

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI
YÖK 100/2000 DOKTORA BURS PROGRAMI



**SIĞIR SOLUNUM SİSTEMİ HASTALIĞI KÖKENLİ
Pasteurella multocida İZOLATLARININ AŞI SUŞU OLMA
POTANSİYELİ YÖNÜNDEN KARAKTERİZASYONU**

Doktora Tezi

Volkan Enes ERGÜDEN

Danışman

Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.028 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Volkan Enes ERGÜDEN tarafından, Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ danışmanlığında hazırlanan “SİĞİR SOLUNUM SİSTEMİ HASTALIĞI KÖKENLİ *Pasteurella multocida* İZOLATLARININ AŞI SUŞU OLMA POTANSİYELİ YÖNÜNDEN KARAKTERİZASYONU” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 6.4.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

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

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

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

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

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

15/03/2023

Volkan Enes ERGÜDEN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : SIĞIR SOLUNUM SİSTEMİ HASTALIĞI KÖKENLİ *Pasteurella multocida* İZOLATLARININ AŞI SUŞU OLMA POTANSİYELİ YÖNÜNDEN KARAKTERİZASYONU

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 15.03.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 6

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

15/03/2023

Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

ÖZET

SIĞIR SOLUNUM SİSTEMİ HASTALIĞI KÖKENLİ *Pasteurella multocida* İZOLATLARININ AŞI SUŞU OLMA POTANSİYELİ YÖNÜNDEN KARAKTERİZASYONU

Volkan Enes ERGÜDEN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı
Doktora, Nisan/2023
Danışman: Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Siğir solunum sistemi hastalıkları siğir yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip olup, *Pasteurella multocida* klinik bulguların görüldüğü siğırlardan sıkça izole edilmektedir. Bu çalışma kapsamında mezbahalarda kesim aşamasında olan ve hastalık şüpheli siğırlardan alınan akciğer örneklerinden *P. multocida* izolasyonu, karakterizasyonu ve aşı suşu olma potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışma kapsamında *P. multocida* izolasyonu için 410 adet siğırdan akciğer örnekleri alındı. *P. multocida* selektif izolasyonu için akciğer örneklerinden bakteriyolojik ekim yapıldı. *P. multocida* şüpheli olarak değerlendirilen bakterilerin genotipik identifikasyonları PCR ile gerçekleştirildi. *P. multocida* suşlarının kapsül antijenlerine göre tiplendirmesi ve patogeneizde rol oynayan virülens faktörlerine ait genler PCR ile araştırıldı. *P. multocida* izolatlarının biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak Kongo Kırmızılı Agar yöntemi ile belirlendi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile araştırıldı. *P. multocida* izolatları RAPD-PCR ile genotiplendirildi.

Akciğer örneklerinin 92 tanesinden *Pasteurella* selektif besi yerinde leylak renkli bakteri kolonisi belirlendi. PCR sonucunda 92 izolat *P. multocida* olarak identifiye edildi. Kapsüler tiplendirme ile 19 izolat serogrup A, 4 izolat serogrup B, 5 izolat serogrup D, 19 izolat serogrup E ve 1 izolat da serogrup F olarak belirlendi. İncelenen 92 adet izolatın 56, 72, 33, 65, 40, 45, 22, 28, 45, 47, 31, 0 ve 7'si sırasıyla *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB*, *fimA*, *sodC*, *ompH*, *ompA*, *tonB*, *nanH*, *nanB*, *toxA* ve *oma87* için pozitif sonuç verdi. İncelenen izolatların 52'si biyofilm oluşturma özelliği yönünden pozitif olarak değerlendirildi. İzolatların 22, 33, 10, 33, 17 ve 70'i sırasıyla danofloksasin, tilmikosin, florfenikol, sefkuinom, gentamisin, ve tetrasikline dirençli bulundu. RAPD-PCR ile genotiplendirme sonucunda serogrup A, B, D ve E'ye dâhil olan izolatların sırasıyla % 65-97, % 54-91, % 41-91 ve % 41-92 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı.

Çalışma sonucunda her serogrup için birer adet olmak üzere serogrup A-F için sırasıyla 48, 29, 25, 52 ve 69 no'lu *P. multocida* izolatları potansiyel aşı suşları olarak belirlendi. Seçilen aşı suşlarının mono- ve/veya multivalan olarak *in vivo* aşı denemelerinde kullanılmasının uygun olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Aşı, Karakterizasyon, *Pasteurella multocida*, SSH

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF *Pasteurella multocida* ISOLATES FROM BOVINE RESPIRATORY DISEASES IN TERMS OF VACCINE STRAIN POTENTIAL

Volkan Enes ERGÜDEN
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Veterinary Microbiology
Ph.D., April/2023
Supervisor: Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Bovine respiratory system diseases have an important place in cattle breeding and *Pasteurella multocida* is frequently isolated from cattle with clinical findings. In this study, it was aimed to isolate and characterize *P. multocida* from lung samples taken from cattle at slaughter stage in slaughterhouses and to evaluate their potential to become a vaccine strain.

Within the scope of the study, lung samples were taken from 410 cattle for the isolation of *P. multocida*. For the selective isolation of *P. multocida*, bacteriological cultivation was performed from lung samples. Genotypic identifications of bacteria considered as suspicious for *P. multocida* were performed by PCR. Typing of *P. multocida* strains according to capsular antigens and genes related to virulence factors that play a role in pathogenesis were investigated by PCR. Biofilm formation status of *P. multocida* isolates was determined *in vitro* by Congo Red Agar method. Antibiotic susceptibilities of isolates were investigated by Kirby Bauer Disk Diffusion Method. *P. multocida* isolates were genotyped by RAPD-PCR.

A lilac-colored bacterial colony was determined in *Pasteurella* selective medium from 92 of the lung samples. As a result of PCR, 92 isolates were identified as *P. multocida*. By capsular typing, 19 isolates were determined as serogroup A, 4 isolates as serogroup B, 5 isolates as serogroup D, 19 isolates as serogroup E and 1 isolate as serogroup F. 56, 72, 33, 65, 40, 45, 22, 28, 45, 47, 31, 0 and 7 of the 92 isolates examined were positive for *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB*, *fimA*, *sodC*, *ompH*, *ompA*, *tonB*, *nanH*, *nanB*, *toxA*, and *oma87*, respectively. 52 of the examined isolates were evaluated as positive in terms of biofilm forming. 22, 33, 10, 33, 17 and 70 of the isolates were resistant to danofloxacin, tilmicosin, florfenicol, cefquinom, gentamicin, and tetracycline, respectively. It was determined that the isolates included in serogroups A, B, D and E showed similarity of 65-97 %, 54-91 %, 41-91 % and 41-92 %, respectively by RAPD-PCR.

As a result of the study, *P. multocida* isolates numbered 48, 29, 25, 52 and 69 - determined for serogroup A-F, respectively- were selected as potential vaccine strains. It was concluded that the selected vaccine strains are suitable for use in *in vivo* vaccine trials as mono- and/or multivalent.

Keywords: BRD, Characterization, *Pasteurella multocida*, Vaccine

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

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

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Timur GÜLHAN'a, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve destek olan Prof. Dr. Arzu FINDIK'a, Anabilim Dalı'mız öğretim üyesi Prof. Dr. Oktay GENÇ'e, çalışmalarımındaki yardımları için Arş. Gör. Dr. Merve Gizem SEZENER ve Veteriner Hekim Şeyda YAMAN'a, tez süreci içerisinde numune temini açısından yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ümit ÖZCAN'a ve doktora eğitimim süresince küçük veya büyük farketmeksizin çeşitli şekillerde yardımı dokunan herkese teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her türlü koşulda maddi/manevi desteklerini esirgemeyerek bugünlere gelmemi sağlayan annem Gönül ERGÜDEN, babam İbrahim ERGÜDEN ve kardeşim Av. Musab Emir ERGÜDEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma PYO.VET.1904.21.028 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Volkan Enes ERGÜDEN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. PASTEURELLA MULTOCIDA.....	4
3.1. Taksonomi.....	5
3.2. <i>P. multocida</i> Nedenli SHH.....	6
3.3. Sığırlarda <i>P. multocida</i> Pnömonisi Patolojisi.....	7
3.4. <i>P. multocida</i> Pnömonisinin Epidemiyolojisi.....	8
3.5. <i>P. multocida</i> 'nın Virülens Faktörleri.....	11
3.5.1. Aderens ve Kolonizasyon Faktörleri.....	11
3.5.2. LPS.....	14
3.5.3. Kapsül.....	15
3.5.4. OMP.....	17
3.5.5. Demir Kontrollü Dış Membran Proteinleri	18
3.5.6. Hücre Dışı Enzimler.....	21
3.6. Sığırlarda <i>P. multocida</i> Serogrup A'ya Karşı Bağışıklık.....	21
3.7. <i>P. multocida</i> 'ya Karşı Aşı Stratejilerinin Geliştirilmesi.....	24
4. MATERYAL ve METOT.....	27
4.1. Bakteriyolojik Örnekleme.....	27
4.2. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	27
4.3. <i>P. multocida</i> İzolatlarının Kapsül Tiplendirmesi.....	28
4.4. İzolatların Virülens Genlerinin Belirlenmesi.....	29
4.5. Biyofilm Üretiminin <i>in vitro</i> Olarak Belirlenmesi.....	30
4.6. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Antibiyotiplendirme.....	30
4.7. Genotiplendirme.....	31
4.8. İstatistiksel Analiz.....	31
4.9. Aşı Suşu Seçimi.....	31
5. BULGULAR.....	32
5.1. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	32
5.2. <i>P. multocida</i> İzolatlarının Kapsül Tiplendirmesi.....	33
5.3. İzolatların Virülens Genlerinin Belirlenmesi.....	35
5.4. Biyofilm Üretiminin <i>in vitro</i> Olarak Belirlenmesi.....	45
5.5. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Antibiyotiplendirme.....	46
5.6. Genotiplendirme.....	54
5.7. İstatistiksel Analiz.....	56
5.7.1. Virülensle İlişkili Genlerin <i>P. multocida</i> Serogrupları ile İlişkisi.....	56
5.7.2. Biyofilm Özelliğinin <i>P. multocida</i> Serogrupları ile İlişkisi.....	61
5.7.3. Virülens İlişkili Genler Arası Etkileşimler.....	63
5.7.4. Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Oluşumu Arası Etkileşimler.....	65
5.7.5. Etkileşimleri Araştırılan Unsurların Yorumlanması.....	66
5.7.6. Biyofilm Oluşturma İhtimalini Belirleyen Etkenlerin İncelenmesi.....	68
5.7.7. Virülens Genleri ve Antibiyotik Direncinin Sayısal Etkileşiminin Biyofilm Yönünden İncelenmesi.....	70

5.7.8. Virölens Genleri ve Antibiyotik Direncinin Sayısal Etkileşiminin Serogruplar Yönünden İncelenmesi.....	71
5.8. Aşı Suşu Seçimi.....	74
6. TARTIŞMA	76
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKLAR	123
ÖZ GEÇMİŞ	139



SİMGELER VE KISALTMALAR

BAL	: Bronkoalveoler Lavaj
BHI	: Brain Heart Infüzyon
CRA	: Kongo Kırmızılı Agar
<i>dam</i>	: DNA Adenin Metilaz
ECM	: Hücre Dışı Matris
<i>fha</i>	: Filamentöz Hemaglutinin
<i>flp</i>	: Fimbria Benzeri Protein
Fn	: Fibronektin
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
Fur	: Ferrik Alım Regülatörü
HA	: Hiyalüronik Asit
HgbA	: Hemoglobin Bağlayıcı Protein A
Hsf	: <i>Haemophilus influenzae</i> Yüzey Fibril
IROMPs	: Demir Kontrollü Dış Membran Proteinleri
IVET	: <i>in vivo</i> Ekspresyon Teknolojisi
LPS	: Lipopolisakkarit
MDBK	: Madin-Darby Sığır Böbreği
MHA	: Mueller Hinton Agar
NPS	: Nazofaringeal Svap
OMP	: Dış Zar Proteini
PFGE	: Pulsed-Field Jel Elektroforezi
<i>pfha</i>	: <i>Bordetella pertussis</i> Filamentöz Hemaglutinin
<i>plpB</i>	: Lipoprotein B
<i>rci</i>	: Rci Rekombinaz
REA	: Restriksiyon Endonükleaz Analizi
SSHK	: Sığır Solunum Yolu Hastalığı Kompleksi
TbpA	: Transferrin Bağlayıcı Protein A
TLR	: Toll-Benzeri Reseptör
TTW	: Trakeal Yıkantı
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 5.1. <i>Pasteurella</i> selektif besi yerinde <i>P. multocida</i> kolonisi	32
Şekil 5.2. <i>P. multocida</i> tür spesifik PCR sonucu	33
Şekil 5.3. <i>P. multocida</i> kapsüler tiplendirmesi için yapılan PCR sonucu	33
Şekil 5.4. <i>P. multocida</i> izolatlarının <i>fur</i> , <i>sodA</i> , <i>pmHAS</i> , <i>plpB</i> ve <i>fimA</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler	36
Şekil 5.5. <i>P. multocida</i> izolatlarının <i>sodC</i> ve <i>ompH</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler	37
Şekil 5.6. <i>P. multocida</i> izolatlarının <i>nanH</i> ve <i>nanB</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler.....	37
Şekil 5.7. <i>P. multocida</i> izolatlarının <i>tox</i> A ve <i>oma87</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler.....	37
Şekil 5.8. <i>P. multocida</i> izolatlarının <i>ompA</i> ve <i>tonB</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler.....	38
Şekil 5.9. <i>P. multocida</i> izolatlarının CRA’da biyofilm oluşturma durumları.....	46
Şekil 5.10. <i>P. multocida</i> izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profilleri.....	49
Şekil 5.11. Serogrup A içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları.....	50
Şekil 5.12. Serogrup B içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları.....	51
Şekil 5.13. Serogrup D içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları.....	51
Şekil 5.14. Serogrup E içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları.....	51
Şekil 5.15. Serogruplandırılamayan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları.....	52
Şekil 5.16. Serogrup A içerisinde yer alan izolatların filogenetik benzerlik analizi.....	55
Şekil 5.17. Serogrup B içerisinde yer alan izolatların filogenetik benzerlik analizi.....	55
Şekil 5.18. Serogrup D içerisinde yer alan izolatların filogenetik benzerlik analizi.....	55
Şekil 5.19. Serogrup E içerisinde yer alan izolatların filogenetik benzerlik analizi.....	56
Şekil 5.20. Serogruplandırılamayan izolatların filogenetik benzerlik analizi.....	56
Şekil 5.21. Virülens ile ilişkili genlerin serogruplar arasındaki dağılımı.....	60
Şekil 5.22. İzolatların biyofilm ve serogrup karakterlerinin dağılımının şematize gösterimi.....	62
Şekil 5.23. Virülens ilişkili genlerin korelasyonu.....	64
Şekil 5.24. Antibiyotik direnci ve biyofilm korelasyonu.....	66
Şekil 5.25. Virülens ilişkili genlerin açıklanan varyansı.....	67
Şekil 5.26. Antibiyotik direnci profilleri ve biyofilm korelasyonunun açıklanan varyansı	67

Şekil 5.27. Biyofilm oluşturma özelliğine göre virülens genleri ve direnç seviyesi frekans grafiği.....	70
Şekil 5.28. Biyofilm oluşturma durumuna göre virülens geni sayısı ve biyofilm oluşturma durumuna göre antibiyotik direnci sayısı kutu grafikleri	70
Şekil 5.29. Serogruplar arası virülens genleri ve direnç seviyesi frekans grafiği	72
Şekil 4.30. Serogruplar arası virülens geni sayısı ve serogruplar arası antibiyotik direnci sayısı kutu grafikleri	73



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 4.1. İzolatların PCR ile identifikasyonu için kullanılan oligonükleotit primerler...	28
Tablo 4.2. <i>P. multocida</i> izolatların kapsül tiplendirmesi için kullanılan oligonükleotit primerler	28
Tablo 4.3. <i>P. multocida</i> izolatlarında araştırılan virülens genleri.....	29
Tablo 5.1. <i>P. multocida</i> kapsüller tiplendirme sonuçları	34
Tablo 5.2. <i>fur</i> , <i>sodA</i> , <i>pmHAS</i> , <i>plpB</i> ve <i>fimA</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü.....	35
Tablo 5.3. <i>sodC</i> ve <i>ompH</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü.....	35
Tablo 5.4. <i>nanH</i> ve <i>nanB</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü.....	35
Tablo 5.5. <i>toxA</i> ve <i>oma87</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü.....	36
Tablo 5.6. <i>ompA</i> ve <i>tonB</i> genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü.....	36
Tablo 5.7. <i>P. multocida</i> izolatlarının <i>fur</i> , <i>sodA</i> , <i>pmHAS</i> , <i>plpB</i> ve <i>fimA</i> gen profilleri.....	38
Tablo 5.8. <i>P. multocida</i> izolatlarının <i>sodC</i> , <i>ompH</i> , <i>ompA</i> , <i>tonB</i> , <i>nanH</i> , <i>nanB</i> , <i>toxA</i> ve <i>oma87</i> gen profilleri.....	40
Tablo 5.9. <i>P. multocida</i> serogruplarının <i>fur</i> , <i>sodA</i> , <i>pmHAS</i> , <i>plpB</i> ve <i>fimA</i> gen profilleri.....	42
Tablo 5.10. <i>P. multocida</i> serogruplarının <i>sodC</i> , <i>ompH</i> , <i>ompA</i> , <i>tonB</i> , <i>nanH</i> , <i>nanB</i> , <i>toxA</i> ve <i>oma87</i> gen profilleri.....	42
Tablo 5.11. <i>P. multocida</i> izolatlarının virulotiplendirilmesi	43
Tablo 5.12. <i>P. multocida</i> izolatlarının biyofilm oluşturma durumları.....	45
Tablo 5.13. <i>P. multocida</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri.....	46
Tablo 5.14. <i>P. multocida</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.....	48
Tablo 5.15. <i>P. multocida</i> izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profilleri.....	49
Tablo 5.16. <i>P. multocida</i> izolatlarının kalitatif antibiyotiplendirmesi ve karşılaştırmalı değerlendirme.....	52
Tablo 5.17. Serogruplar ile genler arası anlamlılık tablosu.....	57
Tablo 5.18. Biyofilm ve serogrup ilişkisi.....	61
Tablo 5.19. Serogruplar arası farklılığın biyofilm açısından değerlendirilmesi.....	63
Tablo 5.20. Biyofilm oluşturma tahmini ihtimalinin lojistik regresyonu.....	69
Tablo 5.21. Potansiyel aşı suşu olarak seçilen <i>P. multocida</i> izolatlarının karakterizasyon sonuçları.....	75

1. GİRİŞ

Sığır solunum yolu hastalığı kompleksi (BRDC, SSHK) sığırlarda pnömoni nedeni morbidite ve mortalitenin en önemli etkenlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. SSHK içerisinde tanımlanmakta olan bakteriyel etkenlerin çoğu diğer predispozan çevresel faktörlerin, fizyolojik stres faktörlerinin veya eş zamanlı enfeksiyonların varlığı ile enfeksiyona neden olmaktadır. SSHK'ya neden olan bakteriyel etkenlerin en yaygın olarak görülen ve en ciddi kayıplara neden olanı *Pasteurella multocida* olarak bildirilmektedir. *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* ve *Mycoplasma bovis* de SSHK'nın diğer önemli bakteriyel patojenleri olarak tanımlanmaktadır. Bu bakteriyel patojenler tek başlarına enfeksiyona neden olabilecekleri gibi ortak enfeksiyonlar da meydana getirebilirler. Enfeksiyon oluşumunda birbirlerinden farklı birçok virülens ve patojenite faktörünün rol oynamasının yanı sıra, neden oldukları pnömonik lezyonlar benzerlik gösterebilir. SSHK üzerine ulusal ve uluslararası düzeyde birçok çalışma bulunmakla beraber, çalışmalar genellikle bu patojenlerin epidemiyolojisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Mevcut literatürde aşı geliştirme ve korunma stratejileri üzerindeki bilgiler yetersizdir. Bu nedenle de hastalıktan korunma ve tedavi uygulamaları tam anlamıyla etkili olamamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Sığır solunum yolu hastalığı kompleksi “shipping fever (nakliye ateşi)” olarak da adlandırılmakta olup, sığır endüstrisi için küresel düzeyde büyük ekonomik öneme sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri besicilik endüstrisi yıllık zararının 1 milyar dolar olduğunu tahmin etmektedir. Bu zararın sebepleri arasında üretim kaybı, artan işçilik giderleri, ilaç maliyetleri ve sığır solunum yolu hastalığı gösterilmektedir (Hodgins and Shewen, 2004). ABD'de besi sığırlarına yönelik mevcut pazarlama sistemi, bu hayvanlar üzerinde doğal olarak strese neden olmaktadır. Çoğu buzağı süten kesildikten sonra, başka bilinmeyen sığırlarla ve aşılı veya aşısız sığırlarla birlikte satışa gönderilmektedir. Uzun mesafeler boyunca taşınan buzağılar egzoz dumanı, hava koşullarına bağlı olarak soğutma veya aşırı ısınma, dehidratasyon, açlık ve bitkinlik gibi ek stres faktörlerine maruz kalmaktadırlar (Rice et al., 2008). Besleme alanına alınan sığırların yukarıda sayılan stres faktörlerine ek olarak yemlere çeşitli eklemelerin yapılması, yemlerin işlenmesi, yeni yemlerin kullanılması, tozlu ortamlar ve suya erişim de yer almaktadır. Satış için ayrılmış ahırlardaki buzağılarda yapılan bir çalışmada, nakliye ve soğuk stres faktörlerinin serum kompleman aktivitesinde bir azalmayla birlikte plazma kortizol düzeylerinde geçici bir yükselmeye neden olduğu tespit edilmiştir (Rice et al., 2008). Bu faktörler sıklıkla konakçının SSHK'ya olan duyarlılığını artırabilmektedir.

SSHK, önemli bakteriyel etkenleri arasında *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* ve *M. bovis*'in yer aldığı, sığırların enfeksiyöz bir solunum yolu hastalığıdır. Hastalığın patogenezi, stres ve konakçı bağışıklık sistemini sıklıkla baskılayan ve bu bakterilerin üst solunum yolunda hızla üremesine izin veren olası viral veya parazitik enfeksiyonlar gibi birçok faktörü içermektedir. Başlatıcı olaylardan bağımsız olarak, *M. haemolytica*'nın SSHK ile ilişkili baskın bakteriyel patojen olduğu düşünülmektedir.

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin ilk savunma hattı, SSHK ile ilişkili patojenlerin enfeksiyonunu önlemek için mekanik, kimyasal ve mikrobiyolojik bariyerler sağlayan solunum yolu epiteli yüzeyidir (Frank et al., 1995). Sağlıklı ve stresli buzağılarda burun kültürleri, *M. haemolytica* ve diğer *Pasteurellaceae* gibi patojenler dâhil olmak üzere birçok fırsatçı bakteri içermektedir. Stres altındaki buzağılarda burun kültürlerinde bu bakterilerin yoğunluğu daha yüksek olmaktadır (Lillie, 1974). Bakteriler, akciğerlere damlacıklar yoluyla alındıktan sonra epitel

yüzeyine yapışabilir ve kolonize olabilirler. Bu enfekte yüzeyler, yüzeyi kaplayan ve bakterilerin yapışmasını önleyen mukus salgılamaktadırlar. Trakea epitelyal silyaları, potansiyel patojenleri çıkarmak için mukusun sürekli bir yukarı doğru hareketini sağlamaktadır. Akciğerde, epitel yüzeyler ayrıca sürfaktan proteinleri A ve D'nin yanı sıra defensin peptitleri ile de kaplanırlar (Frank et al., 1995). Bu bakterisidal proteinler ve peptitler ayrıca patojenlerin yüzeyine yapışarak onları yerleşik makrofajlar ve nötrofiller tarafından fagositoza daha duyarlı hale getirmektedirler. Bu şekilde 4 saat içinde sağlıklı hayvanlardan inhale edilen bir bakteri dozunun % 90'ını temizleyebilmektedirler (Potgieter, 2004).

