA (1994) A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 725-731.
- WELSH RD, DYE LB, PAYTON ME, CONFER AW (2004) Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994–2002. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, 426-431.
- WHITELEY L, MAHESWARAN S, WEISS D, AMES TR (1990) Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* al-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine pasteurella pneumonia. *Veterinary Pathology*, 27, 150-161.
- WILDMAN BK, PERRETT T, ABUTARBUSH SM, GUICHON PT, PITTMAN TJ, BOOKER CW, SCHUNICHT OC, FENTON RK, JIM GK (2008) A comparison of 2 vaccination programs in feedlot calves at ultra-high risk of developing undifferentiated fever/bovine respiratory disease. *The Canadian Veterinary Journal*, 49, 463.
- WILKIE B, MARKHAM R, SHEWEN P (1980) Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *American Journal of Veterinary Research*, 41, 1773-1778.
- WILKIE IW, HARPER M, BOYCE JD, ADLER B (2012): *Pasteurella multocida*: Diseases and pathogenesis. In: *Pasteurella multocida* Molecular Biology, Toxins and Infection. Ed. K AKTORIES, JHC ORTH, B ADLER, Springer, p: 1-22.
- WONG L-JC (2013) Next generation sequencing: Translation to clinical diagnostics. Springer.
- YOSHIMURA H, ISHIMARU M, ENDOH Y, KOJIMA A (2001) Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48, 555-560.
- ZECCHINON L, FETT T, DESMECHT D (2005) How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Veterinary Research*, 36, 133-156.



## **ÖZGEÇMİŞ**

### **I. Bireysel Bilgiler**

**Adı:** Mahmut Niyazi

**Soyadı:** Moğulkoç

**Doğum Yeri ve Tarihi :** Kayseri, 04.06.1984

**Uyruğu:** Türkiye Cumhuriyeti

**Medeni Durumu:** Evli

**Adres:** Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji A. D. 58140

**Telefon:** 0346 219 10 10- 2567

**E-posta:** mahmutmglkc@gmail.com

## II. Eğitim

**2003-2009:** Uludađ Üniversitesi Veteriner Fakóltesi, Bursa

**1998-2002:** Hisarcıklıoğlu Fen Lisesi, Kayseri

**Yabancı Dil:** İngilizce

## III. Mesleki Deneyim

2011- 2013 : Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü.

## IV. Yayınlar

### Araştırma Projeleri

- 1- Shiga-Toksijenik *Escherichia coli* (STEC) Teşhisi için Real Time PCR Kiti Geliştirilmesi- TÜBİTAK 3501
- 2- Anadolu mandallarının dışkı örneklerinde STEC prevalansının araştırılması- Cumhuriyet Üniversitesi BAP
- 3- *Mycoplasma bovis* saha izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılması- Cumhuriyet Üniversitesi BAP

### Bilimsel Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Sahin, S., Mogulkoc, MN., Kalin, R. and Karahan, M. Determination of the Important Toxin Genes of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat Samples, Food Handlers and Food Processing Surfaces in Turkey. Israel Journal of Veterinary Medicine, Vol. 75 (2), June 2020 (Baskı aşamasında)

Seyda ŞAHİN, Mahmut Niyazi MOĞULKOÇ, Recep KALIN. Prevalence and Serotype Distribution of *Listeria monocytogenes* Isolated from Retail Raw Meats. J Fac Vet Med Univ Erciyes, 2020;17(1): 22-27.

S. Sahin, R. Kalin, MN. Mogulkoc. Distribution of serotypes of *Listeria monocytogenes* in chicken meats in Turkey. J Hellenic Vet Med Soc 2019, 70(4): 1859-1864.

Mahmut Moğulkoç, Murat Yıldırım. Sivas yöresinde gözlenen sığır pnömoni vakalarında *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. dispar*, *M. canis* ve *M. bovirhinis* varlığının araştırılması. 2019. Turk Vet J 1(1) : 1-6.

Arslanbaş E, Şahin S, Kalın R, Mogulkoç MN, Güngör H. Analysis of Antibiotic Residues by HPLC Method in Chicken Meats Prepared for Consumption. J Fac Vet Med Univ Erciyes, 2018, 1304-7280, 15, 3, 247-252.

Seyda ŞAHİN, Recep KALIN, Emre ARSLANBAŞ, Mahmut Niyazi MOĞULKOÇ. Satışa sunulan tavuk etlerinde bazı bakteri ve indikatör mikroorganizmaların belirlenmesi. Manas J Agr Vet Life Sci, 2017, 7 (1), 47-56.

### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler**

Seyda ŞAHİN, Recep KALIN, Mahmut Niyazi MOGULKOÇ. Investigation of Other *Listeria* Species Except The *Listeria monocytogenes* in Chicken Meats. II. International Scientific and Vocational Studies Congress, Nevşehir, 05-08 July 2018.

Emre ARSLANBAŞ, Seyda ŞAHİN, Recep KALIN, Mahmut Niyazi MOGULKOÇ, Hüseyin GÜNGÖR. Analysis of antibiotic residues by HPLC method in chicken meats prepared for consumption. I. International Scientific and Vocational Studies Congress, Nevşehir, 05-08 October 2017. Sözlü sunum

Murat KARAHAN, Recep KALIN, Mahmut Niyazi MOGULKOÇ, Seyda SAHIN. Investigation of enterotoxin genes by multiplex polymerase chain reaction (mPCR) of *Staphylococcus aureus* isolated from meat samples. 4th International VETIstanbul Group Congress, 11-13 May 2017, Almaty KAZAKHSTAN. Sözlü sunum

### **Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler**

Seyda SAHIN, Recep KALIN, Emre ARSLANBAS, Mahmut Niyazi MOGULKOÇ. Determination of some bacteria and indicator microorganisms in retail chicken meats. 7. Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 4-8 Ekim 2017, Aydın.

Seyda SAHIN, Recep KALIN, Mahmut Niyazi MOGULKOÇ. Determination and molecular serotyping of *Listeria monocytogenes* strains isolated from marketed chicken meats. 7. Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 4-8 Ekim 2017, Aydın.

Recep Kalin, Mahmut Niyazi Mogulkoc, Seyda Sahin. Investigating the presence of *Listeria monocytogenes* in marketed meat samples in Sivas. 12th National Congress of Veterinary Microbiology, August 30-September 02 2016, Nevşehir.

Murat YÜKSEL, Recep KALIN, Mahmut Niyazi MOĞULKOÇ, Hakan MURAT. Sivas İlinde Süt Sığırcılık İşletmelerinde Subklinik Mastitisin Görülme Sıklığı, Etken

İzolasyonu ve Duyarlı Antibiyotiklerin Belirlenmesi. Türk Veteriner Jinekoloji Derneği Ulusal Kongresi, 15-18 Ekim 2015, Fethiye.

Murat KARAHAN, Recep KALIN, Hakan İŐIDAN, Seyda ŞAHİN, Mahmut Niyazi MOĐULKOĐ. Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji-Viroloji Anabilim Dallarının Cübp, Tagem ve Oran Kalkınma Ajansı Projeleriyle GeliŐim Süreci. XI. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi 2014, Antalya.