Sığırlarda pnömonik akciğer dokularında SSHK ile bağlantılı olarak izole edilen başka bakteriyel etkenler de bulunabilmektedir. Bu bakterilere örnek olarak *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella* ve *Mycoplasma* cinsine ait diğer türler kadar stafilkokoklar, streptokoklar ve birçok enterik bakteri verilmektedir. Bu bakteriyel etkenler oportunistik patojen olarak ya da kronik pnömoni için uzun süreli antibiyotik tedavi sonrası komplekse dâhil olabilmektedirler. Bu bakteriler enfeksiyon süreci sonrasında sağ kalan hayvanların nekrotik dokularını da kolonize edebilirler. Normal üst solunum yolu florasında bulunabilmeleri nedeniyle bazen enfeksiyon ile ilişkisiz olarak da izole edilebilmektedirler.

SSHK etiyolojisinde patojen bakterilerin yanı sıra bazı virüsler de rol oynamaktadır. *M. bovis*'in, bir virüs veya bakteri ile koenfeksiyonun, enfeksiyona neden olan bakterilerin epitel yüzeyin temizlenmesini bozduğu ve solunum yolunda lezyonlara neden olduğu ileri sürülmüştür. Örneğin, sığır viral ishal virüsü (BVDV), alveolar makrofajlar içerisinde çoğalır ve onların işlevini bozarak ve/veya bu anahtar immun sistem hücrelerini yok ederek immunsupresyona neden olur (Babiuk et al., 2004). Sığır solunum sinsityal virüsü (BRSV) enfeksiyonunun göreceli virülensi yaşa ve bağışıklık durumuna bağlıdır. Genellikle sığırlar asemptomatiktir. Burun boşluğu, farinks, trakea, bronşlar ve bronşiyol epitel hücrelerinin primer enfeksiyonuna, bronş ve bronşiyal epitel hücrelerinin silya kaybına veya nekrozuna neden olmaktadır. Mukosiliyer klirensin azalması nedeniyle, hava yollarında ve alveollerde sıvı ve hücresel kalıntı birikmesi bakteri kolonizasyonu için ideal bir ortam sağlamaktadır. BRSV ayrıca alveoler makrofajlar tarafından fagositozu ve opsonizasyonu da bastırmaktadır.

Bovine herpes virus-1 (BHV-1) başlangıçta üst solunum yollarının epitel hücrelerini enfekte etmektedir ve daha sonra alt solunum yoluna yayılmaktadır. Üst solunum yollarının mukozasında etkisiz mukosilyer klirens ve lezyonlara neden olan epitel hücrelerinin nekrozu sekonder bakteri enfeksiyonlarını şiddetlendirmektedir (van Vuuren, 2004).

Parainfluenza tip-3 (PI-3) virüs enfeksiyonları, sığırlarda çok az klinik semptom göstermektedir veya hiç klinik semptom göstermemektedir. Ancak PI-3, akciğer dokusunu sekonder bakteriyel enfeksiyonlara yatkın hale getirmektedir. Birincil enfeksiyonlar, trakea, bronşlar ve alveollerdeki epitel hücrelerinde meydana gelmektedir ve silyer epitelyumun nekrozuna neden olmaktadır. Bu durum, hava yollarından sıvı, toz ve hücresel artıkların mukosilyer temizlemesinin etkisiz kalmasına neden olmaktadır. Klinik hastalığın gelişimi, stres ve diğer viral veya bakteriyel patojenler tarafından ikincil enfeksiyonlara maruz kalma ile ilişkilidir (Songer et al., 2005). Bu faktörler, tek tek veya kombinasyon halinde, bozulmuş halde bulunan doğal bağışıklık tepkileri nedeniyle, kalıcı bakteriyel enfeksiyonlara olanak sağlayabilmektedirler.

3. PASTEURELLA MULTOCIDA

Pasteurella multocida Gram-negatif patojenik bir bakteridir. Üç alt tür, beş kapsüler serogrup ve 16 serotip olarak sınıflandırılmaktadır. *P. multocida* serogrup A, sığır nazofaringeal komensalleri olmakla birlikte, sığır patojenleridir ve SSHK içerisinde yer alırlar. Genç süt buzağlarının hem enzootik buzağı pnömonisi hem de sütten kesilmiş sığırların strese bağlı solunum pastörellozuna karşı bağışıklık henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, dış zar proteinlerine (OMP) karşı yüksek serum antikor seviyelerinin direnci arttırmak için önemli olduğu görülmüştür. *P. multocida* A:3, SSH'den izole edilen en yaygın serotiptir. Bu izolatlar, OMP profilleri ve ribotipleme temel alınarak sınırlı heterojenliğe sahiptirler. *P. multocida* kaynaklı pnömoninin gelişimi, eş zamanlı veya predispozan viral veya bakteriyel enfeksiyonların yanı sıra nakliye, hayvanları birbirleri ile karıştırma ve oluşturulan hayvan gruplarındaki sayının fazla olması gibi çevresel ve stres faktörleri ile ilişkilidir. Akciğer lezyonları, göğüs zarı yangısının olduğu veya olmadığı akut-subakut bronkopnömoni ile seyretmektedir. Sığır solunum yolu izolatları için adezyon ve kolonizasyon faktörleri, demirle düzenlenmiş ve edinim proteinleri, nöraminidaz, lipopolisakkarit, polisakkarit kapsül ve çeşitli OMP'ler gibi hücre dışı enzimler, çok

sayıda virölens veya potansiyel virölens faktörleri tanımlanmıştır. Sığırların solunum sistemi pastörellozuna karşı bağışıklık tam olarak anlaşılamamakla beraber OMP'lere karşı yüksek serum antikor seviyeleri, bakterilere karşı direnci arttırmak için önemli olduğunu göstermektedir. Sığırlarda mevcut olan *P. multocida* aşılı, ağırlıklı olarak inaktif ve/veya canlı streptomisine bağımlı bir mutanttan oluşmaktadır.

3.1. Taksonomi

Pasteurella ilk kez 1880'de tavuk kolerasının etkeni olarak Pasteur tarafından izole edilmiştir. Günümüze gelineceye kadar taksonomisi ve isimlendirilmesi, birçok değişikliğe uğramıştır. Yaklaşık yarım yüzyıl sonra (1929'da), ortak biyokimyasal ve morfolojik özelliklere sahip bakteriler *Pasteurella septica* ve daha sonra 1939'da *Pasteurella multocida* olarak isimlendirilmiştir (Fajfar-Whetstone et al., 1995). Mutters vd. (1985), *Pasteurella* cinsinin üyelerini, *P. multocida* dâhil olmak üzere 11 türe ayırmıştır. Bunların içinde şeker fermentasyonuna göre üç tür olarak *P. multocida*, *P. septica* ve *P. gallicida* tanımlanmıştır. *P. multocida* subsp.'yi daha iyi ayırt etmek için M13 primerini kullanan ve alfa-glukosidaz aktivitesine dayanan moleküler teknikler de geliştirilmiştir (Hunt Gerardo et al., 2001). *Pasteurella sensu stricto* cinsinin en önemli patojenik üyesi olan *P. multocida* birçok yabani ve evcil hayvan türünü içeren geniş bir konak spektrumuna sahiptir. *P. multocida* subsp. *gallicida* ve *P. multocida* subsp. *septica* sırasıyla kümes hayvanlarından ve evcil hayvanlardan spesifik olarak izole edilmiştir (Mutters et al., 1985). Capitini vd. (2002) tarafından kaplan ısırıkları ile ilişkili olarak fenotip ve 16S rRNA gen dizisi karşılaştırması sonucunda dördüncü alt tür olmak üzere *P. multocida* subsp. *tigris* izolatları tanımlanmıştır.

P. multocida'nın kapsül yapısı ve lipopolisakkarit (LPS) bileşimi, bakterinin sırasıyla serogrup ve serotip sınıflandırılmasının temelini oluşturmaktadır (Rimler and Rhoades, 1989). Pasif hemaglutinasyon ve jel difüzyon presipitasyon testleri geleneksel olarak *P. multocida*'yı beş kapsül grup (A, B, D, E ve F) ve 16 somatik serotip (1-16) olarak sınıflandırmak için kullanılmıştır. Serogrup A ve daha az ölçüde serogrup D, tavuk kolerasına neden olmaktadır (Rhoades and Rimler, 1989). Serogrup F suşları ağırlıklı olarak hastalıklı kümes hayvanlarından, özellikle hindilerden ve daha yakın zamanda buzağılardaki ölümcül bir fibrinöz peritonit vakasından izole edilmiştir (Catry et al., 2005). Domuzlarda, atrofik rinit ve pnömoni tablosu esas olarak sırasıyla serogrup D ve serogrup A'nın toksijenik suşları ile ilişkili bulunmuştur (Dungworth,

1985). *P. multocida* serogrup B ve serogrup E, Afrika ve Asya'nın tropik bölgelerindeki sığır ve su mandalarındaki hemorajik septisemi ile ilişkilidir (Shewen and Conlon, 1993). Kuzey Amerika'da B ve E serogrupları sığırlardan nadiren izole edilmiştir (Confer, 1993). Dünya çapında *P. multocida* serogrup A izolatları SSH'nin en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Rimler and Rhoades, 1989).

3.2. *P. multocida* Nedenli SSH

P. multocida, neonatal buzağı (enzootik) pnömonisi ve etçi sığır pnömonisi dâhil olmak üzere SSHK olarak tanımlanan klinik sendromlarla ilişkili primer bakteriyel patojenlerden birisidir (Welsh et al., 2004). Her iki sendrom da çok faktörlü olarak kabul edilmektedir. Birden fazla bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan faktör hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır.

P. multocida akciğer dokusundan, nazofaringeal svaplardan (NPS) ve trakeal yıkantı (TTW) sıvılarından izole edilmiş ve bu durum da solunum yolu hastalığının nedeni olarak gösterilmesinde önemli rol oynamıştır (Catry et al., 2006). Süt buzağılarını kapsayan çok sayıda çalışma *P. multocida* prevalansının *M. haemolytica*'ninkine göre çok daha yüksek olduğunu göstermektedir. Nikunen vd. (2007), Finlandiya'da solunum yolu hastalığı klinik belirtileri olan SSH'li buzağılarda *P. multocida* varlığı ile serum akut faz proteinlerinin yüksek konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Bu durum buzağuların solunum yolu hastalıklarında *P. multocida*'nın önemli bir patojen olduğunu göstermektedir. *Mycoplasma* sp. dâhil diğer patojenler için ise anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Bakteri, mikoplazma ve viral patojenlerin araştırıldığı bir çalışmada 280 farklı süt çiftliğinden 396 buzağı incelenmiş ve *P. multocida*'nın en sık izole edilen bakteriyel patojen olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca trakeobronşiyal lavaj örneklerinden izolasyon oranları sırasıyla sağlıklı, şüpheli veya hastalıklı buzağılardan % 26,4, % 32,6 ve % 42,3 olarak tespit edilmiştir (Autio et al., 2007). Buzağı solunum yolu hastalığı izolatı *P. multocida* suşlarının % 75'inde indol reaksiyonu negatif olarak tespit edilmiştir. İndol negatif fenotiplerin bu kadar yüksek oranda bulunması *P. multocida* izolatlarının hastalıktaki rolünün araştırılması gerektiğini göstermiştir.

P. multocida nakliye ateşi olgularında da rol oynamaktadır. Bakteri, çok sayıda araştırmacı tarafından besi sığırlarının akciğerlerinden izole edilmiştir (Welsh et al., 2004; Gagea et al., 2006). Gerçekten de *M. haemolytica*, nakliye ateşinden sık izole

edilen bir bakteri olmakla birlikte, *P. multocida* ile birlikte bulunduklarında ölümcül solunum yolu vakalarının oranı artmaktadır. Bu artışın nedenleri arasında patojenler arasındaki virülens değişiklikleri, antimikrobiyal ajanların etkinliği ve hasta sığırların tanımlanması ve/veya yönetimindeki değişiklikler bildirilmiştir. *P. multocida*, hasta hayvanların nazal veya nazofarengeal svap, transtrekeal yıkantı ve/veya bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinden izole edilmiş ve birden çok bölgeden izole edilen bakteri türleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (DeRosa et al., 2000). SSH ile ilişkili *P. multocida*, BAL sıvısından % 40 oranında izole edilmiştir (Allen et al., 1992). Bununla birlikte, burun ve farenksde *P. multocida*'nın varlığı veya yokluğu hastalık tanısı için yeterli görülmemektedir (Allen et al., 1991). Benzer şekilde, serokonversiyon da buzağılarda hastalık tanısı için yeterli değildir (Virtala, et al., 2000). Bu bulgular *P. multocida*'nın kommensal olarak hem sağlıklı hem de hasta sığırlarda bulunabileceğini göstermiştir. Fakat hasta bir buzağıda burun, trakea veya bronşiyollerde (özellikle çok sayıda) varlığının belirlenmesi hastalık sürecine katılımını kuvvetle göstermektedir.

SSH vakalarından izole edilen *P. multocida* suşlarında serogrup ve serotip spesifitesi hakkında literatürde sınırlı bilgi olmasına rağmen, bildirilen veriler SSH vakalarından en sık *P. multocida* serogrup A suşlarının izole edildiğini açıkça ortaya koymuştur (Autio et al., 2007; Nikunen et al., 2007). Blanco-Viera vd. (1995), pnömonik akciğer lezyonlarından izole edilen *P. multocida*'nın % 61 ve % 25'inin sırasıyla kapsüler A ve D gruplarına ait olduğunu ve en sık da serotip A:3'ün (% 77) olduğunu göstermiştir. Kumar vd. (2004), Hindistan'daki farklı hayvan türlerinden alınan numunelerde *P. multocida* serotiplerinin prevalansını araştırmıştır. *P. multocida* için pozitif bulunan sığır örnekleri ağırlıklı olarak serotip A:3 olarak tiplendirilmiştir. Benzer olarak pnömonili sığır kökenli *P. multocida* izolatlarının % 80 oranında serotip A:3 olduğu bildirilmekle beraber (Dabo et al., 1997), son yıllarda sığırlardan izole edilen *P. multocida*'nın % 92'sinden fazlasının serogrup A olduğu rapor edilmiştir (Ewers et al., 2006).

3.3. Sığırlarda *P. multocida* Pnömonisi Patolojisi

P. multocida ile ilişkili sığır pnömonisini genç süt buzağılarında, sütten kesilmiş ve nakil edilen besi sığırlarında *M. haemolytica* ve *H. somni* gibi diğer sığır bakteriyel patojenleriyle ilişkili pnömoniden ayırt etmek genellikle zordur. Dungworth (1985) bronkopnömonilere *P. multocida*'nın *M. haemolytica* 'ya göre daha sık neden olduğunu

belirtmiştir. Aslında bu patojenlerin birden fazlasının solunum virüsleri ve/veya *Mycoplasma* spp. ile birlikte pnömonik akciğerlerden izolasyonu sık görülmektedir (Gagea et al., 2006). Bu durum *P. multocida*'nın sığır pnömonisinde primer patojen olup olmadığının sorgulanmasına neden olmuştur (Lopez, 2007). Tek başına *P. multocida* ile sığır pnömonisinin deneysel olarak oluşturulabilmesi ve diğer enfeksiyöz etkenler olmadan doğal sığır pnömonisi vakalarından izolasyonu genç veya stres altındaki sığırlarda birincil patojen olarak ortaya çıkabileceğini göstermektedir.

P. multocida nedenli sığır pnömonisinde pulmoner patolojik değişiklikler farklı şekillerde tanımlanmaktadır. Bu tanımlamalar diğer enfeksiyöz ajanların var olmasına bakılmaksızın lezyonun türünü yansıtmaktadır. Lezyon genel olarak tipik bir kranioventral bronkopnömoni olarak karakterize edilmiştir (Lopez, 2007). Ayrıca lezyon ve eksüdat tipi ile ilişkili olarak bronkopnömoni akut fibrinosüpuratif, (Gagea et al., 2006), kronik fibrinopürülene (Mosier, 1997) ve fibrinonekrotizan (Tegtmeier et al., 1999) karakterde olabilmektedir. Fibrinopürulent plörit, ödem, fibrin ve/veya apse varlığı nedeni ile genişleyen interlobüler septum da *P. multocida* enfeksiyonunda görülebilmektedir (Lopez, 2007).

Histolojik değişiklikler tipik olarak az miktarda fibrin ile nötrofiller, makrofajlar ve nekrotik epitel ile dolu bronşlar ve bronşiyollerden oluşmaktadır (Lopez, 2007). Benzer eksüdat, özellikle enfeksiyonun erken evrelerinde en ciddi şekilde etkilenen peribronşiyolar alveollerde bulunmaktadır. Akut lezyonlarda eksüdat karakteri, kronik lezyonlara kıyasla daha yüksek oranda nötrofil ve daha düşük makrofaj oranına sahiptir. Genellikle intraalveoler kanama da görülmektedir (Haritani et al., 1989). *P. multocida* antijeni alveolar lümenlerde, nötrofiller ve makrofajlar içinde tespit edilmiştir (Dowling et al., 2004). İnterlobüler lenfatikler fibrinözden fibrinopürülene kadar değişen karakterde eksüdat içerebilir. Nadiren büyük nekroz ve apse odakları da tanımlanmıştır (Ishiguro et al., 2005). Bununla birlikte, doğal sığır pnömonisi vakaları üzerine yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, apselerin *P. multocida*'dan ziyade, *M. haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes* veya *M. bovis* enfeksiyonları ile daha sıkı ilişkili olduğunu göstermiştir (Gagea et al., 2006).

3.4. *P. multocida* Pnömonisinin Epidemiyolojisi

P. multocida ile ilişkili solunum yolu hastalığının epidemiyolojisi hakkında literatürde sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunun nedeni organizmanın doğada

yaygın olarak bulunabilmesidir. Üst solunum yolunda kommensal olarak bulunabilmesi nedeniyle, bu bölgeden izolasyonu hastalığın tanısı için yeterli değildir. Pnömoniye karışmasının doğrulanması için ölüm öncesi veya sonrasında TTW veya BAL'dan kültür yapılması gerekmektedir. *P. multocida*'nın özellikle süt buzağı pnömonisinde *Mycoplasma* türleri ile sinerjistik bir ilişkisi vardır (Hirose et al., 2003). Enfeksiyon *H. somni* (Gagea et al., 2006), *M. haemolytica* (Fulton et al., 2000), coronavirus, adenovirus, parainfluenza-3 virüsü ve sığır solunum sinsityal virusu dâhil olmak üzere diğer patojenlerle birlikte görülebilmektedir. Finlandiya'da yapılan bir çalışmada *P. multocida*, pnömonili hayvanlara ait BAL'dan yaygın olarak izole edilmiş ve hastalığa neden olan üç patojenden biri olduğu bildirilmiştir (Autio et al., 2007). Bununla birlikte, *P. multocida* ile birlikte başka bir patojen varlığı ile klinik hastalık tablo değişimi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu durum da Maheswaran vd. (2002) tarafından araştırılmış ve *P. multocida*'nın fırsatçı bir patojen olduğu sonucunu kabul etmelerine yol açmıştır. Buna karşılık Finlandiya'da yapılan başka bir çalışmada *P. multocida*'nın klinik belirtiler ve yüksek serum akut faz proteinleri ile pozitif ilişkili tek etken olduğunu bildirmişlerdir (Nikunen et al., 2007). Araştırmacılar, bilinen diğer patojenlerin olmadığı durumlarda, Finlandiya'daki buzağılarda *P. multocida*'nın solunum yolu hastalıklarında güçlü bir patojenik rol oynadığı sonucuna varmışlardır.

P. multocida'nın her yerde bulunması nedeniyle bulaşmayı değerlendirmek için bakteri izolatları arasında ayırım yapılmalıdır. Serotiplendirme ve serogruplandırma dâhil olmak üzere klasik ayırım yöntemleri ayırım için yetersiz kalmaktadır (Wilson et al., 1992). Purdy vd. (1997), 8 yıl boyunca birçok yerden toplanan 61 tane *P. multocida* izolatını karşılaştırmıştır. Bu karşılaştırmayı yaparken enzimatik aktivite kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Ortaya çıkan profillerin değerlendirilmesi sonucunda ortak bir klona dair hiçbir kanıt bulunamamıştır. Bulaşma sorununa bir başka fenotipik yaklaşım, antimikrobiyal direncin değerlendirilmesidir. Catry vd. (2006), bir çiftlikte 5 buzağının nazofarenksinde tetrasikline dirençli *P. multocida* izole etmişler ancak 15 çiftlikteki diğer 56 buzağıda dirençli *P. multocida* tespit edememişlerdir. Hiçbir çiftlikte tetrasiklin kullanılmamıştır. Araştırmacılar, beş izolatın klonal olduğunu ve yatay geçişi gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Yapılan geniş ölçekli bir retrospektif çalışmada, *P. multocida* izolatları arasında antimikrobiyal dirençte bölgesel farklılıklar olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur (Singer et al., 1998). İzolatların klonal olup olmadığını veya antimikrobiyal direnç mekanizmasının tutarlı olup olmadığını

değerlendirmek için başka bir inceleme yapılmamıştır. Tetrasiklin direncinin genotipik temelini araştıran başka bir çalışmada, oksitetrasiklinin profilaktik olarak verildiği tek bir çiftlikten 6 tane *Pasteurella* ve *Mannheimia* izolatu elde edilmiştir (Kehrenberg et al., 2005). Direnci kodlayan ve mutasyonu az olan veya hiç olmayan direnç geni çok sayıda bakteri türünde bulunmuştur. Araştırmacılar, *Pasteurella* ve *Mannheimia*'nın büyük bir olasılıkla buzağılar arasında bulaştığı sonucuna varmışlardır.

Pasteurella izolatlarının tiplendirilmesi ve epidemiyolojisinin belirlenmesi için kullanılan moleküler teknikler arasında restriksiyon endonükleaz analizi (REA), ribotiplendirme, rRNA'nın sekanslanması, polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu (PCR parmak izi), pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ve multilokus sekans analizi bulunmaktadır. Ayrıca kapsüler tiplendirme ve dermonekrotoksin kodlayan genin varlığını analiz için PCR kullanılmaktadır. Bu tekniklerin her birinin hem avantajları hem de dezavantajları vardır. PFGE, moleküler epidemiyolojinin "altın standardı" olarak kabul edilmektedir (Olive and Bean, 1999). Zaman alıcı olması ve daha yüksek ekipman maliyetleri nedeniyle çok az araştırmacı *P. multocida*'yı incelemede kullanmıştır. Ribotiplendirme ve rRNA sekanslaması, *P. multocida* izolatları arasındaki farkları tanımlamadaki diğer yaklaşımlara kıyasla daha az duyarlı bulunmuştur (Dziva et al., 2004). Çeşitli araştırmacılar ise *P. multocida*'nın hayvan türleri arasındaki epidemiyolojik araştırması için PCR parmak izini kullanmışlardır (Dabo et al., 2000; Dziva et al., 2004). Epidemiyolojik çalışmalarda genellikle bu yaklaşımların bir kombinasyonu veya hücresel karakterizasyon yöntemleri (tüm hücre protein profilleri, OMP profili, vb.) kullanılmıştır. Davies vd. (2003a), domuz pnömonisi kökenli *P. multocida* izolatlarını karşılaştırmak için OMP profilleri, kapsüler tiplendirme ve dermonekrotoksin varlığını kullanmışlardır. İzolatlar arasında çeşitliliğin az olduğunu bildirmişler ve hastalıktan sorumlu birkaç virulan klon olduğunu öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, kanatlı izolatları benzer tekniklerle (kapsüler tiplendirme ve OMP profilleri) incelendiğinde, kanatlı hayvanlarda *P. multocida*'nın fırsatçı enfeksiyonu temsil ettiği bildirilmiştir (Davies et al., 2003b). Davies vd. (2003a), multilokus sekans analizi, OMP profili oluşturma ve rRNA sekanslama kombinasyonu kullanarak sığız izolatlarını incelemişler ve farklı coğrafi bölgelerden elde edilen sığız izolatlarında bile baskın olan sadece sınırlı sayıda OMP türü bulmuşlardır. Bu nedenle, az sayıda klonun belirgin bir şekilde hastalığa neden olma kapasitesine sahip olduğu düşünülmüştür. Dabo vd. (1999) ribotiplendirme

yapmak suretiyle, tekniğin bazı sınırlamalarını da göz önüne alarak, farklı coğrafi bölgelerdeki izolatlar arasında çok az heterojenite bulmuşlardır, ancak bunun önemini ortaya koyamamışlardır. Davies vd. (2003a) tarafından incelenen izolatların tamamı hastalıklı hayvanlardan izole edilmişken, Dabo vd. (1999) sağlıklı ve hastalıklı sığırlardan elde edilen izolatları incelemişler ve burun pasajına kıyasla hastalıklı hayvanların akciğerlerinden elde edilen izolatların ribotiplerinde bazı varyasyonlar bulmuşlardır. Bu duruma kommensal ve patojenik izolatlar arasındaki mevcut farklılıkların neden olabileceğini bildirmişlerdir.

3.5. *P. multocida*'nın Virülens Faktörleri

SSH enfeksiyonunun klinik bulgularını ve şiddetini belirleyen en önemli unsurlar sahip oldukları virülens faktörleri ve *P. multocida*'nın karakteristik özellikleridir. Hastalığa neden olan *P. multocida* serotip A izolatları ile ilişkili birçok virülens faktörü bulunmaktadır.

3.5.1. Aderens ve Kolonizasyon Faktörleri

Adezyon/yapışma bakteriyel enfeksiyonlar için birincil ön koşuldur. Yapışmaya katılan ligandlar ise potansiyel virülens faktörleridir. Enfeksiyonun erken safhasında bakteriyel aderense iştirak eden *P. multocida* genlerinin belirlenmesi, *P. multocida*'nın moleküler patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Konak-patojen etkileşimindeki değişiklikler, büyük olasılıkla, kommensal ve patojenik *P. multocida* arasındaki farklılıkların nedeni olmaktadır. Kommensal ve patojenik *P. multocida* arasındaki moleküler farklılıklar tam net olmamakla beraber, mekanizmalar açık bir şekilde ikincisinin, büyük olasılıkla toll-benzeri reseptör (TLR) sinyali yoluyla enflamatuvar tepkileri indüklemeye yeteneğini içermektedir. TLR sinyali, bakteriyel tanıma, öldürme ve adaptif bağışıklığın aktivasyonu yoluyla enfeksiyona karşı ilk savunma hattını sağlayan, doğuştan gelen konak savunması için çok önemlidir. Çünkü artan sayıda bakteriyel adezinin proenflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu için TLR'ye bağlı olduğu bildirilmiştir (Inatsuka et al., 2005; Fischer et al., 2006). Birçok çalışmada, farklı *P. multocida* izolatlarının farklı hücre tiplerine, dokulara veya organlara adezyonu incelenmiş ve serogruplara özgü konak tercihinin ve patojenitesinin olduğu gösterilmiştir (Al-Haddawi et al., 2000; Borrathybay et al., 2003; Ali et al., 2004).

P. multocida serogrup A özellikle HeLa ve tavşan faringeal hücrelerine fimbria ile *in vivo* ve *in vitro* bağlanabilmektedir. *P. multocida* serogrup A, B, D ve B:2 suşlarının tip IV fimbriyalara (belirlenmiş PtfA) sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, *P. multocida* serogruplarında tip IV fimbriyanın yapışmada rolü olmadığı bildirilmiştir (Doughty et al., 2000; Siju et al., 2007). *P. multocida* serogrup A izolatlarından 39 kDa OMP ve lipoprotein B (plpB)'nin fareler ve kümes hayvanlarında bir yapışma faktörü ve uyarılmış çapraz koruyuculuğa neden olan bağışıklık elemanı olduğu gösterilmiştir (Tabatabai and Zehr, 2004; Harper et al., 2006). *P. multocida* genomu, *Bordetella pertussis* filamentöz hemaglutinin (pfhaB1 ve pfhaB2) ve *Haemophilus influenzae* yüzey fibril (Hsf1 ve Hsf2) proteinlerinin homologları dâhil olmak üzere adezinle ilgili birkaç gen içermektedir (May et al., 2001).

P. multocida tüm genomunda karakterize edilmemiş birkaç yeni adezyon elemanı tespit edilmiştir (Sachdeva et al., 2005). *B. pertussis* FHA protein ailesinin, konakçı hücrelere bakteriyel bağlanma ve kolonizasyonda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Ward et al., 1998). Dabo ve Confer (2001), sığır *P. multocida* suşlarında *B. pertussis* FHA proteinleri ile ilişkili bir proteini kodlayan bir geni klonlamış ve dizilemişlerdir. *H. influenzae* tip b Hsf, bu bakterinin serum direncine katkıda bulunan majör vitronektin bağlayıcı bir proteindir (Hallstrom et al., 2006). Hem *P. multocida* FHA hem de Hsf proteinlerinin, besin maddesi eksikliği koşulları altında transkripsiyonel olarak aktive edildiği bulunmuştur (Paustian et al., 2002).

Virülensi zayıflatılan sığır *P. multocida* izolatlarında sıçan septisemi modeli kullanılarak adezine kodlayan dört gen tanımlanmıştır. Bunlar *pfhaB1* ve *pfhaB2* genleri, *B. pertussis* FhaC'nin hemolizin genine benzer bir gen ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans tadD* genleridir (Fuller et al., 2000). *tad* geni *A. actinomyces-temcomitans* ve *Haemophilus ducreyi*'de virülens için gerekli olduğu bilinen, bakterilerde yaygın olarak bulunan *flp* (fimbria benzeri protein) operonun bir parçasıdır (Kachlany et al., 2001). Ewers vd. (2006), araştırılan sığır izolatlarının % 46'sının *fha* (filamentöz hemaglutinin) genini barındırdığını ve hastalık durumu ile *pfha* genini barındıran sığır *P. multocida* suşları arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmiştir. *P. multocida* FHA'sının *H. somni* immünoglobulin bağlayıcı p76 proteini ile yüksek oranda sekans homolojisi gösterdiğini ve serum direnç faktörü olarak işlev gördüğünü rapor etmişlerdir (Cole et al., 1993). İlgili bir immünoglobulin bağlayıcı

protein (Pm76) daha önce tanımlanmıştır ve sığır *P. multocida* suşları için sekans verileri NCBI veri tabanında bulunmaktadır (Dabo and Confer, 2001).

Sığır hücrelerine *P. multocida* adezyon mekanizmaları veya SSH'de adezyonda rol oynayan bakteriyel faktörler hakkında bilgiler sınırlıdır. *Pasteurellaceae* familyasının üyeleri dâhil birçok patojen, adezyon ve kolonizasyon için konakçı hücre dışı matris (ECM) moleküllerini kullanmaktadırlar (Bresser et al., 2000). *P. multocida*'nın geniş konakçı aralığına sahip olması, çok sayıda hayvan türü ve doku tiplerinde ortak konakçı hücre yüzeyi bileşenlerinin (ECM molekülleri) kullanılabildiğini göstermektedir. *P. multocida*'nın ECM moleküllerine bağlanma potansiyeli hakkındaki çalışmalar sığır *P. multocida* izolatlarının fibronektin (Fn) dâhil olmak üzere birçok ECM molekülüne bağlandığını göstermiştir (Dabo et al., 2005).

Varsayılan Fn-bağlayıcı proteinler olarak tanımlanan *P. multocida* proteinleri arasında *P. multocida* OmpA, TonB'ye bağımlı reseptör HgbA (hemoglobin bağlayıcı protein A), transferrin bağlayıcı protein A (TbpA) ve Pm10769 bulunmaktadır (Dabo et al., 2005). *P. multocida* OmpA, Madin-Darby sığır böbreği (MDBK) hücre kültüründeki hücrelere heparin ve/veya Fn yoluyla bağlanmıştır (Dabo et al., 2003) ve OmpA'ya karşı monoklonal antikorlar, MDBK hücrelerine bakteri bağlanmasını ve bunların istilasını önemli ölçüde azaltmış veya ortadan kaldırmıştır. Sığır *P. multocida* suşlarında *ompA* geni, aderens ve serum direncinde rol oynamaktadır. *ompA* geni virülens ile ilişkilendirilmiş olup, faj reseptörü ve porin aktiviteleri sergileyen çok fonksiyonlu bir protein olarak işlev görür (Schweizer and Henning, 1997). Ayrıca konakçı hücrelerin bakteriyel istilasında rol oynar ve serum direncine katkıda bulunur (Prasadarao, 2002).

DNA adenin metilaz (*dam*) ve Rci rekombinaz (*rci*) *P. multocida* için potansiyel virülens faktörleri olarak bildirilmiştir (Chen et al., 2003). *Salmonella Typhi*'de, Rci proteini, tip IV pilinin C-terminal bölgesindeki DNA'yı tersine çevirerek, küçük pilus protein ekspresyonunun inhibisyonuna ve bakteriyel kendi kendine birleşmenin teşvik edilmesine neden olmaktadır (Tam et al., 2004). *P. multocida* Rci'nin tip IV pili üzerinde benzer bir etkiye sahip olup olmadığı bilinmemektedir. *dam* geninin, *P. multocida* dâhil birçok Gram-negatif bakteride virülens genlerinin ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Heusipp et al., 2007). Birkaç organizmada *dam* geninin aşırı

ekspresyonu veya silinmesi, farelerde *P. multocida*'nın atenüasyonuna neden olmuştur (Badie et al., 2007).

Nöraminidaz (sialidaz), *P. multocida* suşları arasında yaygındır ve *in vivo* olarak sığır pnömonisi izolatı *P. multocida* A:3 suşu tarafından eksprese edildiği bildirilmiştir (Ewers et al., 2006). Sialidazlar hem hücreye bağlı hem de hücre dışı olarak bulunabilmektedir (White et al., 1995). Ancak, SSH patogeneziindeki rolü çok iyi bilinmemektedir. *P. multocida* nöraminidaz proteininin farelerde koruyucu rol oynamasının yanı sıra, virülensle ilişkili olduğu ve bakteriyel aderens, kolonizasyon ve kalıcılığa katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Ifeanyi and Bailie, 1992). Bununla beraber, *P. multocida*'nın enzimi üretme ve sığırlarda pnömoniye neden olma yeteneği arasındaki ilişki belirlenmemiştir. *P. multocida* sığır suşlarında sırasıyla % 100 ve % 88,5 oranında *nanB* ve *nanH* olmak üzere iki sialidaz geni bildirilmiştir. *nanH*'de mutasyon oluşumunun sialidaz üretimini etkilemediği ancak enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu görülmüştür (Mizan et al., 2000).

Literatür bilgileri doğrultusunda proenflamatuar *P. multocida* adezinlerinin potansiyel aşı adayları olarak tanımlanması üzerine daha geniş çaplı araştırmaların yapılması ile etkili aşı geliştirmek mümkün olabilecektir.

3.5.2. LPS

P. multocida'da LPS'ler, birçok Gram-negatif bakteride bulunan R-tipi LPS'ye biyolojik ve kimyasal olarak benzer özelliklere ve yapıya sahiptir (Harper et al., 2006). Bu moleküller klasik endotoksik şok belirtilerini indüklemektedirler (Rimler and Rhoades, 1989). LPS yapısı üç *P. multocida* serogrup A suşunda (VP161, X73 ve Pm70) incelenmiş ve yüksek oranda korunmuş bir iç çekirdek fakat değişken bir dış çekirdek ortaya konulmuştur (Harper et al., 2006). *P. multocida* Pm70 genomunun araştırılması ile LPS biyosentezinden sorumlu olabilecek gen kümelerini tanımlanmıştır (St Michael et al., 2005). LPS eksprese eden patojenik bakteriler arasında *H. influenzae*, *Campylobacter jejuni* ve *Neisseria* spp. bulunmaktadır. Bu bakterilerin dış çekirdek oligosakkaritlerinde görülen değişiklikler genellikle kilit LPS genlerindeki faz varyasyon stratejilerinin sonucu olarak meydana gelmiştir (Raetz and Whitfield, 2002). *P. multocida* genomunda ise LPS genlerinde böyle bir kanıt bulunmamıştır (Harper et al., 2007). *P. multocida* Pm70 genomunda bu cinste her

zaman bulunmayan birkaç glikosiltransferaz gen kümesi tanımlanmıştır (St Michael et al., 2005).

Saflaştırılmış *P. multocida* LPS'sinin oldukça antijenik olduğu belirlenmiştir. Yaygın vasküler değişiklikler ve ölüme neden olabilmekle birlikte immünojenitesi nispeten zayıftır. Genellikle, *P. multocida* immünojenik LPS'si proteinler veya ribozomlar ile kompleks olarak uygulandığında koruyucu olmuştur. Ryu ve Kim (2000) *P. multocida* tip A:3 LPS-protein kompleksi ile aşılanmış farelerde tam koruma görmüşlerdir; fakat ne LPS ne de protein tek başına koruma sağlamamıştır. Araştırmacılar, LPS-protein kompleksinin hem humoral hem de hücre aracılı bağışıklığı indüklediğini göstermişlerdir. Bununla beraber, bir *P. multocida* serogrup A izolatu LPS'sine karşı elde edilen bakterisidal monoklonal antikor da farelerde koruma sağlamıştır (Confer, 1993). Sutherland vd. (1993) ayrıca *P. multocida* LPS molekülünü taklit eden poliklonal anti-idiotip antikorların fareleri homolog tehditlere karşı koruduğunu da bulmuşlardır. Bununla birlikte, Lu vd. (1991), tarafından yapılan çalışmada, affinite kromatografisi ile saflaştırılmış tavşan anti-LPS serumu ile pasif bağışıklamanın ardından farelerde *P. multocida* enfeksiyonuna karşı koruma görülmemiştir. Farelerde *P. multocida* enfeksiyonuna karşı opsonik ancak bakterisidal olmayan bir anti-LPS monoklonal antikorunun yalnızca kısmen koruduğu bildirilmiştir (Confer, 1993).

LPS ayrıca *P. multocida* enfeksiyonuna karşı konak savunmasının uyarıcısı olarak da rol oynamaktadır (Galdiero et al., 2000). Saflaştırılmış *P. multocida*'da LPS, enflamatuvar (IL-1a, IL-6 ve TNF-a) ve immüno-düzenleyici sitokinler (IFN- γ ve IL-12) de dâhil olmak üzere farelerde birkaç sitokin ekspresyonunu ve salınmasını uyarmıştır. Galdiero vd. (2000), ayrıca *P. multocida* LPS'sinin, sığır endotel hücreleri yoluyla nötrofil yapışması ve göçünde bir rol oynadığını göstermiştir.

3.5.3. Kapsül

P. multocida patogenezinde virülens belirleyicileri olarak kapsülün önemi açıkça ortaya konmuş, ancak bugüne kadar sırasıyla kanatlı kolerası ve hemorajik sepsisemi enfeksiyonlarından *P. multocida* kapsüller tip A ve B üzerine yoğunlaşmıştır (Harper et al., 2006). Bununla beraber sığır orijinli *P. multocida* kapsülünün SSH enfeksiyonlarında spesifik rolü üzerine çalışmalar bulunmamaktadır.

P. multocida serogruplarında kapsüle ait biyosentetik lokusların genetik organizasyonu belirlenmiş ve gözden geçirilmiştir (Harper et al., 2006). Beş kapsüller biyosentetik bölgenin karşılaştırmalı analizi, suşlar arasındaki serolojik farklılıklar için bir genetik temeli doğrulayan serogruba özgü bölgeleri tanımlamıştır.

Farelerdeki virülens çalışmaları, izojenik serogrup A mutantlarının kapsüllü yaban tiplerine kıyasla zayıfladığını göstermiştir (Boyce and Adler, 2000; Chung et al., 2001). Sığır *P. multocida* suşunun hyaluronan-sentaz genine transpozonun eklenmesi ile septisemik fare modelinde virülensinin zayıfladığı bildirilmiştir (Fuller et al., 2000). Watt vd. (2003), bir *P. multocida* serogrup A suşunun kapsülsüz varyantlarının virülensinin azaldığı ve farelerde kapsüllendirilmiş fenotipinde ise virülensin restorasyonunu bildirmiştir.

P. multocida kapsülleri *P. multocida* virülensinde rol oynamakla birlikte, farelerin kapsül ile aşılması sonucu koruma görülmemiş ve kapsülün koruyucu antijen olmayabileceği bildirilmiştir (Pruimboom et al., 1996). Genel olarak, *P. multocida*'nın birçok virulent suşu, hiyalüronik asit (HA) (tip A ve B), kondrotin (tip F) veya heparinden (tip D) oluşan kapsülü eksprese etmektedir (DeAngelis and White, 2002). Bunlar çeşitli konakçılarda doğal olarak bulunan moleküllere benzemektedir. Bu durum da kapsüller materyallere güçlü bir antikor tepkisi verilmesine engel olmakta ve konakçıya uyumu ve canlılığın sürdürülmesini sağlamaktadır (Harmon et al., 1991).

P. multocida'da kapsülün varlığı ve kalınlığı ile ilişkili olarak antifagositik aktivite bildirilmiştir. *P. multocida* serotipi A:3'ün hiyalüronidaz ile dekapülasyonu makrofajlar tarafından fagositozu arttırmıştır (Pruimboom et al., 1996). Ayrıca, izojenik kapsülsüz *P. multocida* serogrup A suşlarının fagositoza karşı duyarlılığı, kapsüllü yaban tip suştan önemli ölçüde fazla bulunmuştur (Boyce and Adler, 2000). Serum direnci, *P. multocida* serogrup A'daki kapsül ile korelasyon göstermiştir. Bunun nedeni olarak da spontan, izojenik akapsüler mutantlar veya dekapüle edilmiş suşlar, yaban tip suşlara kıyasla genellikle komplement aracılı öldürmeye duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

P. multocida kapsülünün adezyondaki rolü ile ilgili hem bakteriyel suş hem de çalışmalarda kullanılan konakçı hücre tipine bağlı olabilen çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Pruijboom vd. (1996), *P. multocida*'nın makrofajlara adezyonuna kapsüller hyaluronik asitin (HA) aracılık ettiğini bulmuşlardır. Kapsülün enzimatik

depolimerizasyonu, *P. multocida* serogrup A'nın HeLa hücrelerine ve makrofajlarına adezyonunu azaltmıştır (Esslinger et al., 1994). Spontan *P. multocida* serogrup A mutanı için makrofajlara bağlanmanın azaldığı bildirilmiştir (Pruimboom et al., 1996). *P. multocida* serogrup A suşları ayrıca hava kesesi makrofajlarına kıyasla periferik kan monositlerine yapışmayı azaltmış ve monositlerin anti-HA-bağlayıcı hücre yüzeyi proteoglikan (CD44) monoklonal antikoruna maruz kalması bakteriyel bağlanmayı da azaltmıştır (Pruimboom et al., 1999). Aksine, Glorioso vd. (1982), kapsülün enzimatik depolimerizasyonunu takiben *P. multocida* serogrup A'nın HeLa hücrelerine ve tavşan faringeal hücrelerine yapışmasının arttığını bildirmiştir. Jacques vd. (1994), ise kapsül yokluğunun *P. multocida*'nın hücreler tarafından akciğer ve trakeallere yapışmasını ve kolonizasyonunu arttırdığını göstermiştir.

3.5.4. OMP

P. multocida OMP'si *P. multocida*'nın önde gelen virülens faktörlerinden veya immünojenik elementlerinden biridir ve birden fazla enfekte konakçıda immün tepkileri ortaya çıkarmaktan sorumludur. Bu proteinlerin tanımlanması, araştırmacıların bakteriyel enfeksiyona karşı bir aşı olarak manipüle edilecek OMP'leri hedeflemesine olanak tanır (Davies and Lee, 2004). Sığır *P. multocida* serogrup A izolatları üzerinde yapılan çalışmalarda, bir *E. coli* OmpA ve bir *H. influenzae* tip b (Hib) P1 homolog proteinleri dâhil olmak üzere, yüzeyde sergilenen ve *in vivo* olarak eksprese edilen OMP'ler tanımlanmıştır (Dabo et al., 1997). *P. multocida* OmpA, *in vivo* korunan, yüzeyde sergilenen ve eksprese edilen büyük bir immünojenik ve antijenik OMP olarak bildirilmiştir. OMP'ye karşı yüksek antikor tepkileri, sığırların virulent *P. multocida* ile mücadeleye karşı direnci ile tutarlı bir şekilde ilişkili bulunmuştur (Dabo et al., 2003).

OmpH, incelenen sığır izolatlarının % 100'ünde saptanan bir diğer önemli antijenik determinanttır. Yüzeyde sergilenen ve korunmuş OMP porin olarak aşı adayı potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (Ewers et al., 2006). OMP porin proteinini farelerde *P. multocida* tehdidine karşı koruma sağlamıştır (Vasfi Marandi and Mittal, 1997). Tavuklarda ekspresyonun demir ve glikoz tarafından negatif olarak düzenlendiği gösterilmiştir (Luo et al., 1999). Yaban tip suşta OmpH-lacZ füzyonunun ekspresyonu, 2,2-dipyridyl (DPD) varlığında artmış ve bakteri glikoz varlığında üretildiğinde genin ekspresyonunda 5 kat düşüş tespit edilmiştir. OmpH'nin potansiyel bir immünojen olarak önemi ve glikozun OmpH ekspresyonu üzerinde gözlenen

inhibitör etkisi göz önüne alındığında, araştırmacılar bakteri üretiminin glikoz olmadan gerçekleştirilmesini tavsiye etmişlerdir (Bosch et al., 2001).

Birçok *in vivo* çalışmada potansiyel *P. multocida* virülens genleri ve OMP ile ilişkili çapraz koruma faktörleri tanımlanmıştır (Hunt Gerardo et al., 2001). Wang ve Glisson (1994), canlı *P. multocida* izolatlarına karşı üretilen antiserumlar kullanıldığında çapraz korumayı uyaran yüksek moleküler ağırlıklı dört protein (204 ile 153 kDa arasında değişen) bulmuşlardır. Bir *in vivo* ekspresyon teknolojisi (IVET) geliştirilerek, konağın enfeksiyonu sırasında yukarı regüle edilen *P. multocida* genlerini tanımlamak için kullanılmıştır. Tanımlanan birçok genden ikisinin, *H. influenzae* ile enfeksiyona karşı heterolog bağışıklığı uyardığı gösterilen *H. influenzae* lipoproteinlerine benzerlik gösteren protein D ve PCP (peptidoglikan ilişkili lipoprotein (Pal) çapraz reaksiyon proteini)'yi kodladığı gösterilmiştir. Bu nedenle, GlpQ ve PCP olarak adlandırılan *P. multocida*'daki lipoprotein homologları araştırılmıştır (Hunt Gerardo et al., 2001). *H. influenzae* protein D, bir tür bağışıklıktan kaçma olan IgD'ye bağlanmaya aracılık etmektedir ve sıçanlarda heterolog zorluğa karşı çapraz korumayı uyarmaktadır (Akkoyunlu vd., 1996). Anti-PCP serumu, *H. influenzae* klinik izolatlarına karşı bakterisit olarak tespit edilmiştir (Deich et al., 1990). *P. multocida* PCP'nin yüzeyde sergilendiği bulunurken, protein D (GlpQ olarak adlandırılmıştır) bulunmamıştır (Lo et al., 2004). Bununla birlikte, hiçbir protein, farelerde ve tavuklarda canlı *P. multocida* ile mücadeleye karşı korumayı uyarmamıştır. Boyce vd. (2006), *in vivo* üreme sırasında Pm0803 ve ef-Tu'nın (uzama faktörü-Tu) önemli ölçüde yukarı regülasyonunu ve OmpW'nin önemli ölçüde aşağı regülasyonunu bildirmişlerdir.

3.5.5. Demir Kontrollü Dış Membran Proteinleri (IROMPs)

Demir edinimi veya alımı bakteriyel canlılık için gereklidir. Patojenik bakteriler bunun için farklı stratejiler geliştirmiştir. *P. multocida*, demir bağlayıcı konak moleküller (transferrin, hemoglobin ve hemin) için hem demir-kenetleyici iyonoforlar hem de dış membran reseptörleri üretmektedir (Ogunnariwo et al., 1991). Demir olmayan ortamda veya *in vivo* olarak üretildiğinde *P. multocida*, moleküler ağırlıkları 76, 84 ve 94 kDa olan demir kontrollü OMP'leri (IROMP'ler) eksprese etmiştir ve üçü de siderofor bağlanma afinitesine sahip olmuştur (Choi-Kim et al., 1991). *P. multocida* *tbpA* geni kanatlı izolatlarında yoktur ve sadece ruminantlarda tespit edilmiştir (sığır,

% 70; koyun, % 80; ve manda, % 57,1) (Ewers et al., 2006). *tbpA*'nın *P. multocida* virölensindeki spesifik rolü hala bilinmemektedir.

Demir, bakterilerin konakçıdan sağladığı ve üreme için gerek duyduğu bir üreme faktörüdür. Fakat toksik etkisinin fazla olması nedeniyle ortamda eser miktarda bulunması gereklidir. Bu nedenle *P. multocida* diğer bakteriler gibi demire karşı tolerans gösterebilmek için birçok mekanizmaya sahiptir (Harper et al., 2006). *Pasteurellaceae* familyasında *tbpA* ve *tbpB* olmak üzere 2 demir bağlama reseptörü bulunduğu bilinmekle birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalarda sığır suşlarında sadece *tbpA* proteinin bulunduğu bildirilmiştir (Ogunnariwo and Schryvers, 2001). TonB transport kompleksi içinde tanımlanan *exbB*, *exbD* ve *tonB* genleri demir bağlama için gerekli enerjiyi sağlamada görev almaktadır. HgbA ise hemoglobini bağlayan protein olup, konakçı proteinlerinden demir kazanımında görev almaktadır (Harper et al., 2006).

Fuller vd. (2000) tarafından zayıflatılmış mutantların analizi, *H. influenzae*'nin demir edinimi ile ilgili genler olan *exbB* ve *hgbA* ile homolojiye sahip potansiyel virölens genleri içeren iki lokus belirlenmiştir. *ExbB*, *exbD* ile birlikte *P. multocida*'daki *tonB* operonunun bir parçasıdır ve bağımsız olarak kopyalanmaktadır (Bosch et al., 2002a). İlgili başka bir çalışmada Bosch vd. (2002b), *P. multocida*'nın üç ORF'sinin (PM0298, PM0299 ve PM300) tek bir transkripsiyonel operon oluşturduğunu göstermiştir. PM0298 veya PM0299'da kusurlu mutantlar olarak tespit edilmiştir. Bu genler patojenin canlılığı için gerekli olduğunu göstermiştir. Fakat PM300 (HgbA olarak adlandırılır) ürünü bağlı hemoglobin ve hemini, hgbA mutant suşunun bağlanması ve virölensini etkilememiştir (Bosch et al., 2004). Bir sorgu olarak diğer bakteriyel patojenlerin aynı moleküllerinin kullanıldığı *P. multocida* Pm70 genomunun TBLASTN analizinde, bu organizma için sekiz olası hemini ve hemoglobini reseptörü tanımlanmıştır. Kantitatif bağlanma deneyleri, PM0040, PM0236, PM0741, PM1081, PM1428, PM0592 ve HgbA proteinlerinin hemini hem de hemoglobini bağladığını, PM0576 ve PM1282 ORF'lerin sırasıyla hemoglobini veya hemini bağladığını göstermiştir. Ayrıca Western blot analizi, *P. multocida* ile enfekte olmuş farelerin PM0040, PM0236, PM0741, PM1081, PM1428, PM0592 ve HgbA proteinlerine karşı spesifik antikorlar ürettiğini göstermiştir. Yine de farelerin bu reseptörlerden herhangi biriyle tek başına aşılması, *P. multocida* enfeksiyonuna karşı koruma sağlamamıştır (Bosch et al., 2004). Benzer şekilde,

hgbB'nin inaktivasyonu *P. multocida*'nın hemoglobine bağlanma kabiliyetini etkilemiştir (Cox et al., 2003). Bu da *P. multocida* genomunda ek hemoglobin reseptör proteinlerinin varlığını düşündürmüştür. Bu proteinler, tek başına aşılma antijeni olarak uygulandığında farelerde *P. multocida* enfeksiyonuna karşı koruyucu bağışıklığı uyarmamıştır.

Küresel düzenleyici gen olan *fur*, patogeneizde önemli bir rol oynar ve birçok bakterinin virülensini düzenler. Demir içeren hem ve demir-kükürt küme proteinleri gibi proteinler, yalnızca mükemmel elektron taşıyıcıları olarak değil, aynı zamanda gen ekspresyonunu düzenleyen çevresel veya hücre içi sensörler olarak da işlev görür. Bununla birlikte, fazla demir hücreler için oldukça toksiktir. Özellikle demir, oksijen toksisitesini arttırıcıdır, çünkü bu metal, hidrojen peroksidi oldukça reaktif hidroksil radikaline dönüştüren Fenton reaksiyonunu etkin bir şekilde katalize eder. Bu nedenle, demir alımı işlemi sırasında bakteriler, alım oranlarını ayarlayarak ideal bir aralıkta dinamik bir demir iyonları dengesi sağlarlar. Hücre içi demir konsantrasyonunun kesin regülasyonu, tipik olarak, ferrik alım regülatörü (Fur) proteini aracılığıyla kontrol edilen demir edinim genleri ile yakından ilişkilidir. Fur proteini, bakterilerde her zaman ifade edilen ve demir alımı da dâhil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonlarda yer alan genlerin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu kontrol eden metal iyonuna bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür. Metal iyonlarına “fur” bağlanması, düzenleyicide DNA ile etkileşimini uyararak ve stabilize eden bir konformasyonel değişikliğe neden olur. Fur-Fe²⁺ kompleksleri, demir alımında yer alan genlerin DNA promotör bölgelerine (Fur kutuları) bağlanarak transkripsiyonel baskı veya aktivasyona neden olur. Bazı bakterilerde Fur, biyofilm oluşumunu düzenler ve hastalık patogeneizinde, virülans faktörü ekspresyonunu kontrol eden konakçı bakteri etkileşimlerinde ve toksin üretiminin *in vitro* düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Liu et al., 2019).

Başka bir demir toplama geni olan *P. multocida* *HbpA*'nın (hemin bağlayıcı protein A) immünojenik olduğu ve Fur'dan bağımsız bir mekanizma ile düzenlendiği gösterilmiş fakat *HbpA*'ya özgü antikorların farelerde koruyucu olmadığı belirlenmiştir (Garrido et al., 2003). *P. multocida* sığırcı suşları *tonB*, *tbpA*, *hgbA* ve *hgbB* genlerinin prevalansı sırasıyla % 100, % 70,2, % 95,2 ve % 57,7 olarak bildirilmiştir (Ewers et al., 2006). *P. multocida* sığırcı izolatlarının patojenitesi ile *hgbB* ve *tbpA*'nın virülensle ilişkili genler olarak varlığı arasında önemli bir ilişki vardır.

M. haemolytica ve *P. multocida* arasındaki demir sınırlaması ile ilgili olarak yapılan karşılaştırmalı bir transkripsiyonel yanıt araştırması sonucunda, her iki organizmada da indüklenen birkaç homolog gen bulunmuş ve hemoglobin reseptörü *hmbR2*, *fbpAB*, *yfeABCD* ABC-tipi sistemler, *tonB* ve *exbD*'yi içerdiği bildirilmiştir. Hemin ve hemoglobin taşıyıcı genler, kan kaynaklarından demir kullanma kapasitesinin bir göstergesi olan *P. multocida*'da benzersiz bir şekilde düzenlenen genler arasındadır (Roehrig et al., 2007).

3.5.6. Hücre Dışı Enzimler

P. multocida'da proteazlar ve lipazlar gibi çeşitli hücre dışı enzimlerin de olası virülens faktörleri olduğu bildirilmiştir (Pratt et al., 2000). Lipazların patojenitede rolünün olduğu düşünülmüş, bununla birlikte proteazların konakçı savunmasını bozan konak IgG'ye karşı ve opsonizasyonu azaltarak patojenlere yardımcı olabildiği belirlenmiştir. Negrete-Abascal (1999), sığırların dâhil olduğu farklı türlerden izole edilen *P. multocida*'ların kültür süpernatantında proteaz tespit edilmiştir. Bu proteazlar, konakçı IgG'sini geniş bir pH aralığında parçalayabilmektedirler. Pratt vd. (2000), *P. multocida*'nın farklı türlerden klinik izolatları ile lipaz üretimini göstermiştir. Bu enzimlerin *P. multocida* enfeksiyonlarının patogeneğinde oynadığı rol bilinmemektedir.

3.6. Sığırlarda *P. multocida* Serogrup A'ya Karşı Bağışıklık

Sığırlarda *P. multocida*'ya bağışıklık, en yaygın olarak sığır ve mandaların B:2 ve E:2 serotiplerinin neden olduğu hemorajik septisemi açısından araştırılmıştır (Confer, 1993). *P. multocida* serogrup A izolatlarının neden olduğu sığır pnömonisinde bağışıklık ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Sığırlarda *P. multocida* serogrup A izolatlarına karşı bağışıklıktan sorumlu önemli antijenler tam olarak anlaşılamamıştır. Adler vd. (1999), *P. multocida* için çeşitli hastalıklar ile ilişkili aday aşı antijenleri ve genlerini incelemiş ve LPS'nin homolog serogruplara karşı bir miktar koruma sağlayabileceğini belirtmiştir.

In vivo koşullar altında eksprese edilen antijenlere odaklanan çalışmalarda immünolojik açıdan önemli çeşitli antijenler incelenmiştir. Bunlar, *H. influenzae*'nin D15 koruyucu antijeninin bir homologu olan OMP Oma87; tip 4 fimbria ve onun alt birim proteini PtfA; kapsül ve Tbp TbpA gibi IROMP'lerdir. Bu varsayılan aşı adaylarının hiçbirisi, sığırlarda *P. multocida* serogrup A'ya karşı bağışıklığın uyarılması

açısından doğrudan araştırılmamıştır. Oma87 için gen klonlama ile elde edilen proteine karşı aşılama tavuklarda koruyuculuk oluşturmamıştır (Chaudhuri and Goswami, 2001). *PtfA* geni çoğu sığır *P. multocida* izolatında bulunmakla birlikte klonlama ile elde edilen antijene karşı immünojenite rapor edilmemiştir (Ewers et al., 2006). *TbpA*'nın iyi bir aşı adayı olma potansiyeli tartışmalıdır, çünkü sığır *P. multocida* suşlarının yaklaşık % 30'unda *tbpA* geni tespit edilememiştir (Roehrig et al., 2007). Sığır *P. multocida* serogrup A suşlarına ait OMP'lerin, yüksek titrede antikor oluşturmaları ile sığırlarda deneysel olarak oluşturulan *P. multocida* pnömonisine karşı koruyuculuk sağladığı ve bu nedenle de iyi bir aşı antijen adayı olabileceği öne sürülmüştür (Confer et al., 1996). Fakat Abdullahi vd. (1990), sığır *P. multocida* serogrup A izolatları ile hazırlanan tüm hücre bakteriyel aşılarda farelerde intraperitoneal uygulamasının koruyuculuk oluşturmadağını ve bu verilere dayanarak bir OMP aşısının potansiyel etkinliğinin sorgulanması gerekliliğini bildirmiştir.

Sığır solunum sistemi pastörellozunda bağışıklığın antikor aracılı olduğu varsayılmaktadır. Anti-*P. multocida* antikorları, süt ineği kolostrumunda kantitatif olarak indirekt immünofloresan ve aglütinasyon testleri ile gösterilmiştir (Gresham et al., 1984). *P. multocida* serogrup A'ya karşı pasif antikorlar süt ve yenidoğan sığır buzağlarından alınan serumlarda belirlenmiştir. Bu çalışmalardan birinde belirlenen antikorlar 4-6 aylık değerlere kıyasla kısa ömürlü olarak tespit edilmiştir (Prado et al., 2006). Virtala vd. (1996), *P. multocida* enfeksiyonu ile ilişkili olarak doğal solunum yolu hastalığı olan ve olmayan süt buzağlarında, postkolostral antikor titreleri arasında bir ilişki bulmamıştır. Pasif olarak edinilmiş anti-*P. multocida* OMP antikorları, doğumdan sonraki 24 saat içinde süt buzağı serumlarında saptanmış fakat antikor konsantrasyonlarının 47-73 günlük yaşlarda en düşük seviyeye indiği bildirilmiştir (Step et al., 2005). Sığır buzağlarında, iki farklı sürünün buzağlarında benzer pasif/edinilmiş anti-*P. multocida* antikor titreleri bulunmuştur (Prado et al., 2006). Her iki sürüde de pasif olarak edinilmiş IgG1 antikorları hızla düşmüş ve 60 ile 90 günlük yaşlarda çok azalmıştır. Bu durumu 150 ile 180 gün arasında pik konsantrasyonlara ulaşan anti *P. multocida* IgM ve IgG2 antikorlarında hızlı bir artış izlemiştir.

Solunum sisteminde *P. multocida* tehdidine karşı bağışıklık, canlı aşılarda kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bunların arasında yaban tip bakteriler, streptomisin bağımlı mutant ve kimyasal olarak modifiye edilmiş *P.*

multocida'nın kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır (Mathy et al., 2002). Ayrıca Kadel vd. (1985), aşılanmamış buzağılara kıyasla hem canlı streptomisine bağımlı *P. multocida* hem de canlı streptomisine bağımlı *M. haemolytica* ile aşılanan buzağılarda daha fazla kilo artışı, daha az şiddetli klinik pnömoni belirtileri ve daha düşük ölüm oranları bildirmişlerdir. Birkaç çalışmada, yüksek serum *P. multocida* antikorları ile canlı *P. multocida* ile aşılanmış sığırlarda deneysel enfeksiyona karşı direnç arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Kontrollerle karşılaştırıldığında, aerosol veya deri altı yollarla canlı *P. multocida* ile aşılanan sığırların lezyon skorları önemli ölçüde azalmıştır (Panciera et al., 1984). Aynı zamanda histolojik lezyonlar, düşük nötrofil akışı, düşük IL8 ve IL1b ve artmış IL2 yanıtları görülmüştür (Mathy et al., 2002). Her iki çalışmada da, *P. multocida*'ya karşı yüksek antikorlar ile düşük lezyon skorları arasında anlamlı bir korelasyon ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Ek olarak, Western blot ve dansitometrik analizler kullanılarak ölçülen, canlı *P. multocida* aerosol aşılara karşı oluşmuş serum antikor yanıtlarının, yedi spesifik OMP (yaklaşık 100, 90, 85, 74, 53, 35 ve 16 kDa) açısından kontrol grubunda bulunan buzağılara göre daha anlamlı ($p<0.05$) yanıt oluşturduğu saptanmıştır (Confer et al., 1996). Amino terminal dizilemesi, 35 kDa proteininin OmpA protein ailesinden ısıyla değiştirilebilir (28-35 kDa) bir OMP olduğunu göstermiştir (Dabo et al., 1997).

Hayvanlarda enfeksiyona karşı direncin uyarılmasında önemli olduğu gösterilen bir başka *P. multocida* OMP'si yaklaşık 33.6-38.5 kDa moleküler ağırlıkta olan OmpH'dir (Davies and Lee, 2004). Ancak bu protein sığırlarda immünolojik olarak çalışılmamıştır. Sığırların inaktif *P. multocida* aşıları ile aşılanması ile ilgili çalışmalar da çok fazla bulunmamaktadır. *Pasteurella* bakterini kullanarak sığırların nakliye ateşine karşı bir miktar korunma sağlanmıştır (Collins, 1977). Buzağıların, canlı Parainfluenza 3 virüsü, inaktif *M. haemolytica* ve *P. multocida* aşısını içeren bir aşı ile aşılanması, her üç enfeksiyöz etkene karşı bağışıklık sağlamıştır (Matsuoka et al., 1966). Bununla birlikte, son yıllarda buzağıların formalinle inaktive edilen *P. multocida* ile aerosol ve intratrakeal aşılanması deneysel pulmoner enfeksiyona karşı koruma sağlamıştır (Dowling et al., 2004; Prado et al., 2005).

Freund adjuvantı içeren *P. multocida*'nın dış membran antijenleri ile aşılanan buzağılarda bağışıklık oluşma durumu IROMP'ler ve OMP'ler spesifik ELISA ile araştırılmış ve ilgili antijenler tespit edilmiştir (Prado et al., 2005). *P. multocida* epruvasyonu sonrasında lezyon skorlarında önemli bir azalma belirlenmiştir.

Proteomik analiz sonucunda aşılannmış buzağların 96 kDa proteinine yoğun antikor tepkileri verdiği belirlenmiştir. Yüksek anti-96 kDa antikorları ile düşük lezyon skorları arasındaki korelasyonun önemi bildirilmiştir ($P<0.06$).

3.7. *P. multocida*'ya Karşı Aşı Stratejilerinin Geliştirilmesi

Hayvan deneyleri ve saha çalışmaları, *P. multocida* bakterin toksoitlerinin besi hayvanlarında kullanılması ile SSH oluşumu ve/veya genel ölüm oranlarının azaldığı ve canlı aşıların çeşitli *P. multocida* serogrup/serotiplerine karşı çapraz koruma sağladığını göstermiştir (Wildman et al., 2008). Bununla beraber canlı aşılarla aşılann sürülerde salgınlar ortaya çıkabilmekte, inaktif aşılar ile aşılama sonrası da sadece serogrupa özgü bağışıklık oluşmaktadır (Lee et al., 2007).

DNA aşı teknolojisi, aşı etkinliğini artırmanın bir başka alternatif yoludur. Son zamanlarda genetik füzyon ile oluşturulan kimerik genler, çok yönlülükleri nedeniyle rekombinant aşı geliştirmede kullanılmak üzere incelenmiştir (Ayalew et al., 2008). Register vd. (2007), iki farklı vektörde *P. multocida* serogrup D'den 5'-kesilmiş veya tam uzunlukta, genetik olarak detoksifiye edilmiş bir *tox*A geni kullanarak bir DNA aşısı çalışması yürütmüştür. Tam uzunlukta toksin içeren bir sinyal dizisi taşıyan bu yapı, domuzlarda hem antikor hem de interferon-p seviyelerini arttırmıştır. Seo vd. (2009), kesik bir PMT formunun farelerde koruyucu olduğunu ve domuzlarda AR'nin klinik belirtilerini azalttığını bildirmiştir.

Dış zar proteinleri (OMP'ler), yeni antimikrobiyal ilaçların yanı sıra Gram negatif bakterilere karşı aşılar için potansiyel hedef olmuştur (Carpenter et al., 2007). Basagoudanavar vd. (2006), *P. multocida* 6:B'nin OMP'leriyle aşılann farelerin yüksek antikor titrelerine sahip olduğunu ve montanid ile adjuvanlanmış OMP'lerin, bakteriyel tehdide karşı hayvanların % 94'ünü koruduğunu göstermiştir. *P. multocida*'da OmpH, incelenen sığır izolatları için % 100'ünde saptanan ve aşı adayı olma potansiyeline sahip olan başlıca antijenik yüzeye maruz kalan ve korunan OMP porinlerinden birisi olarak gösterilmektedir (Dabo et al., 2008).

P. multocida OmpA'sının antijenitesi ve koruma kapasitesi de incelenmiştir. *P. multocida* serotip A:3'ten rekombinant OmpA ile güçlü bir Th2-tipi bağışıklık tepkisi gözlemlenmiştir, fakat farelerde hiçbir koruma elde edilmemiştir (Dabo et al., 2008). Benzer şekilde, *P. multocida* A:3'te bulunan OmpA eşdeğeri Omp28, farelerde herhangi bir koruma sağlamamıştır (Gatto et al., 2002).

Pasteurella lipoprotein E (PlpE), *P. multocida*'nın bir başka immünojenik OMP'sidir. *P. multocida* A:1'den elde edilen rekombinant PlpE ile aşılanmış farelerin *P. multocida* serotipleri A:1, A:3 ve A:4'e karşı çapraz koruma gösterdiği belirlenmiştir (Wu et al., 2007). Bununla birlikte, *P. multocida* A:1'den rekombinant PlpB ile farelerde çok düşük bir koruma görülmüştür (% 20-30) (Chomnawang et al., 2009). *P. multocida* A:1'den elde edilen iki rekombinant lipoprotein GlpQ ve PCP'nin lipide edilmemiş veya lipide edilmiş formları, antikor titrelerini indüklemiştir, ancak farelerde herhangi bir koruma sağlamamıştır (Lo et al., 2004).

Okay vd. (2011), *ompH* ve *plpE* geninin iki fragmanını (*plpEN* ve *plpEC*), *P. multocida* P-1062'nin (ATCC 15743, serotip A:3) genomik DNA'sından klonlamışlar ve *plpEN-ompH* ve *plpEC-ompH* füzyonlarını oluşturmuşlardır. Genlerin *in vitro* ekspresyonu HEK-293 hücrelerinde gösterilmiştir. Daha sonra tam uzunlukta *plpE* geni klonlanmış ve rekombinant proteinler *E. coli*'de vektörü ile saflaştırılmıştır. Üç DNA aşı formülasyonu, yani pCMV-*ompH*, pCMV-*plpEN-ompH* ve pCMV-*plpEC-ompH* ve beş rekombinant protein bazlı aşı, PlpEN-OmpH, PlpEC-OmpH, OmpH, PlpEC ve PlpE oluşturulmuştur. Rekombinant proteinler, şap, CpG, alum-CpG, yağ bazlı ve yağ bazlı-CpG adjuvanlardan en az biriyle formüle edilmiştir. BALB/c fareleri, bu aşı formülasyonları ile immünize edilmiş ve bunların serumları, antikor ve serum IFN- γ titrelerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Aşıların koruyucu kapasiteleri ayrıca farelerin 10LD50 konsantrasyonunda *P. multocida* A:3 ile epruvasyonu sonrası değerlendirilmiştir. DNA aşıları, bağışıklık tepkilerini uyarmış, ancak koruma sağlamamıştır. Tüm protein aşı formülasyonları, antikor seviyelerini ve CpG içeren formülasyonlar, serum IFN- γ titrelerini artırmıştır. Alum adjuvanı üzerine adsorbe edilen 100 μ g PlpEC-OmpH proteini, % 40 koruma sağlamıştır. PlpEN-OmpH ile hiçbir koruma elde edilmemiştir. Daha sonra, CpG'nin veya bunun alum ve yağ bazlı kombinasyonlarının adjuvanlar olarak etkileri PlpEC-OmpH aracılı koruma üzerinde araştırılmıştır. PlpEC-OmpH ve yağ bazlı CpG adjuvandan oluşan aşı formülasyonu % 100 koruma sağlamıştır. Son olarak fareler, yağ bazlı CpG adjuvanı ile formüle edilmiş rekombinant OmpH, PlpEC ve PlpE ile aşılanmıştır. OmpH, PlpEC ve PlpE formülasyonları sırasıyla % 50, % 60 ve % 100 koruma sağladığı saptanmıştır. Bu bulgular, yağ bazlı CpG adjuvanı ile formüle edildiğinde rekombinant PlpE ve PlpEC-OmpH füzyon proteinlerinin, *P. multocida*'ya karşı güçlü aselüler aşı formülasyon adayları olduğunu göstermiştir.

Sıır solunum sistemi hastalıkları tüm dünyada yaygın olarak görülmekte ve ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *P. multocida*, SSH'ye neden olan bakteriyel etkenler arasında yer almaktadır. Profilaktik ve metafilaktik olarak kullanılan antibiyotikler ile beraber koruyucu amaçlı kullanılan aşılarla rağmen bu kayıpların önüne geçilememektedir. Ülkemizde SSH'ye karşı farklı firmaların ithal aşıları mevcuttur; fakat enfeksiyona neden olan bakterilerin biyotip/serotipleri ülkesel olarak farklılık gösterdiğinden dolayı bunların yeterli koruyuculuğu sağlamadığı ve hastalığın sık görüldüğü bilinmektedir. Bu alışma kapsamında sıır akciğer örneklerinden *P. multocida* izolasyonu, karakterizasyonu ve aşı suşu olma potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



4. MATERYAL VE METOT

4.1. Bakteriyolojik Örnekleme

Tez çalışması kapsamında *P. multocida* izolasyonu için Samsun ve çevresinde bulunan mezbahalarda kesim aşamasında olan ve klinik olarak hastalık şüpheli 410 adet sığırdan akciğer örnekleri alındı. Alınan akciğer örnekleri 1-2 saat içerisinde soğuk zincir şartlarında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirildi ve *P. multocida* için bakteriyolojik izolasyon amacıyla kullanıldı.

4.2. İzolasyon ve İdentifikasyon

P. multocida selektif izolasyonu için akciğer örneklerinden bakteriyolojik ekim yapıldı. Bu amaçla akciğer örneklerinin yüzeyi spatula ile dağıldı ve öze ile akciğer dokularının iç kısımlarından steril olarak örnekleme yapıldı. *P. multocida* selektif izolasyonu için ticari olarak temin edilen *Pasteurella* selektif besi yerine inokulasyon gerçekleştirildi. Besi yerleri 24 saat 37°C'de inkübe edildi (Catry et al., 2006). İnkübasyon süresi sonunda agarda üreyen leylak renkli kolonilerden tek bir adet alınarak, Gram boyama ve oksidaz testi yapıldı. Gram negatif çomak şeklinde görülen ve oksidaz pozitif bakteriler *P. multocida* şüpheli olarak değerlendirildi. İnkübasyon sonrası üreyen ve şüpheli olarak değerlendirilen izolatların subkültürleri Brain Heart Infüzyon (BHI) agara yapıldı. Subkültürü yapılan izolatlar çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılması amacıyla % 15 gliserol içeren TSB içerisinde -80°C'de saklandı.

P. multocida genotipik identifikasyonu için BHI agarda üretilen taze kültürlerden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Şüpheli izolatların DNA ekstraksiyonları kaynatma yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla şüpheli izolatlara ait kolonilerden 500 µl steril distile su içerisine süspansiyon hazırlanarak, 100°C'de 10 dk kaynatıldı ve ardından 10 000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant DNase/RNase free tüplere alındı ve PCR analizlerinde hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

P. multocida izolatlarının genotipik identifikasyonları Townsend vd. (1998) tarafından bildirilen protokolün optimizasyonu ile gerçekleştirildi. Optimizasyon için PCR'da kullanılan reaktiflerin farklı oranları denendi. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 5 dk ön denatürasyon, 35 siklus olmak üzere 94 °C'de 30 sn, 57 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn amplifikasyon ve 72 °C'de 10 dk son uzama aşaması olacak şekilde

ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidyum bromid (2 µg/ml) içeren % 1,5’luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Optimize edilen PCR protokülü sonrasında 460 bp’lik bant görülmesi *P. multocida* için pozitif olarak kabul edildi.

Genotipik identifikasyon için kullanılan *P. multocida* spesifik oligonükleotit primer ve beklenen ampikon boyutu Tablo 4.1’de sunuldu.

Tablo 4.1. İzolatların PCR ile identifikasyonu için kullanılan oligonükleotit primerler

Bakteri	Hedef Gen	Primer	Ampikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>P. multocida</i>	KMT1	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG R: GCTGTAAACGAACCTCGCCAC	460	Townsend vd. (1998)

4.3. *P. multocida* İzolatlarının Kapsüler Tiplendirmesi

P. multocida suşları kapsül antijenlerine göre A, B, D, E ve F olmak üzere 5 serogruba ayrılmaktadır. Kapsüler tiplendirme amacıyla multipleks PCR uygulandı (Townsend et al., 2001). PCR’da hedeflenen spesifik genler ve beklenen ampikon boyutları Tablo 4.2’de verildi. *P. multocida* izolatlarının kapsül tiplendirmesi için literatürde bildirilen protokolün optimizasyonu gerçekleştirildi. Optimizasyon için PCR’da kullanılan reaktiflerin ve amplifikasyon protokolünün farklı oran ve siklusları denendi. Amplifikasyon ürünleri etidyum bromid (2µg/ml) içeren % 1,5’luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında serogrup A, serogrup B, serogrup D, serogrup E ve serogrup F için sırasıyla 1044, 760, 657, 511 ve 851 bp’lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 4.2. *P. multocida* izolatların kapsül tiplendirmesi için kullanılan oligonükleotit primerler

Gen	Serogrup	Primer	Ampikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>hyaD</i> <i>-hyaC</i>	Serogrup A	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG R: TTGCCATCATTGTCTAGTG	1044	Townsend vd. (2001)
<i>bcbD</i>	Serogrup B	F: CATTTATCCAAGCTCCACC R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	760	
<i>dcbF</i>	Serogrup D	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657	
<i>ecbJ</i>	Serogrup E	F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	511	
<i>fcD</i>	Serogrup F	F: AATCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851	

4.4. İzolatların Virülens Genlerinin Belirlenmesi

P. multocida nedenli enfeksiyonların patogeneğinde rol oynayan virülens faktörlerine ait genler PCR ile araştırıldı. *P. multocida*'ya ait çalışmada araştırılan virülens genleri ve beklenen ampikon boyutları Tablo 4.3'de gösterildi.

Tablo 4.3. *P. multocida* izolatlarında araştırılan virülens genleri.

Virülens Faktörü	Gen	Primer	Ampikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
Sialidaz	<i>nanB</i>	F: GTCCTATAAAGTGACGCCGA R: ACAGCAAAGGAAGACTGTCC	585	Ewers vd. (2006)
Sialidaz	<i>nanH</i>	F: GAATATTTGGGCGGCAACA R: TTCTCGCCCTGTCATCACT	361	
Dermonekrotoksin	<i>toxA</i>	F: CTTAGATGAGCGACAAGGTT R: GGAATGCCACACCTCTATA	866	
Dış membran porin ve protektinler	<i>oma87</i>	F: ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC R: TGACTTGCGCAGTTGCATAAC	955	
Dış membran porin ve protektinler	<i>ompH</i>	F: CGCGTATGAAGGTTTAGGT R: TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	438	Tang vd. (2009)
Adhezin ve kolonizasyon	<i>fimA</i>	F: CCATCGGATCTAAACGACCTA R: AGTATTAGTTCCTGCGGGTG	866	
Demir bağlama sistemi	<i>fur</i>	F: GTTTACCGTGTATTAGACCA R: CATTACTACATTGCCATAC	244	
Dış membran biyosentezi	<i>ompA</i>	F: CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC R: CATAAACAGATTGACCGAAACG	202	
Aminoasit taşınması	<i>plpB</i>	F: TTTGGTGGTGCATGTCTTCT R: AGTCACTTTAGATTGTGCGTAG	282	
Enerji transportu	<i>tonB</i>	F: CGACGGTGAAACCTGAGCCA R: CCGAGCGATAAGCATTGACT	261	
Hyaluronidaz	<i>pmHAS</i>	F: TCAATGTTTGCGATAGTCCGTTAG R: TGGCGAATGATCGGTGATAGA	430	
Süperoksit dismutaz	<i>sodA</i>	F: TACCAGAATTAGGCTATGC R: GAAACGGGTTGCTGCCGCT	365	
Süperoksit dismutaz	<i>sodC</i>	F: AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA R: TGGTGCTGGGTGATCATCATG	236	

P. multocida izolatlarının sahip oldukları virülens genlerinin belirlenmesi için beklenen ampikon büyüklükleri göz önüne alınarak 13 gen için 5 farklı multipleks PCR protokolü oluşturuldu. Birinci protokol *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB* ve *fimA* (Tang et al., 2009); ikinci protokol *sodC* ve *ompH* (Tang et al., 2009); üçüncü protokol *nanH* ve *nanB* (Ewers et al., 2006; Tang et al., 2009); dördüncü protokol *toxA* ve *oma87* (Ewers et al., 2006; Tang et al., 2009) ve beşinci protokol *ompA* ve *tonB* genleri için (Ewers et al., 2006; Tang et al., 2009) optimize edildi. Optimizasyon kapsamında ilgili literatürde bildirilen yöntemler temel alınarak, PCR reaktiflerinin ve amplifikasyon protokolünün farklı oran ve siklusları denendi. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında *nanB*, *nanH*, *toxA*, *oma87*, *ompH*, *fimA*, *fur*, *ompA*, *plpB*, *tonB*, *pmHAS*, *sodA* ve *sodC* genleri için sırasıyla 585, 361, 866, 955,

438, 866, 244, 202, 282, 261, 430, 365 ve 236 bp'lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

4.5. Biyofilm Üretiminin *in vitro* Olarak Belirlenmesi

P. multocida izolatlarının biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak Kongo Kırmızılı Agar (CRA) yöntemi ile araştırıldı. CRA yöntemi için 1 000 mL distile su içerisinde 10 g Agar agar, 50 g glikoz, 37 g BHI broth, 0,8 g Kongo Kırmızısı boyası olacak şekilde CRA hazırlandı. BHI'da saf olarak üreyen kolonilerden tek koloni alınarak, CRA'ya ekimleri yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kolonilerde oluşan renk değişimlerine göre değerlendirilme yapıldı. Siyah-gri renk oluşumu görülen izolatlar biyofilm üretimi yönünden pozitif, renksiz/pembe-kırmızı renkli koloniler ise negatif olarak değerlendirildi (Atshan et al., 2012).

4.6. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Antibiyotiplendirme

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları ve çoklu antibiyotik direnci Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla SSH için sahada sık kullanılan antibiyotiklerden olmak üzere 6 farklı antibiyotik sınıfından 6 farklı antibiyotik (Florokinolon grubu: Danofloksasin, 5 µg; Makrolid grubu: Tilmikosin, 15 µg; Fenikol grubu: Florfenikol, 30 µg; Sefalosporin grubu: Sefquinom, 30 µg; Aminoglikozid grubu: Gentamisin, 10 µg; Tetrasiklin grubu: Tetrasiklin, 30 µg) kullanıldı. İzolatların taze kültürlerinden yoğunluğu 0,5 McFarland olacak şekilde fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan 100 µl alınarak Mueller Hinton Agar (MHA) yüzeyine yayma ekim yapıldı. Besi yeri üzerine antibiyotik diskleri yerleştirildi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan zon çapları ölçülerek CLSI (2019)'ya göre değerlendirildi.

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

İzolatların antibiyotik duyarlılık/dirençlilik durumlarının belirlenmesinden sonra ilgili antibiyotiklere direnç durumu göz önüne alınarak fenotipik yakınlıkları kalitatif ve kantitatif olarak belirlendi. Oluşan paternlerin dendrogramı, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile görüntü analiz

programı kullanılarak çizildi. İzolatlar arasındaki ilişki % 75 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak değerlendirildi.

4.7. Genotiplendirme

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

Kapsüler serogruplar bazında *P. multocida* izolatlarının filogenetik ilişkileri genetik ilişkileri % 75 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak değerlendirildi.

4.8. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında belirlenen parametrelere ait istatistiksel analizler RStudio 2022.07.2+576 ve SPSS v21 yazılımları kullanılarak hesaplandı.

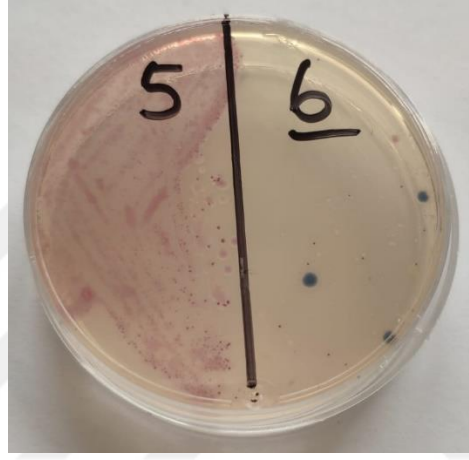
4.9. Aşı Suşu Seçimi

Aşı suşu belirlenmesindeki temel kriter olarak, yaygın görülen serogrup ve biyofilm oluşumu değerlendirildi. Biyofilm pozitif olduğu belirlenen suşlardan baskın serogrup farklılıkları göz önüne alınarak çalışmada türe özel bazı virülens faktörleri ve genleri yönünden incelenen, antibiyotik duyarlılıkları ile birlikte genotipik ve fenotipik olarak karakterize edilen suşlardan her serogrup için 1'er adet potansiyel aşı suşu belirlendi.

5. BULGULAR

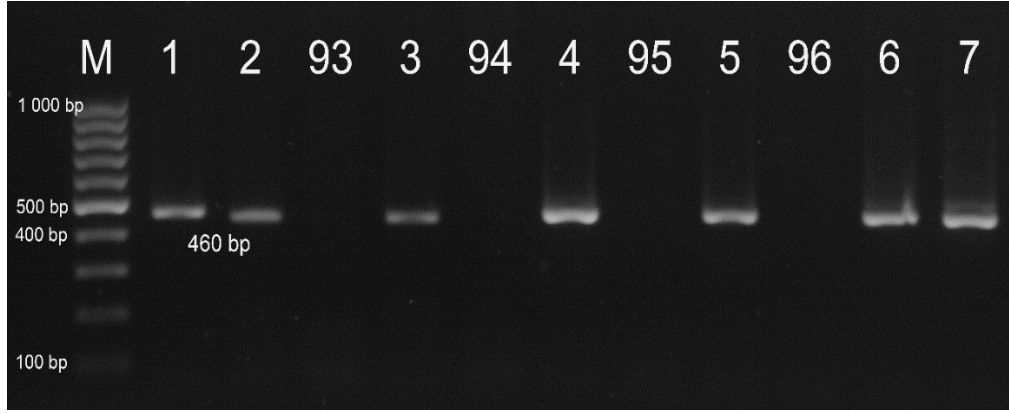
5.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Tez çalışması kapsamında *P. multocida* izolasyonu için Samsun’da bulunan mezbahalarda kesim aşamasında olan ve klinik olarak hastalık şüpheli 410 adet sığırdan alınan akciğer örneklerinin 92 tanesinden *Pasteurella* selektif besi yerinde leylak renkli bakteri kolonisi izole edildi (Şekil 5.1). Gram boyama ve oksidaz testi sonucunda tüm bakteriler Gram negatif çomak şeklinde ve oksidaz pozitif olarak belirlendi ve *P. multocida* şüpheli olarak değerlendirildi.



Şekil 5.1. *Pasteurella* selektif besi yerinde *P. multocida* kolonisi (leylak renkli)

P. multocida izolatlarının genotipik identifikasyonları Townsend vd. (1998) tarafından bildirilen protokolün optimizasyonu ile gerçekleştirildi. Optimizasyon sonrasında 5 µl ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 4 mM MgCl₂, 0,03 µM her bir primer, 250 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz ilave edilerek toplam 25 µl PCR karışımının optimum sonuç verdiği belirlendi. Optimize edilen PCR protokülü sonrasında 460 bp’lik bant görülmesi *P. multocida* için pozitif olarak kabul edildi. PCR sonucunda 92 adet izolatın tamamı 460 bp’lik bant oluşturdu ve *P. multocida* olarak identifiye edildi (Şekil 5.2).

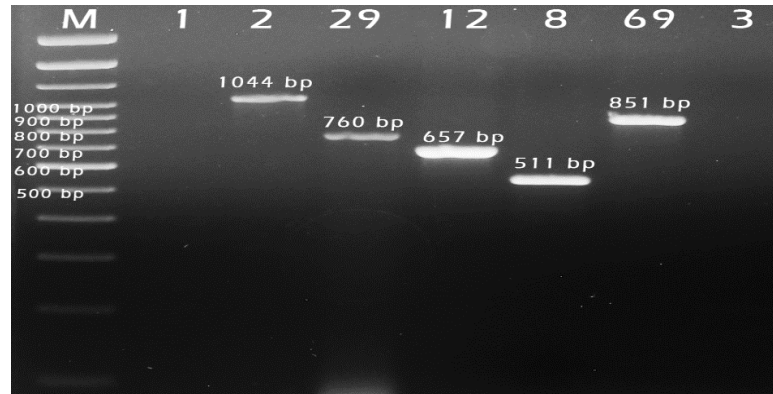


Şekil 5.2. *P. multocida* tür spesifik PCR sonucu. M: marker; 1-7: *P. multocida* pozitif izolatlar; 93-96: *P. multocida* negatif izolatlar

5.2. *P. multocida* İzolatlarının Kapsül Tiplendirmesi

Kapsüler tiplendirme amacıyla Townsend vd. (2001) tarafından bildirilen multipleks PCR protokolünün optimizasyonu gerçekleştirildi. Optimizasyon sonrasında 5 µl hedef DNA, 1X PCR tamponu, 2,7 mM MgCl₂, 3,2 µM hyaD-hyaC, ecbJ, fcbD, 1 µM bcbD ve 1,2 µM dcbF primerleri, 280 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polimeraz ilave edilerek toplam 50 µl PCR karışımının optimum sonuç verdiği belirlendi. Amplifikasyon koşulları 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 30 siklus olmak üzere 95°C'de 45 sn, 56 °C'de 45 sn, 72 °C'de 1 dk amplifikasyon ve 72 °C'de 5 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Görüntüleme sonrasında Serogrup A, Serogrup B, Serogrup D, Serogrup E ve Serogrup F için sırasıyla 1044, 760, 657, 511 ve 851 bp.'lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 5.3).

Değerlendirme sonucunda 19 izolat (% 20,65) Serogrup A, 4 izolat (% 4,35) Serogrup B, 5 izolat (% 5,43) Serogrup D, 19 izolat (% 20,65) Serogrup E ve 1 izolat (% 1,09) da Serogrup F olarak belirlendi. İzolatlardan 44'ü (% 47,83) ise PCR'da sonuç vermedi ve tiplendirilemedi (Tablo 5.1).



Şekil 5.3. *P. multocida* kapsüler tiplendirmesi için yapılan PCR sonucu. M: marker; 1,3: serogruplandırılmayan izolatlar; 2: serogrup A; 29: serogrup B; 12: serogrup D; 8: serogrup E; 69: serogrup F

Tablo 5.1. *P. multocida* kapsüler tiplendirme sonuçları

İzolot No	Serogrup	İzolot No	Serogrup
1	-	58	B
2	A	59	-
3	-	60	A
4	-	61	-
5	A	62	-
6	A	63	E
7	-	64	E
8	E	65	-
9	-	66	-
10	-	67	-
11	-	68	E
12	D	69	F
13	E	70	-
14	-	71	-
15	A	72	A
16	-	73	A
17	E	74	-
18	A	75	-
19	A	76	-
20	E	77	E
21	E	78	-
22	D	79	-
23	D	80	-
24	A	81	-
25	D	82	-
26	-	83	-
27	-	84	-
28	A	85	-
29	B	86	-
30	E	87	-
31	A	88	-
32	A	89	-
33	-	90	-
34	-	91	-
35	E	92	-
36	B		
37	E		
38	E		
39	-		
40	E		
41	D		
42	E		
43	-		
44	B		
45	-		
46	-		
47	E		
48	A		
49	A		
50	A		
51	A		
52	E		
53	A		
54	E		
55	E		
56	-		
57	A		

5.3. İzolatların Virülens Genlerinin Belirlenmesi

P. multocida izolatlarının virülens genlerinin belirlenmesi için beklenen ampikon büyüklükleri göz önüne alınarak oluşturulan 5 farklı multipleks PCR protokolü optimize edildi. Her bir multipleks PCR için optimize edilen protokoller Tablo 5.2-5.6’da gösterildi.

Tablo 5.2. *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB* ve *fimA* genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü

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

Tablo 5.3. *sodC* ve *ompH* genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü

Reaktif	Konsantrasyon					
10xPCR Buffer	1X					
MgCl ₂	2,5 mM					
dNTP	0,2 mM					
Primer	<i>sodC</i>	0,125 µm	Ön denaturasyon	94°C	5 dk	1 siklus
		0,125 µm	Denaturasyon	94°C	30 sn	
	<i>ompH</i>	0,125 µm	Annealing	55°C	30 sn	30 siklus
		0,125 µm	Uzama	72°C	30 sn	
Taq Polimeraz	1 U	Son uzama	72°C	5 dk	1 siklus	
Template DNA	5 µl					
Toplam Hacim	25 µl					

Tablo 5.4. *nanH* ve *nanB* genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü

Reaktif	Konsantrasyon					
10xPCR Buffer	1X					
MgCl ₂	2,5 mM					
dNTP	0,2 mM					
Primer	<i>nanH</i>	0,125 µm	Ön denaturasyon	94°C	5 dk	1 siklus
		0,125 µm	Denaturasyon	94°C	30 sn	
	<i>nanB</i>	0,125 µm	Annealing	57°C	30 sn	30 siklus
		0,125 µm	Uzama	72°C	30 sn	
Taq Polimeraz	1 U	Son uzama	72°C	5 dk	1 siklus	
Template DNA	5 µl					
Toplam Hacim	25 µl					

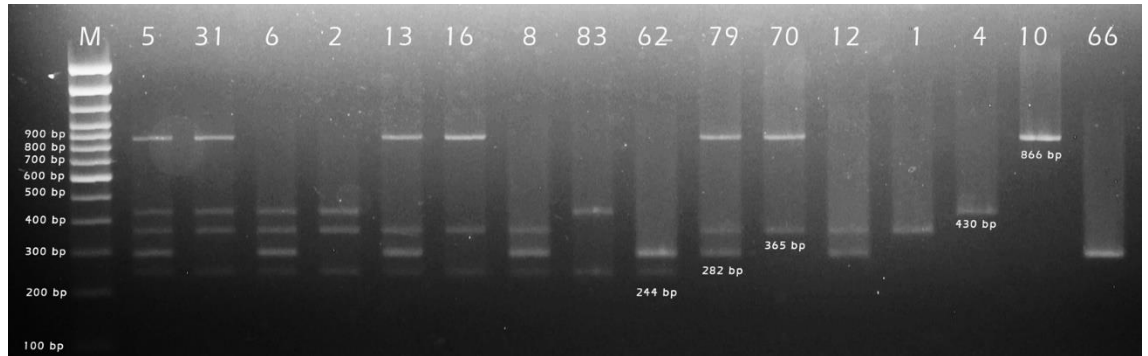
Tablo 5.5. *tox*A ve *oma*87 genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü

Reaktif	Konsantrasyon				
10xPCR buffer	1X				
MgCl ₂	2,5 mM				
dNTP	0,2 mM				
Primer	<i>tox</i> A	0,125 µm	Ön denaturasyon	94°C	5 dk 1 siklus
		0,125 µm	Denaturasyon	94°C	30 sn
	<i>oma</i> 87	0,125 µm	Annealing	45°C	30 sn 30 siklus
		0,125 µm	Uzama	72°C	30 sn
Taq polimeraz	1 U		Son uzama	72°C	5 dk 1 siklus
Template DNA	5 µl				
Toplam hacim	25 µl				

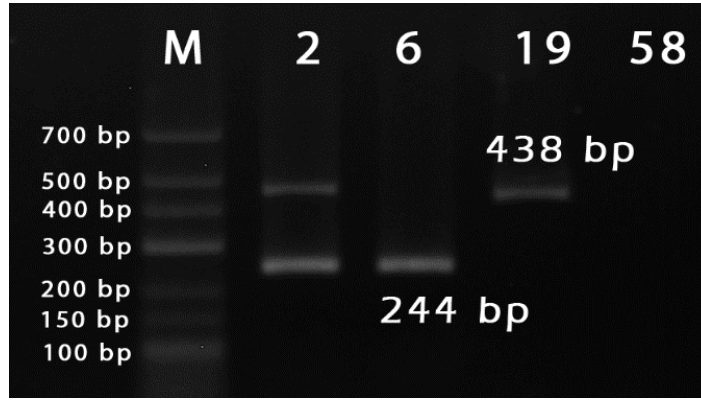
Tablo 5.6. *omp*A ve *ton*B genleri için optimize edilen multipleks PCR protokolü.

Reaktif	Konsantrasyon				
10xPCR buffer	1X				
MgCl ₂	2,5 mM				
dNTP	0,2 mM				
Primer	<i>omp</i> A	0,125 µm	Ön denaturasyon	94°C	5 dk 1 siklus
		0,125 µm	Denaturasyon	94°C	30 sn
	<i>ton</i> B	0,125 µm	Annealing	58°C	30 sn 30 siklus
		0,125 µm	Uzama	72°C	30 sn
Taq polimeraz	1 U		Son uzama	72°C	5 dk 1 siklus
Template DNA	5 µl				
Toplam hacim	25 µl				

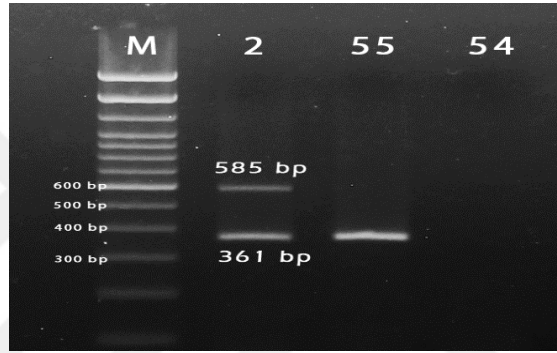
Görüntüleme sonrasında *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB* ve *fimA* için sırasıyla 244, 365, 430, 282 ve 866 bp; *sodC* ve *ompH* için sırasıyla 244 ve 438 bp; *nanH* ve *nanB* için sırasıyla 361 ve 585 bp; *tox*A ve *oma*87 için sırasıyla 866 ve 955 bp; *omp*A ve *ton*B için sırasıyla 202 ve 261 bp'lık bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 5.4 -5.8).



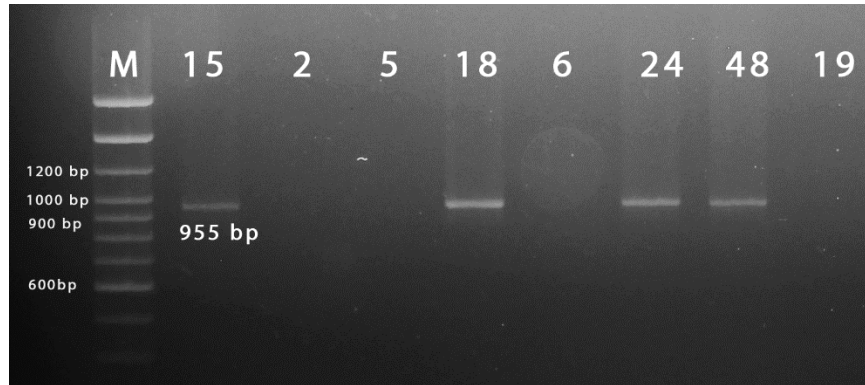
Şekil 5.4. *P. multocida* izolatlarının *fur* (244 bp), *sodA* (365 bp), *pmHAS* (430 bp), *plpB* (282 bp) ve *fimA* (866 bp) genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler. M: marker; 5: *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *fimA* ve *plpB* pozitif; 31: *fur*, *sodA*, *pmHAS* ve *fimA* pozitif; 6: *fur*, *sodA*, *pmHAS* ve *plpB* pozitif; 2: *fur*, *sodA* ve *pmHAS* pozitif; 13: *fur*, *sodA*, *fimA* ve *plpB* pozitif; 16: *fur*, *sodA* ve *fimA* pozitif; 8: *fur*, *sodA* ve *plpB* pozitif; 83: *fur* ve *pmHAS* pozitif; 62: *fur* ve *plpB* pozitif; 79: *sodA*, *fimA* ve *plpB* pozitif; 70: *sodA* ve *fimA* pozitif; 12: *sodA* ve *plpB* pozitif; 1: *sodA* pozitif; 4: *pmHAS* pozitif; 10: *fimA* pozitif; 66: *plpB* pozitif



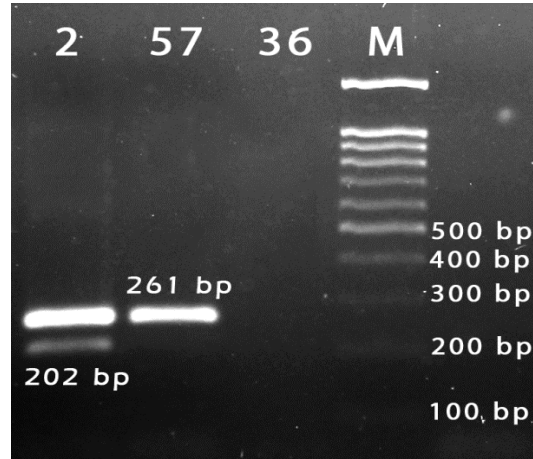
Şekil 5.5. *P. multocida* izolatlarının *sodC* (244 bp) ve *ompH* (438 bp) genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler. M: marker; 2: *sodC* ve *ompH* pozitif; 6: *sodC* pozitif; 19: *ompH* pozitif; 58: *sodC* ve *ompH* negatif



Şekil 5.6. *P. multocida* izolatlarının *nanH* (361 bp) ve *nanB* (585 bp) genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler. M: marker; 2: *nanH* ve *nanB* pozitif; 55: *nanB* pozitif; 54: *nanH* ve *nanB* negatif



Şekil 5.7. *P. multocida* izolatlarının *tox*A (866 bp) ve *oma*87 (955 bp) genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler. M: marker; 15,18,24,48: *oma*87 pozitif; 2,5,6,19: *tox*A ve *oma*87 negatif



Şekil 5.8. *P. multocida* izolatlarının *ompA* (202 bp) ve *tonB* (261 bp) genleri için optimize edilen multipleks PCR sonucunda belirlenen virulotipler. M: marker; 2: *ompA* ve *tonB* pozitif; 57: *tonB* pozitif; 36: *ompA* ve *tonB* negatif

İncelenen 92 adet izolatın 56 (% 60,87), 72 (% 78,26), 33 (% 35,87), 65 (% 70,65), 40 (% 43,48), 45 (% 48,91), 22 (% 23,91), 28 (% 30,43), 45 (% 48,91), 47 (% 51,09), 31 (% 33,70), 0 (% 0,00) ve 7'si (% 7,61) sırasıyla *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB*, *fimA*, *sodC*, *ompH*, *ompA*, *tonB*, *nanH*, *nanB*, *tox*A ve *oma87* için pozitif sonuç verdi. İzolatların virülens gen profilleri Tablo 5.7 ve Tablo 5.8'de sunuldu.

Tablo 5.7. *P. multocida* izolatlarının *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB* ve *fimA* gen profilleri

İzolat No.	<i>fur</i>	<i>sodA</i>	<i>pmHAS</i>	<i>plpB</i>	<i>fimA</i>
1	-	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-
3	-	+	-	-	-
4	-	-	+	-	-
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	-
7	-	-	+	-	-
8	+	-	-	+	-
9	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	+
11	-	+	-	-	-
12	-	+	-	+	-
13	+	+	-	+	-
14	+	+	-	+	-
15	+	+	+	+	-
16	+	-	-	-	-
17	+	-	-	+	-
18	+	+	+	+	-
19	+	+	+	+	+
20	+	+	-	+	-
21	+	+	-	+	-
22	+	+	-	+	-
23	+	+	-	+	-
24	+	+	+	+	-
25	+	+	+	+	-
26	-	+	-	-	-
27	-	+	-	+	-

Tablo 5.7. (devam)

İzolat No.	<i>fur</i>	<i>sodA</i>	<i>pmHAS</i>	<i>plpB</i>	<i>fimA</i>
28	+	+	+	+	+
29	-	+	-	+	-
30	+	+	-	+	-
31	+	+	+	-	+
32	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+
34	-	+	-	+	-
35	-	+	-	-	-
36	+	-	-	+	-
37	-	+	-	+	-
38	-	+	-	+	-
39	+	+	-	+	+
40	+	+	-	+	+
41	+	+	-	+	-
42	-	-	-	+	-
43	+	+	-	+	+
44	+	-	-	+	-
45	-	+	-	-	-
46	-	+	-	+	-
47	+	+	-	+	-
48	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+
51	+	+	+	+	+
52	+	+	+	+	+
53	+	+	+	+	+
54	+	+	-	+	+
55	+	-	+	+	-
56	-	-	-	+	-
57	+	+	+	+	+
58	+	-	-	+	-
59	-	+	-	-	-
60	+	+	+	+	+
61	+	+	+	+	+
62	+	+	+	+	+
63	+	+	+	+	+
64	+	+	-	+	-
65	+	-	-	-	+
66	-	-	-	+	-
67	+	-	-	+	-
68	-	+	-	-	-
69	-	+	-	-	-
70	-	+	-	-	+
71	+	+	+	-	+
72	+	+	+	-	+
73	+	+	+	-	+
74	-	-	+	-	-
75	-	+	-	-	+
76	+	-	-	+	-
77	-	-	-	+	-
78	-	+	-	-	+
79	-	+	-	+	+
80	-	+	-	+	+
81	-	-	-	+	-
82	-	+	-	+	+
83	+	+	-	-	+
84	+	-	-	+	-

Tablo 5.7. (devam)

İzolat No.	<i>fur</i>	<i>sodA</i>	<i>pmHAS</i>	<i>plpB</i>	<i>fimA</i>
85	+	+	-	+	+
86	-	+	-	-	-
87	+	+	+	-	+
88	+	+	+	+	+
89	-	+	-	+	+
90	-	+	-	+	+
91	+	+	+	+	+
92	-	+	-	+	+

Tablo 5.8. *P. multocida* izolatlarının *sodC*, *ompH*, *ompA*, *tonB*, *nanH*, *nanB*, *toxA* ve *oma87* gen profilleri

İzolat No.	<i>sodC</i>	<i>ompH</i>	<i>ompA</i>	<i>tonB</i>	<i>nanH</i>	<i>nanB</i>	<i>toxA</i>	<i>oma87</i>
1	+	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	+	+	+	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	-	-
6	+	-	+	+	+	+	-	-
7	-	+	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	+	+	+	-	-
12	+	-	-	+	+	+	-	-
13	+	-	-	+	-	-	-	-
14	+	-	-	+	-	-	-	-
15	+	-	+	+	+	+	-	+
16	-	+	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+	+	-	+
19	-	+	+	+	+	+	-	-
20	-	-	-	+	-	-	-	-
21	-	-	-	+	-	-	-	-
22	-	-	-	+	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	+	+	+	+	-	+
25	+	-	+	+	+	+	-	-
26	-	+	-	+	-	-	-	-
27	-	+	-	+	-	-	-	-
28	+	-	+	+	+	+	-	-
29	+	-	+	+	-	-	-	-
30	-	-	-	+	-	-	-	-
31	+	-	+	+	+	+	-	-
32	+	-	+	+	+	+	-	-
33	+	-	+	+	+	+	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
36	+	+	-	-	+	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-
41	+	+	-	-	-	-	-	-
42	+	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	+	-	-	-	-	-	-

Tablo 5.8. (devam)

İzolat No.	<i>sodC</i>	<i>ompH</i>	<i>ompA</i>	<i>tonB</i>	<i>nanH</i>	<i>nanB</i>	<i>toxA</i>	<i>oma87</i>
45	-	-	-	-	-	-	-	-
46	+	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	+	-	-	-	-
48	+	-	+	+	+	+	-	+
49	+	+	+	+	+	+	-	+
50	+	+	+	+	+	+	-	+
51	+	+	+	+	+	+	-	-
52	+	-	+	+	+	+	-	-
53	+	-	+	+	+	+	-	-
54	-	-	-	+	-	-	-	-
55	-	+	-	-	+	-	-	-
56	-	-	-	-	+	-	-	-
57	+	-	-	+	+	+	-	+
58	-	-	-	+	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-
60	+	+	+	+	+	+	-	-
61	+	+	+	+	+	+	-	-
62	+	-	+	+	+	+	-	-
63	+	+	+	+	+	+	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	+	+	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-
69	+	-	-	+	+	+	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-
71	+	-	+	+	+	-	-	-
72	+	-	+	+	+	+	-	-
73	+	+	+	+	+	+	-	-
74	+	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-
76	+	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	+	-	-	-
78	-	-	-	-	+	-	-	-
79	-	-	-	-	+	-	-	-
80	-	-	-	-	+	-	-	-
81	+	+	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	+	-	-	-
83	-	-	-	-	+	-	-	-
84	+	-	-	-	+	-	-	-
85	-	-	-	-	+	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-
87	-	-	-	-	+	-	-	-
88	-	-	-	-	+	-	-	-
89	+	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	+	-	-	-	-
91	-	-	-	-	+	-	-	-
92	+	-	-	-	-	-	-	-

Serogrup A-F içerisinde tiplendirilen izolatlar ile beraber tiplendirilemeyen izolatların virülens genlerini içerme sayı ve oranları Tablo 5.9 ve Tablo 5.10'da sunuldu.

Tablo 5.9. *P. multocida* serogruplarının *fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB* ve *fimA* gen profilleri

Serogrup		<i>fur</i>	<i>sodA</i>	<i>pmHAS</i>	<i>plpB</i>	<i>fimA</i>
A (n=19)	n	19	19	19	15	14
	%	100,0	100,0	100,0	78,95	73,68
B (n=4)	n	3	1	0	4	0
	%	75,00	25,00	0,0	100,0	0,0
D (n=5)	n	4	5	1	5	0
	%	80,00	100,0	20,00	100,0	0,0
E (n=19)	n	13	14	3	17	4
	%	68,42	73,68	15,79	89,47	21,05
F (n=1)	n	0	1	0	0	0
	%	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Serotiplendirilemeyen (n=44)	n	17	32	10	24	22
	%	38,64	72,73	22,73	54,55	50,0
Toplam	n	56	72	33	65	40,0
	%	60,87	78,26	35,87	70,65	43,48

Tablo 5.10. *P. multocida* serogruplarının *sodC*, *ompH*, *ompA*, *tonB*, *nanH*, *nanB*, *toxA* ve *oma87* gen profilleri

Serogrup		<i>sodC</i>	<i>ompH</i>	<i>ompA</i>	<i>tonB</i>	<i>nanH</i>	<i>nanB</i>	<i>toxA</i>	<i>oma87</i>
A (n=19)	n	18	9	18	19	19	19	0	7
	%	94,74	47,37	94,74	100,0	100,0	100,0	0,0	36,8
B (n=4)	n	3	2	1	2	1	0	0	0,0
	%	75,00	50,00	25,00	50,00	25,00	0,0	0,0	0,0
D (n=5)	n	3	1	1	3	2	2	0	0,0
	%	60,00	20,00	20,00	60,00	40,00	40,00	0,0	0,0
E (n=19)	n	5	2	2	8	4	2	0	0,0
	%	26,32	10,53	10,53	42,11	21,05	10,53	0,0	0,0
F (n=1)	n	1	0	0	1	1	1	0	0
	%	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
Serotiplendirilemeyen (n=44)	n	15	8	6	12	20	7	0	0
	%	34,09	18,18	13,64	27,27	45,45	15,91	0,0	0,0
Toplam	n	45	22	28	45	47	31	0,0	7
	%	48,91	23,91	30,43	48,91	51,09	33,70	0,0	7,61

Tez çalışması kapsamında elde edilen 92 adet *P. multocida* izolatının incelenen 13 geni (*fur*, *sodA*, *pmHAS*, *plpB*, *fimA*, *sodC*, *ompH*, *ompA*, *tonB*, *nanH*, *nanB*, *toxA* ve *oma87*) içerme durumlarına göre virulotiplendirilmesi yapıldı. Virulotiplendirme sonucu Tablo 5.11’de gösterildi.

Tablo 5.11. *P. multocida* izolatlarının virulotiplendirilmesi

Virulotip	İzolat no	Serogrup	İzolat sayısı	Virülens geni sayısı	Virülens genleri
V1	49 50	A A	2	12	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, fimA, sodC, ompH, ompA, tonB, nanH, nanB, oma87</i>
V2	5 51 60 61 63	A A A - E	5	11	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, fimA, sodC, ompH, ompA, tonB, nanH, nanB</i>
V3	48	A	1	11	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, fimA, sodC, ompA, tonB, nanH, nanB, oma87</i>
V4	18	A	1	11	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, sodC, ompH, ompA, tonB, nanH, nanB, oma87</i>
V5	28 32 33 52 53 62	A A - E A -	6	10	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, fimA, sodC, ompA, tonB, nanH, nanB</i>
V6	15 24	A A	2	10	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, sodC, ompA, tonB, nanH, nanB, oma87</i>
V7	57	A	1	10	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, fimA, sodC, tonB, nanH, nanB, oma87</i>
V8	19	A	1	10	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, fimA, ompH, ompA, tonB, nanH, nanB</i>
V9	73	A	1	10	<i>fur, sodA, pmHAS, fimA, sodC, ompH, ompA, tonB, nanH, nanB</i>
V10	6 25	A D	2	9	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, sodC, ompA, tonB, nanH, nanB</i>
V11	31 72	A A	2	9	<i>fur, sodA, pmHAS, fimA, sodC, ompA, tonB, nanH, nanB</i>
V12	2	A	1	9	<i>fur, sodA, pmHAS, sodC, ompH, ompA, tonB, nanH, nanB</i>
V13	71	-	1	8	<i>fur, sodA, pmHAS, fimA, sodC, ompA, tonB, nanH</i>
V14	1 3	- -	2	7	<i>sodA, sodC, ompH, ompA, tonB, nanH, nanB</i>
V15	88 91	- -	2	6	<i>plpB, fur, sodA, pmHAS, fimA, nanH</i>
V16	12	D	1	6	<i>plpB, sodA, sodC, tonB, nanH, nanB</i>
V17	13 14	E -	2	5	<i>plpB, fur, sodA, sodC, tonB</i>
V18	11 69	- F	2	5	<i>sodA, sodC, tonB, nanH, nanB</i>
V19	87	-	1	5	<i>fur, sodA, pmHAS, fimA, nanH</i>
V20	54	E	1	5	<i>plpB, fur, sodA, fimA, tonB</i>
V21	85	-	1	5	<i>plpB, fur, sodA, fimA, nanH</i>
V22	41	D	1	5	<i>plpB, fur, sodA, sodC, ompH</i>
V23	55	E	1	5	<i>plpB, fur, pmHAS, ompH, nanH</i>
V24	36	B	1	4	<i>plpB, fur, sodC, ompH</i>
V25	29	B	1	5	<i>plpB, sodA, sodC, ompA, tonB</i>

Tablo 5.11. (devam)

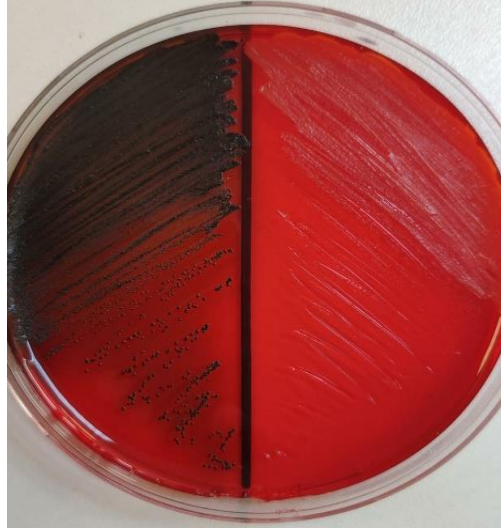
Virulotip	İzolat no	Serogrup	İzolat sayısı	Virülens geni sayısı	Virülens genleri
V26	20	E	5	4	<i>plpB, fur, sodA, tonB</i>
	21	E			
	22	D			
	30	E			
	47	E			
V27	39	-	3	4	<i>plpB, fur, sodA, fimA</i>
	40	E			
	43	-			
V28	79	-	3	4	<i>plpB, sodA, fimA, nanH</i>
	80	-			
	82	-			
V29	89	-	2	4	<i>plpB, sodA, fimA, sodC</i>
	92	-			
V30	44	B	1	4	<i>plpB, fur, sodC, ompH,</i>
V31	84	-	1	4	<i>plpB, fur, sodC, nanH</i>
V32	90	-	1	4	<i>plpB, sodA, fimA, tonB</i>
V33	27	-	1	4	<i>plpB, sodA, ompH, tonB</i>
V34	83	-	1	4	<i>fur, sodA, fimA, nanH</i>
V35	23	D	2	3	<i>plpB, fur, sodA</i>
	64	E			
V36	8	E	2	3	<i>plpB, fur, sodC</i>
	76	-			
V37	58	B	1	3	<i>plpB, fur, tonB</i>
V38	46	-	1	3	<i>plpB, sodA, sodC</i>
V39	81	-	1	3	<i>plpB, sodC, ompH</i>
V40	66	-	1	3	<i>plpB, nanH, nanB</i>
V41	78	-	1	3	<i>sodA, fimA, nanH</i>
V42	26	-	1	3	<i>sodA, ompH, tonB</i>
V43	34	-	3	2	<i>plpB, sodA</i>
	37	E			
	38	E			
V44	17	E	2	2	<i>plpB, fur</i>
	67	-			
V45	70	-	2	2	<i>sodA, fimA</i>
	75	-			
V46	56	-	2	2	<i>plpB, nanH</i>
	77	E			
V47	42	E	1	2	<i>plpB, sodC</i>
V48	16	-	1	2	<i>fur, ompH</i>
V49	65	-	1	2	<i>fur, fimA</i>
V50	9	-	1	2	<i>sodA, nanH</i>
V51	74	-	1	2	<i>pmHAS, sodC</i>
V52	7	-	1	2	<i>pmHAS, ompH</i>
V53	4	-	1	2	<i>pmHAS, tonB</i>
V54	35	E	5	1	<i>sodA</i>
	45	-			
	59	-			
	68	E			
V55	86	-	1	1	<i>fimA</i>
	10	-			

5.4. Biyofilm Üretiminin *in vitro* Olarak Belirlenmesi

P. multocida izolatlarının biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak CRA yöntemi ile araştırıldı. İncelenen 92 adet izolatın 52 (% 56,52)'si CRA'da siyah koloni oluşturdu ve biyofilm oluşturma özelliği yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 5.9). *P. multocida* izolatlarının biyofilm oluşturma profilleri Tablo 5.12'de sunuldu. Buna göre serogrup A, B, D ve E içerisinde yer alan izolatlar ile beraber tiplendirilemeyen izolatlardan sırasıyla 9 (% 47,37), 3 (% 75,00) , 5 (% 100), 7 (% 36,84) ve 28 (% 63,64)'inin biyofilm oluşturduğu saptandı. Serogrup F içerisinde bulunan bir adet izolatın ise biyofilm üretimi yönünden negatif olduğu belirlendi.

Tablo 5.12. *P. multocida* izolatlarının biyofilm oluşturma durumları

İzolat no.	Biyofilm	İzolat no.	Biyofilm	İzolat no.	Biyofilm
1	-	35	-	69	-
2	+	36	+	70	-
3	-	37	-	71	-
4	+	38	-	72	-
5	-	39	+	73	-
6	-	40	-	74	-
7	+	41	+	75	-
8	+	42	-	76	+
9	+	43	+	77	+
10	-	44	+	78	+
11	+	45	-	79	+
12	+	46	+	80	+
13	-	47	-	81	+
14	+	48	+	82	+
15	+	49	-	83	+
16	+	50	-	84	+
17	+	51	-	85	-
18	-	52	+	86	+
19	+	53	-	87	-
20	+	54	-	88	-
21	+	55	-	89	+
22	+	56	+	90	+
23	+	57	+	91	-
24	+	58	-	92	+
25	+	59	+		
26	-	60	-		
27	+	61	-		
28	+	62	+		
29	+	63	-		
30	+	64	-		
31	+	65	+		
32	+	66	-		
33	-	67	+		
34	+	68	-		



Şekil 5.9. *P. multocida* izolatlarının CRA’da biyofilm oluşturma durumları. Biyofilm pozitif: siyah koloniler; Biyofilm negatif: renksiz koloniler

5.5. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Antibiyotiplendirme

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları ve çoklu antibiyotik direnci Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile 6 farklı antibiyotik sınıfından 6 farklı antibiyotik için belirlendi. İncelenen 92 adet izolatın 22 (% 23,91), 33 (% 35,87), 10 (% 10,87), 33 (% 35,87), 17 (% 18,48) ve 70 (% 76,09)’i sırasıyla danofloksasin, tilmikosin, florfenikol, sefkuinom, gentamisin ve tetrasiklin’e dirençli bulundu. Serogrup A-F içerisinde tiplendirilen izolatlar ile beraber tiplendirilemeyen izolatların antibiyotik direnç profili Tablo 5.13 ve Tablo 5.14’de sunuldu.

Tablo 5.13. *P. multocida* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri

İzolat No.	Serogrup	DAN	TIL	FFC	CEQ	CN	TE
1	-	R	S	S	S	S	S
2	A	S	R	S	R	S	R
3	-	S	S	S	R	S	S
4	-	R	R	S	S	S	R
5	A	S	S	S	R	S	R
6	A	S	S	S	R	S	R
7	-	S	S	S	R	S	R
8	E	R	R	S	R	S	R
9	-	R	R	R	R	R	R
10	-	S	R	S	R	S	R
11	-	R	R	S	I	S	R
12	D	R	R	R	R	S	R
13	E	S	S	S	R	R	R
14	-	R	R	S	I	I	R
15	A	R	R	S	R	R	R
16	-	R	R	R	R	R	R
17	E	R	R	R	S	R	R
18	A	R	R	S	R	R	R
19	A	R	S	S	R	R	R
20	E	S	R	S	S	S	R
21	E	S	S	S	S	S	R
22	D	R	R	R	R	S	R

Tablo 5.13. (Devam)

İzolat No.	Serogrup	DAN	TIL	FFC	CEQ	CN	TE
23	D	S	R	S	S	S	R
24	A	R	R	R	R	S	R
25	D	I	R	S	S	S	R
26	-	S	S	S	S	S	S
27	-	S	S	S	R	R	R
28	A	R	R	R	R	S	R
29	B	S	S	I	S	R	R
30	E	S	S	S	S	R	S
31	A	S	S	S	S	R	R
32	A	S	S	S	I	R	R
33	-	R	R	S	S	R	R
34	-	R	S	S	S	S	R
35	E	R	S	S	S	S	R
36	B	I	R	S	S	S	R
37	E	R	S	S	S	S	R
38	E	R	S	S	S	S	R
39	-	S	S	S	S	S	R
40	E	I	S	S	R	S	R
41	D	S	R	S	S	S	R
42	E	S	S	S	S	S	S
43	-	S	R	S	S	S	R
44	B	S	R	S	S	R	R
45	-	I	R	S	R	S	S
46	-	S	R	S	S	S	R
47	E	S	S	S	S	S	R
48	A	I	R	I	R	I	R
49	A	S	S	S	R	S	R
50	A	S	S	S	R	S	R
51	A	R	R	S	R	R	R
52	E	I	S	S	S	S	R
53	A	S	S	S	S	S	R
54	E	S	S	S	S	S	R
55	E	S	S	S	S	S	S
56	-	S	R	S	R	R	R
57	A	S	S	S	R	S	R
58	B	I	S	S	S	S	S
59	-	S	S	S	R	S	R
60	A	S	S	S	S	S	R
61	-	S	S	S	S	S	R
62	-	S	S	S	R	S	R
63	E	S	R	S	S	S	R
64	E	S	S	S	S	S	S
65	-	S	S	S	S	S	S
66	-	S	S	S	S	S	S
67	-	S	R	S	S	S	R
68	E	S	S	S	S	S	S
69	F	S	S	S	S	S	S
70	-	S	S	R	S	I	S
71	-	S	S	S	S	S	S
72	A	S	S	S	S	S	R
73	A	S	S	S	R	S	R
74	-	R	R	R	R	R	R
75	-	S	S	R	S	S	R
76	-	S	S	S	S	S	R
77	E	S	S	S	R	S	R
78	-	S	S	S	S	S	R
79	-	S	S	S	S	S	R

Tablo 5.13 (Devam)

İzolat No.	Serogrup	DAN	TIL	FFC	CEQ	CN	TE
80	-	S	S	I	S	S	R
81	-	S	R	S	I	S	R
82	-	S	S	S	I	S	S
83	-	I	R	S	S	I	R
84	-	S	S	S	S	S	S
85	-	S	S	S	S	S	R
86	-	S	S	S	R	S	R
87	-	S	S	S	S	S	S
88	-	S	S	S	S	S	S
89	-	S	S	S	S	S	S
90	-	S	S	S	S	S	S
91	-	S	S	S	R	S	R
92	-	S	S	S	S	S	S

DAN: danofloksasin; TIL: tilmikosin; FFC: florfenikol; CEQ: sefkuinom; CN: gentamisin; TE: tetrasiklin

Tablo 5.14. *P. multocida* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

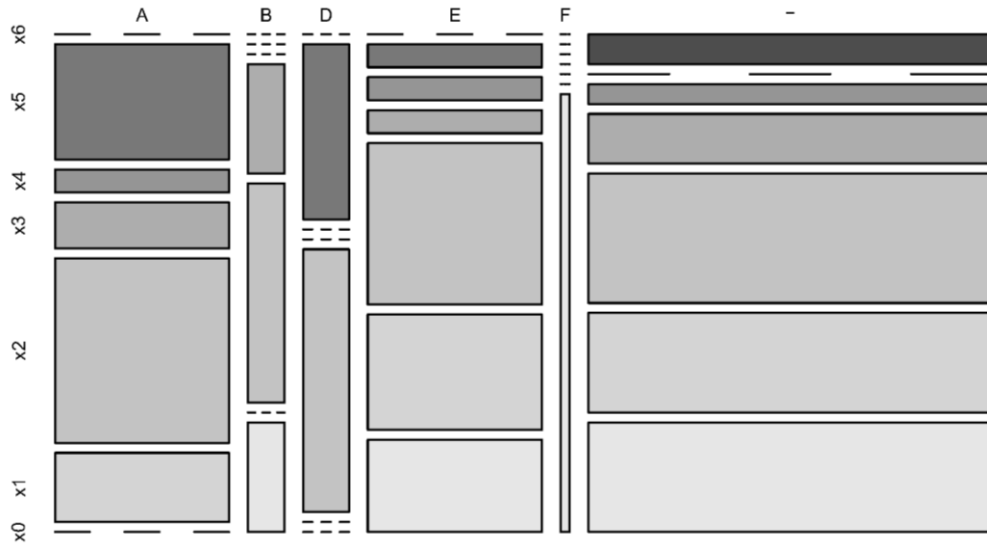
Serogrup		DAN n (%)	TIL n (%)	FFC n (%)	CEQ n (%)	CN n (%)	TE n (%)
A (n=19)	R	6 (31,58)	7 (36,84)	2 (10,53)	14 (73,68)	6 (31,58)	19 (100)
	I	1 (5,26)	0 (0)	1 (5,26)	1 (5,26)	1 (5,26)	0 (0)
	S	12 (63,16)	12 (63,16)	16 (84,21)	4 (21,05)	12 (63,16)	0 (0)
B (n=4)	R	0 (0)	2 (50,00)	0 (0)	0 (0)	2 (50,00)	3 (75,00)
	I	2 (50,00)	0 (0)	1 (25,00)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	S	2 (50,00)	2 (50,00)	3 (75,00)	4 (100)	2 (50,00)	1 (25,00)
D (n=5)	R	2 (40,00)	5 (100)	2 (40,00)	2 (40,00)	0 (0)	5 (100)
	I	1 (20,00)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	S	2 (40,00)	0 (0)	3 (60,00)	3 (60,00)	5 (100)	0 (0)
E (n=19)	R	5 (26,32)	4 (21,05)	1 (5,26)	4 (21,05)	3 (15,79)	14 (73,68)
	I	2 (10,53)	0 (0)	0 (0)	0(0)	0(0)	0 (0)
	S	12 (63,16)	15 (78,95)	18 (94,74)	15 (78,95)	16 (84,21)	5 (26,32)
F (n=1)	R	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	S	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1(100)	1 (100)
Negatif (n=44)	R	9 (20,45)	15 (34,09)	5 (11,36)	13 (29,55)	6 (13,64)	29 (65,91)
	I	2 (4,55)	0 (0)	1 (2,27)	4 (9,09)	3 (6,82)	0 (0)
	S	33 (75,00)	29 (65,91)	38 (86,36)	27 (61,36)	35 (79,55)	15 (34,09)
Toplam (n=92)	R	22 (23,91)	33 (35,87)	10 (10,87)	33 (35,87)	17 (18,48)	70 (76,09)
	I	8 (8,70)	0 (0)	3 (3,26)	5 (5,43)	4 (4,35)	0 (0)
	S	62 (67,39)	59 (64,13)	79 (85,87)	54 (58,70)	71 (77,17)	22 (23,91)

DAN: danofloksasin; TIL: tilmikosin; FFC: florfenikol; CEQ: sefkuinom; CN: gentamisin; TE: tetrasiklin

İzolatlardan üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına dirençli olanları çoklu antibiyotik direncine sahip izolat olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda 24 (% 26,09) adet izolat çoklu dirençli olarak belirlendi. Serogrup A-F'ye dâhil olan izolatlarda çoklu direnç oranları sırasıyla % 42,11, % 25,00, % 40,00, % 15,79 ve % 0,00 olarak hesaplandı (Tablo 5.15 ve Şekil 5.10).

Tablo 5.15. *P. multocida* izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profilleri

		Direnç saptanan antibiyotik							Çoklu Direnç
		0	1	2	3	4	5	6	
Serogrup A (n=19)	n	0	3	8	2	1	5	0	8
	%	0,00%	15,79%	42,11%	10,53%	5,26%	26,32%	0,00%	42,11%
Serogrup B (n=4)	n	1	0	2	1	0	0	0	1
	%	25,00%	0,00%	50,00%	25,00%	0,00%	0,00%	0,00%	25,00%
Serogrup D (n=5)	n	0	0	3	0	0	2	0	2
	%	0,00%	0,00%	60,00%	0,00%	0,00%	40,00%	0,00%	40,00%
Serogrup E (n=19)	n	4	5	7	1	1	1	0	3
	%	21,05%	26,32%	36,84%	5,26%	5,26%	5,26%	0,00%	15,79%
Serogrup F (n=1)	n	1	0	0	0	0	0	0	0
	%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Negatif (n=44)	n	11	10	13	5	2	0	3	10
	%	25,00%	22,73%	29,55%	11,36%	4,55%	0,00%	6,82%	22,73%
Toplam (n=92)	n	17	18	33	9	4	8	3	24
	%	18,48%	19,57%	35,87%	9,78%	4,35%	8,70%	3,26%	26,09%

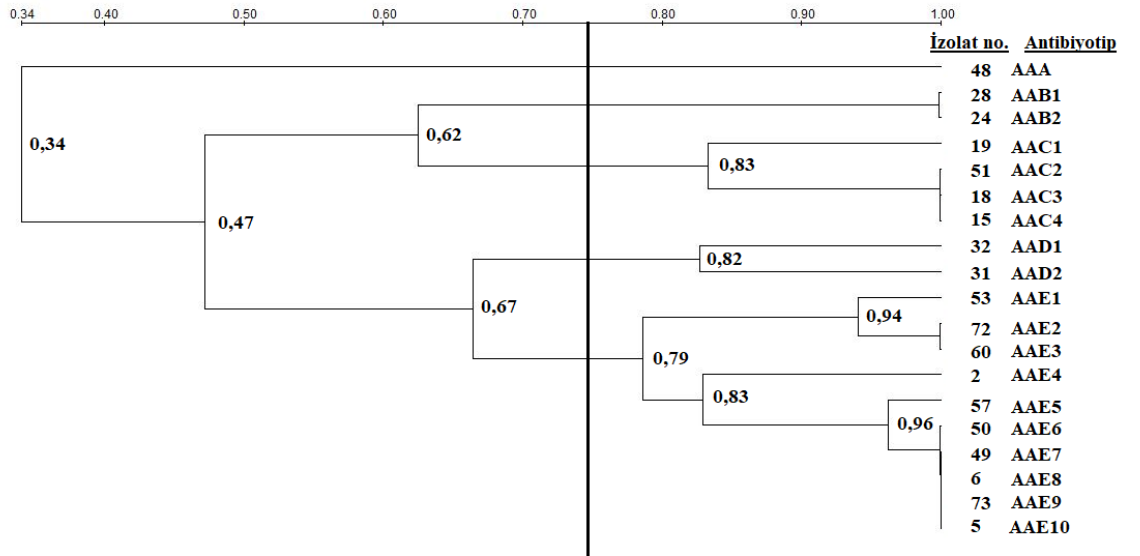


Şekil 5.10. *P. multocida* izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profilleri

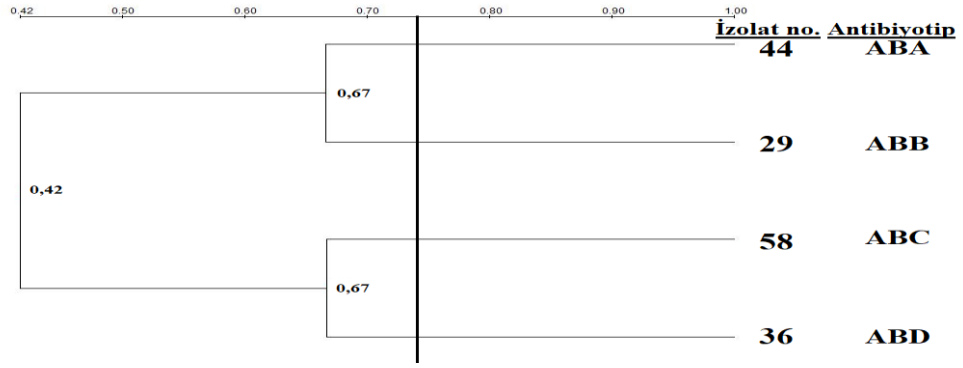
İzolatların çalışma kapsamında kullanılan antibiyotiklere direnç durumu göz önüne alınarak fenotipik yakınlıkları kantitatif olarak belirlendi. *P. multocida* izolatlarının fenotipik yakınlıklarının hesaplanması sonucunda serogrup A, B, D ve E'ye dâhil olan izolatların sırasıyla % 34-100, % 42-67, % 50-83 ve % 33-100 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı (Şekil 5.11-5.14). Serogrup F olarak belirlenen izolat sayısı bir olduğu için antibiyotiplendirmesi yapılamadı. Serogruplandırılmayan 44 adet izolatın da % 30-100 oranında benzerlik gösterdiği saptandı (Şekil 5.15).

İzolatlar arasındaki antibiyotik duyarlılık fenotipi yönünden ilişki % 75 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda serogrup A'ya dâhil olan izolatların 1 tekli antibiyotip (AAA) ile beraber 4 çoklu antibiyotipe (AAB-AAE) sahip olduğu belirlendi. AAB çoklu antibiyotipinde yer alan

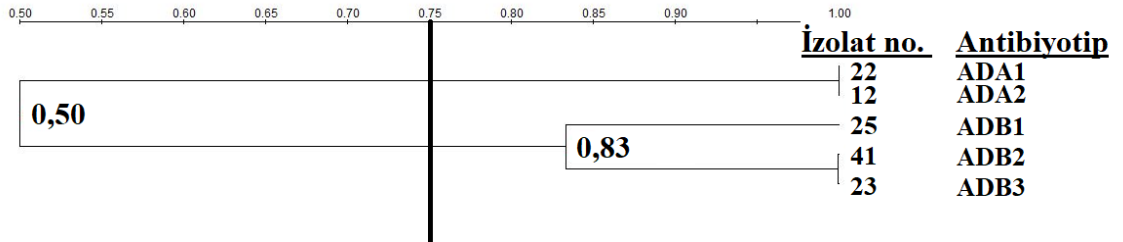
2 adet izolatın % 100, AAC çoklu antibiyotipinde yer alan 4 adet izolatın % 83-100, AAD çoklu antibiyotipinde yer alan 2 adet izolatın % 82 ve AAE çoklu antibiyotipinde yer alan 10 adet izolatın da % 79-100 oranlarında benzerlik gösterdiği görüldü. Serogrup B içerisinde yer alan izolatların 4 farklı antibiyotip (ABA, ABB, ABC, ABD) oluşturduğu görüldü. Serogrup D'ye ait izolatların 2 farklı çoklu antibiyotip (ADA ve ADB) oluşturduğu görüldü. ADA çoklu antibiyotipine ait 2 izolatın % 100 oranında benzer olduğu, ADB çoklu antibiyotipine ait izolatların ise % 83-100 oranında benzerlik gösterdiği saptandı. Serogrup E'ye ait izolatların 3 tane tekli (AEA-AEC), 4 tane çoklu (AED-AEG) antibiyotipe sahip olduğu belirlendi. AED çoklu antibiyotipinde yer alan 5 izolatın % 83-100, AEE çoklu antibiyotipinde yer alan 2 izolatın % 98, AEF çoklu antibiyotipinde yer alan 2 izolatın % 83, AEG çoklu antibiyotipinde yer alan 7 izolatın ise % 79-100 oranlarında benzerlik gösterdiği görüldü. Serogrup F'de 1 adet izolat bulunduğu için antibiyotiplendirilemedi. Serogruplandırılmayan 44 adet izolatın da 5 tekli ve 8 çoklu antibiyotipe sahip olduğu belirlendi.



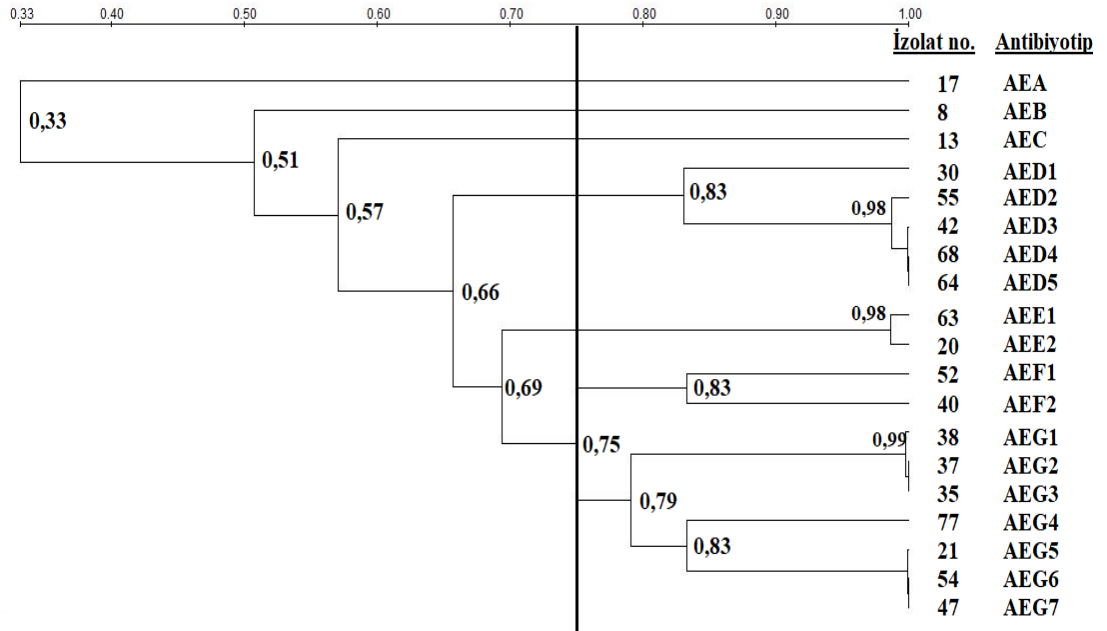
Şekil 5.11. Serogrup A içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları



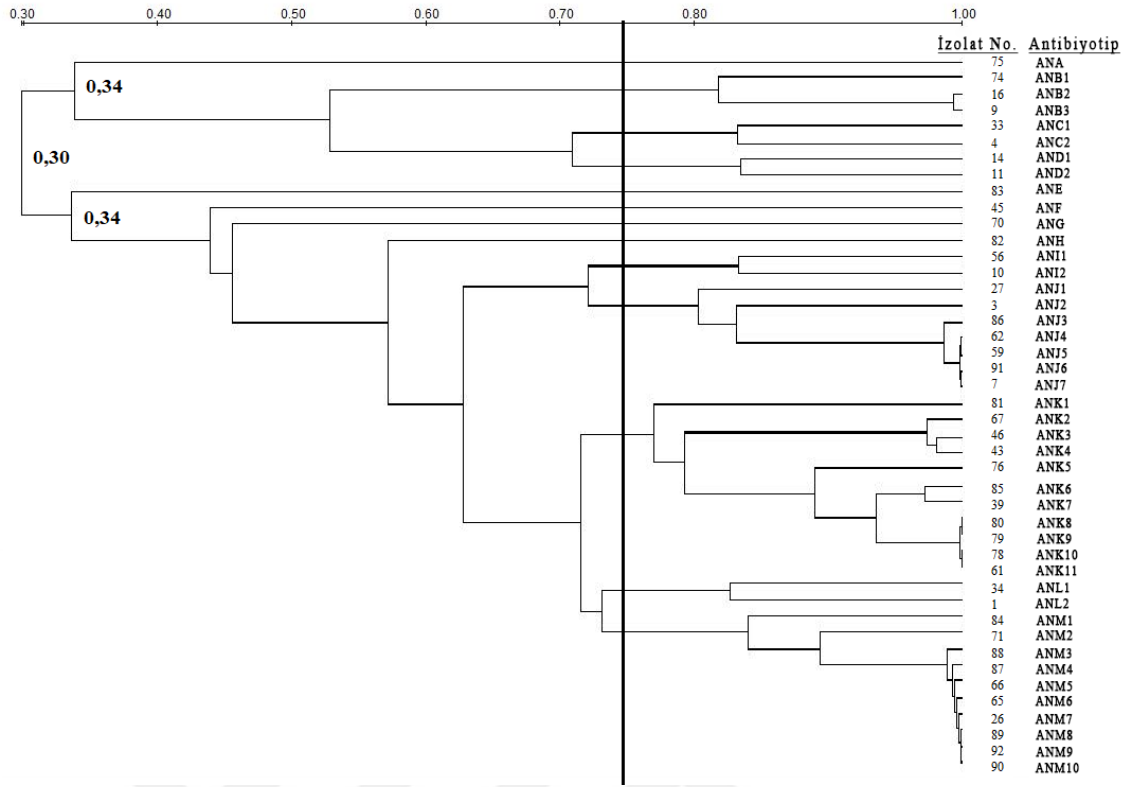
Şekil 5.12. Serogrup B içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları



Şekil 5.13. Serogrup D içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları



Şekil 5.14. Serogrup E içerisinde yer alan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları



Şekil 5.15. Serogruplandırılmayan izolatların kantitatif antibiyotiplendirme sonuçları

İzolatların antibiyotik direnç profilleri kalitatif olarak da değerlendirildi ve çalışma kapsamında incelenen özelliklerin karşılaştırmalı değerlendirmesi yapıldı (Tablo 5.16).

Tablo 5.16. *P. multocida* izolatlarının kalitatif antibiyotiplendirmesi ve karşılaştırmalı değerlendirme

Antibiyotik direnç profili	İzolat no	Serogrup	İzolat sayısı	Toplam virülens geni	Dirençli antibiyotik sayısı	Antibiyotik direnci
A1	16	-	3	2	6	DAN, TIL, FFC, CEQ, CN, TE
	9	-		2		
	74	-		2		
A2	28	A	4	10	5	DAN, TIL, FFC, CEQ, TE
	24	A		10		
	12	D		6		
	22	D		4		
A3	51	A	3	11	5	DAN, TIL, CEQ, CN, TE
	18	A		11		
	15	A		10		
A4	17	E	1	2	5	DAN, TIL, FFC, CN, TE
A5	33	-	1	10	4	DAN, TIL, CN, TE
A6	8	E	1	3	4	DAN, TIL, CEQ, TE
A7	19	A	1	10	4	DAN, CEQ, CN, TE
A8	56	-	1	2	4	TIL, CEQ, CN, TE
A9	14	-	3	5	3	DAN, TIL, TE
	11	-		5		
	4	-		2		
A10	48	A	3	11	3	TIL, CEQ, TE
	2	A		9		
	10	-		1		

Tablo 5.16. (Devam)

Antibiyotik direnç profili	İzolat no	Serogrup	İzolat sayısı	Toplam virülens geni	Dirençli antibiyotik sayısı	Antibiyotik direnci
A11	44	B	1	4	3	TIL, CN, TE
A12	13 27	E -	2	5 4	3	CEQ, CN, TE
A13	34 37 38 35	- E E E	4	2 2 2 1	2	DAN, TE
A14	63 25 41 36 20 43 83 23 46 81 67	E D D B E - - D - - -	11	11 9 5 5 4 4 4 3 3 3 2	2	TIL, TE
A15	45	-	1	1	2	TIL, CEQ
A16	75	-	1	2	2	FFC, TE
A17	49 50 5 62 57 73 6 91 40 77 7 59 86	A A A - A A A - E E - - -	13	12 12 11 10 10 10 9 6 4 2 2 1 1	2	CEQ, TE
A18	32 31 29	A A B	3	10 9 5	2	CN, TE
A19	1	-	1	7	1	DAN
A20	70	-	1	2	1	FFC
A21	3	-	1	7	1	CEQ
A22	30	E	1	4	1	CN
A23	60 61 52 53 72 54 85 21 47 39 79 80 76 78	A - E A A E - E - - - - - -	14	11 11 10 10 9 5 5 4 4 4 4 4 3 3	1	TE

Tablo 5.16. (Devam)

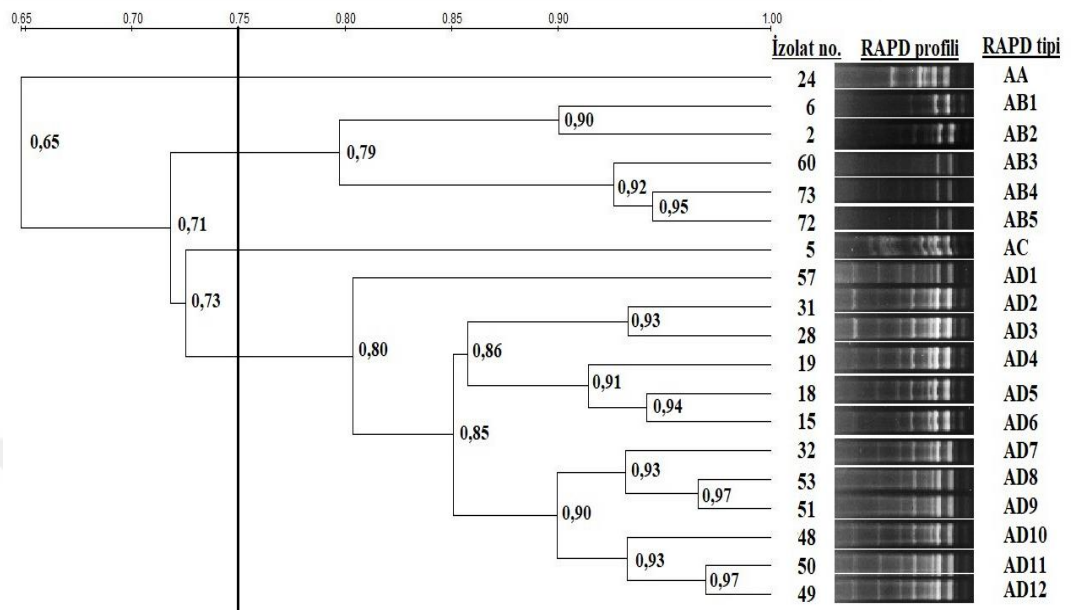
Antibiyotik direnç profili	İzolat no	Serogrup	İzolat sayısı	Toplam virülens geni	Dirençli antibiyotik sayısı	Antibiyotik direnci
A24	71	-	17	8	0	-
	88	-		6		
	69	F		5		
	87	-		5		
	55	E		5		
	82	-		4		
	89	-		4		
	92	-		4		
	84	-		4		
	90	-		4		
	64	E		3		
	58	B		3		
	66	-		3		
	26	-		3		
	42	E		2		
	65	-		2		
	68	E		1		

5.6. Genotiplendirme

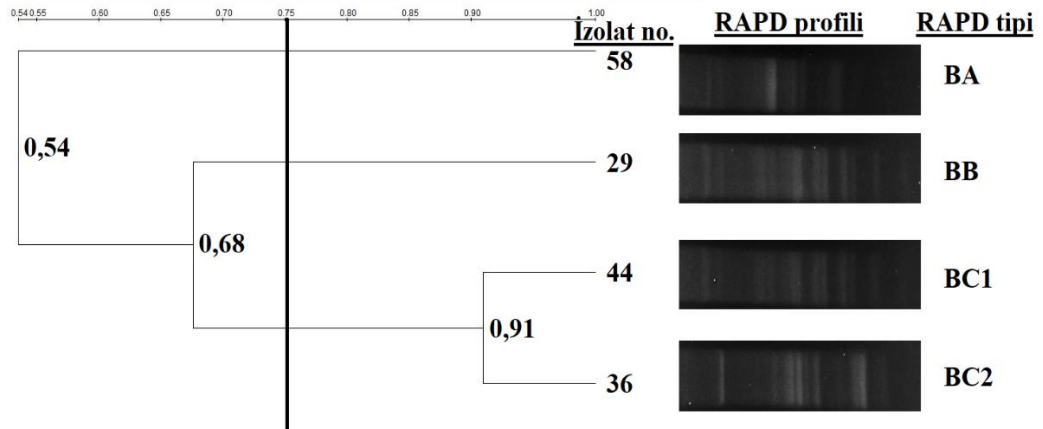
P. multocida izolatlarının filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan RAPD-PCR ile genotiplendirme sonucunda serogrup A, B, D ve E'ye dâhil olan izolatların sırasıyla % 65-97, % 54-91, % 41-91 ve % 41-92 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı (Şekil 5.16-5.19). Serogrup F olarak belirlenen izolat sayısı bir olduğu için, bu serogrubun genotiplendirmesi yapılamadı. Serogruplandırılmayan 44 adet izolatın da % 24-97 oranında benzerlik gösterdiği saptandı (Şekil 5.20).

Suşlar arasındaki genetik ilişki % 75 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda serogrup A'ya dâhil olan izolatların 2 tekli genotip (AA ve AC) ile beraber 2 çoklu genotipe (AB ve AD) sahip olduğu belirlendi. AB çoklu genotipinde yer alan 5 adet izolatın % 79 -95 ve AD çoklu genotipinde yer alan 12 adet izolatın % 80 -97 oranlarında benzerlik gösterdiği görüldü. Serogrup B'ye dâhil olan izolatların 2 tekli genotip (BA ve BB) ve 1 çoklu genotipe (BC) sahip olduğu belirlendi. BC çoklu genotipinde yer alan 2 adet izolatın % 91 oranlarında benzerlik gösterdiği saptandı. Serogrup D'ye dâhil olan izolatların 3 tekli genotip (DA, DB ve DC) ile beraber 1 çoklu genotipe (DD) sahip olduğu belirlendi. DD çoklu genotipinde yer alan 2 adet izolatın % 91 oranında benzerlik gösterdiği görüldü. Serogrup E'ye dâhil olan izolatların 11 tekli genotip (EA, EB, EC, ED, EG, EH, EI, EJ, EK, EL ve EM) ile beraber 3 çoklu genotipe (EE, EF ve EN) sahip olduğu belirlendi. EE çoklu genotipinde yer alan 3 adet izolatın % 89-92, EF çoklu genotipinde yer alan 2 adet

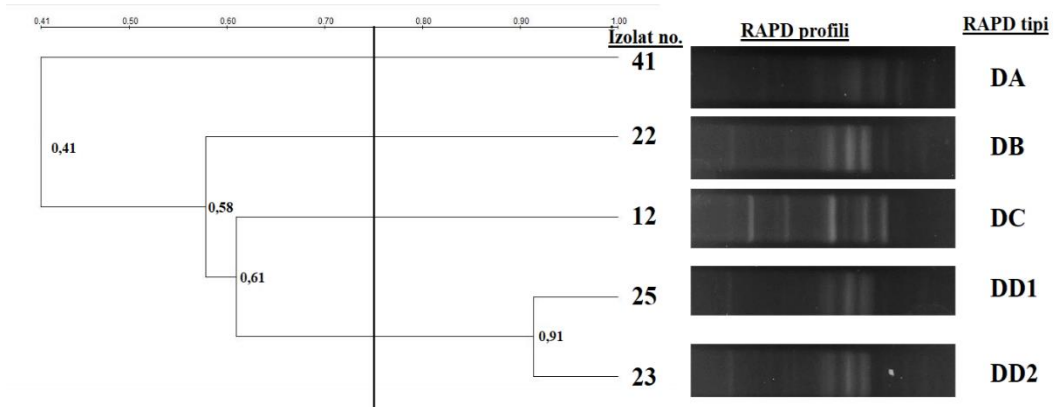
izolatın % 77 ve EN çoklu genotipinde yer alan 3 adet izolatın % 77-90 oranlarında benzerlik gösterdiği tespit edildi. Serogruplandırılmayan izolatların 23 tekli genotip ile beraber 6 çoklu genotipe sahip olduğu belirlendi.



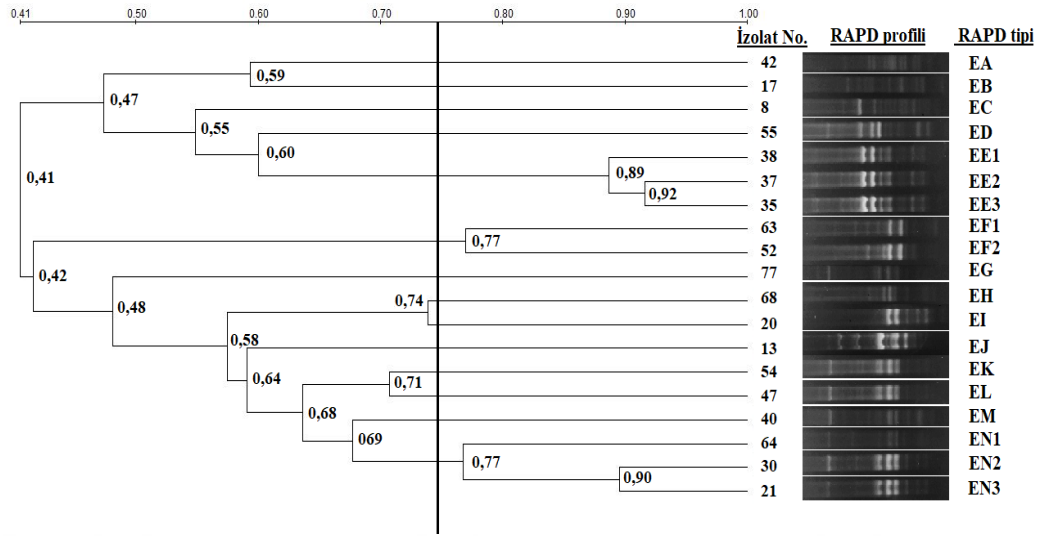
Şekil 5.16. Serogrup A içerisinde yer alan izolatların filogenetik benzerlik analizi



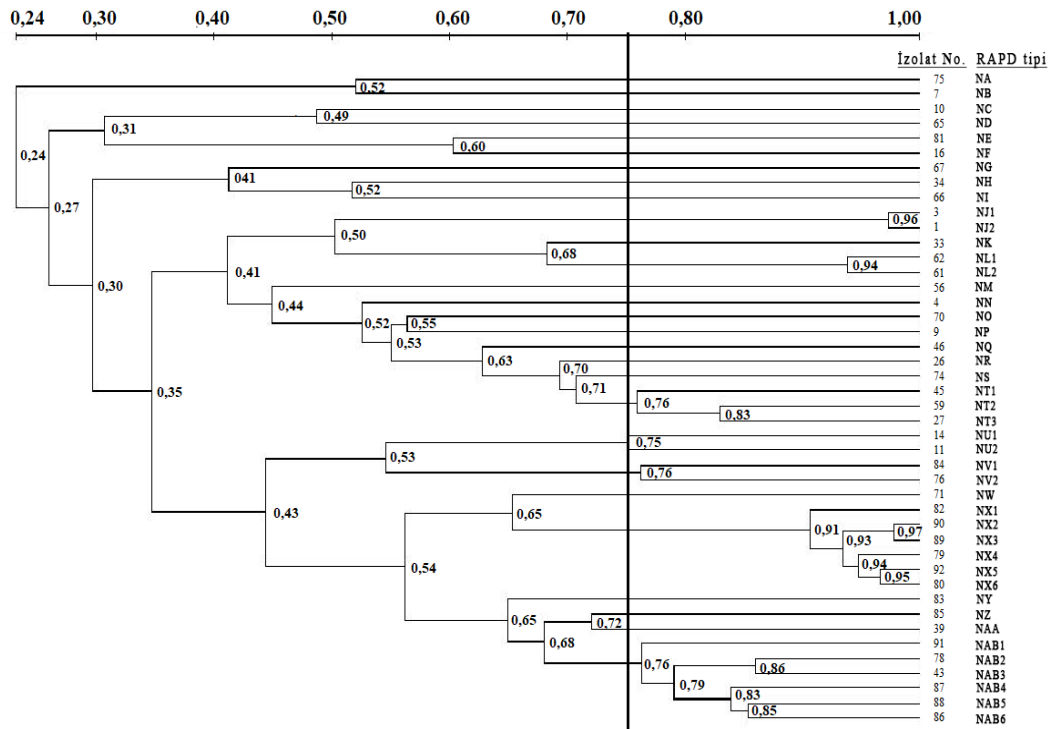
Şekil 5.17. Serogrup B içerisinde yer alan izolatların filogenetik benzerlik analizi



Şekil 5.18. Serogrup D içerisinde yer alan izolatların filogenetik benzerlik analizi



Şekil 5.19. Serogrup E içerisinde yer alan izolatların filogenetik benzerlik analizi



Şekil 5.20. Serogruplandırılmayan izolatların filogenetik benzerlik analizi

5.7. İstatistiksel Analiz

5.7.1. Virülensle İlişkili Genlerin *P. multocida* Serogrupları ile İlişkisi

Tez çalışmasında araştırılan ve virülensle ilişkili olan genler ile *P. multocida* izolatlarının ait oldukları serogruplar arasındaki ilişkinin belirlenmesi için Fisher'ın

Kesin Testi uygulandı. Serogruplar ile genler arası anlamlılık verileri Tablo 5.17’de sunuldu.

Tablo 5.17. Serogruplar ile genler arası anlamlılık tablosu

Serogrup	Gen	χ^2	p
Serogrup A	<i>fimA</i>	0,18	○ 1,000
Serogrup A	<i>fur</i>	3,285	○ 0,112
Serogrup A	<i>nanB</i>	2,004	○ 0,180
Serogrup A	<i>nanH</i>	0,133	○ 0,799
Serogrup A	<i>oma87</i>	2,280	○ 0,152
Serogrup A	<i>ompA</i>	1,540	○ 0,265
Serogrup A	<i>ompH</i>	0,773	○ 0,380
Serogrup A	<i>plpB</i>	4,091	● 0,050
Serogrup A	<i>pmHAS</i>	1,376	○ 0,287
Serogrup A	<i>sodA</i>	3,821	◐ 0,063
Serogrup A	<i>sodC</i>	0,773	○ 0,445
Serogrup A	<i>tonB</i>	5,880	● 0,020
Serogrup B	<i>fimA</i>	0,581	○ 0,630
Serogrup B	<i>fur</i>	0,351	○ 1,000
Serogrup B	<i>nanB</i>	0,498	○ 0,601
Serogrup B	<i>nanH</i>	0,002	○ 1,000
Serogrup B	<i>oma87</i>	1,799	○ 0,275
Serogrup B	<i>ompA</i>	0,756	○ 0,582
Serogrup B	<i>ompH</i>	1,314	○ 0,569
Serogrup B	<i>plpB</i>	1,737	○ 0,317
Serogrup B	<i>pmHAS</i>	0,363	○ 0,616
Serogrup B	<i>sodA</i>	1,162	○ 0,573
Serogrup B	<i>sodC</i>	0,002	○ 1,000
Serogrup B	<i>tonB</i>	1,139	○ 0,356
Serogrup D	<i>fimA</i>	0,026	○ 1,000
Serogrup D	<i>fur</i>	0,812	○ 0,645
Serogrup D	<i>nanB</i>	1,637	○ 0,331
Serogrup D	<i>nanH</i>	1,769	○ 0,362
Serogrup D	<i>oma87</i>	1,155	○ 0,333
Serogrup D	<i>ompA</i>	2,183	○ 0,163
Serogrup D	<i>ompH</i>	0,752	○ 0,590
Serogrup D	<i>plpB</i>	0,223	○ 1,000
Serogrup D	<i>pmHAS</i>	1,338	○ 0,346
Serogrup D	<i>sodA</i>	1,469	○ 0,582
Serogrup D	<i>sodC</i>	0,168	○ 1,000
Serogrup D	<i>tonB</i>	2,045	○ 0,198
Serogrup E	<i>fimA</i>	1,380	○ 0,303
Serogrup E	<i>fur</i>	0,682	○ 0,438
Serogrup E	<i>nanB</i>	0,584	○ 0,588
Serogrup E	<i>nanH</i>	3,647	◐ 0,073

Tablo 5.17. (Devam)

Serogrup	Gen	χ^2	p
Serogrup E	<i>oma87</i>	1,972	○ 0,338
Serogrup E	<i>ompA</i>	0,192	○ 0,784
Serogrup E	<i>ompH</i>	0,108	○ 1,000
Serogrup E	<i>plpB</i>	1,880	○ 0,257
Serogrup E	<i>pmHAS</i>	0,950	○ 0,425
Serogrup E	<i>sodA</i>	9,245	● 0,005
Serogrup E	<i>sodC</i>	0,023	○ 1,000
Serogrup E	<i>tonB</i>	0,023	○ 1,000
Serogrup F	<i>fimA</i>	0,778	○ 1,000
Serogrup F	<i>fur</i>	1,573	○ 0,391
Serogrup F	<i>nanB</i>	0,514	○ 1,000
Serogrup F	<i>nanH</i>	1,056	○ 0,489
Serogrup F	<i>oma87</i>	0,083	○ 1,000
Serogrup F	<i>ompA</i>	0,442	○ 1,000
Serogrup F	<i>ompH</i>	0,318	○ 1,000
Serogrup F	<i>plpB</i>	2,434	○ 0,293
Serogrup F	<i>pmHAS</i>	0,565	○ 1,000
Serogrup F	<i>sodA</i>	0,281	○ 1,000
Serogrup F	<i>sodC</i>	0,968	○ 1,000
Serogrup F	<i>tonB</i>	0,968	○ 1,000
Serogrupleştirilamayan	<i>fimA</i>	2,654	○ 0,141
Serogrupleştirilamayan	<i>fur</i>	1,416	○ 0,287
Serogrupleştirilamayan	<i>nanB</i>	1,557	○ 0,271
Serogrupleştirilamayan	<i>nanH</i>	2,162	○ 0,152
Serogrupleştirilamayan	<i>oma87</i>	1,126	○ 0,438
Serogrupleştirilamayan	<i>ompA</i>	2,366	○ 0,174
Serogrupleştirilamayan	<i>ompH</i>	0,065	○ 0,812
Serogrupleştirilamayan	<i>plpB</i>	0,915	○ 0,368
Serogrupleştirilamayan	<i>pmHAS</i>	0,602	○ 0,516
Serogrupleştirilamayan	<i>sodA</i>	0,048	○ 1,000
Serogrupleştirilamayan	<i>sodC</i>	0,047	○ 0,838
Serogrupleştirilamayan	<i>tonB</i>	7,415	● 0,007

p : ● < 0,05 < ○ < 0,1 < ○

Yapılan analiz sonucunda % 5 seviyesinde anlamlılık ($p < 0,05$) “●” simgesiyle, % 10 seviyesinde anlamlılık ($p < 0,1$) ise “○” simgesiyle belirtildi. Anlamlılığın % 10’dan daha büyük olduğu durumlar “○” simgesi ile gösterildi ($p > 0,1$) ve bu durumlar için H_0 hipotezleri reddedilemedi.

Serogrup A ile *plpB* [$\chi^2 (1, N = 92) = 4,091, p = 0,050$ ve *tonB* [$\chi^2 (1, N = 92) = 5,880, p = 0,020$] genleri ile arasında % 5 seviyesinde anlamlı, *sodA* [$\chi^2 (1, N = 92) = 3,821, p = 0,063$] ile % 10 seviyesinde anlamlı ilişki bulundu. Serogrup A ile *fimA*, *fur*,

nanB, *nanH*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *pmHAS* ve *sodC* genleri arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,1$).

Serogrup E ile *sodA* [$\chi^2 (1, N = 92) = 9,245, p=0,005$] geni ile arasında % 5 seviyesinde, *nanH* [$\chi^2 (1, N = 92) = 3,647, p=0,073$] geni ile arasında % 10 seviyesinde anlamlı ilişki bulundu. Serogrup E ile *fimA*, *fur*, *nanB*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *pmHAS*, *sodC* ve *tonB* genleri arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamadı ($p>0,1$).

Serogrup B, D ve F ile *fimA*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *pmHAS*, *sodA*, *sodC* ve *tonB* genleri arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamadı ($p>0,1$).

Serogruplandırılmayan izolatlar ile *tonB* [$\chi^2 (1, N = 92) = 7,415, p=0,007$] geni arasında % 5 seviyesinde anlamlı bir ilişki bulundu. Ancak; *fimA*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *pmHAS*, *sodA* ve *sodC* genleri arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamadı ($p>0,1$).

İstatistiksel olarak anlamlı bulunan serogrup – gen çiftleri, hangi genlerin hangi serogruplarda ağırlıklı olarak bulunduğu ortaya koyulması amacıyla incelendi. Yapılan değerlendirme sonucunda serogrup A'nın genellikle *plpB*, *sodA* ve *tonB* yönünden ağırlıklı olarak pozitif izolatlar içerdiği şeklinde değerlendirilebileceği düşünüldü ve dağılımın buna uygun olduğu görüldü (Şekil 5.21).

Serogrup E'nin *sodA* geni bakımından genel olarak pozitif izolatları, *nanH* geni bakımından ise ağırlıklı olarak negatif izolatları barındırdığı ve bu durumların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.

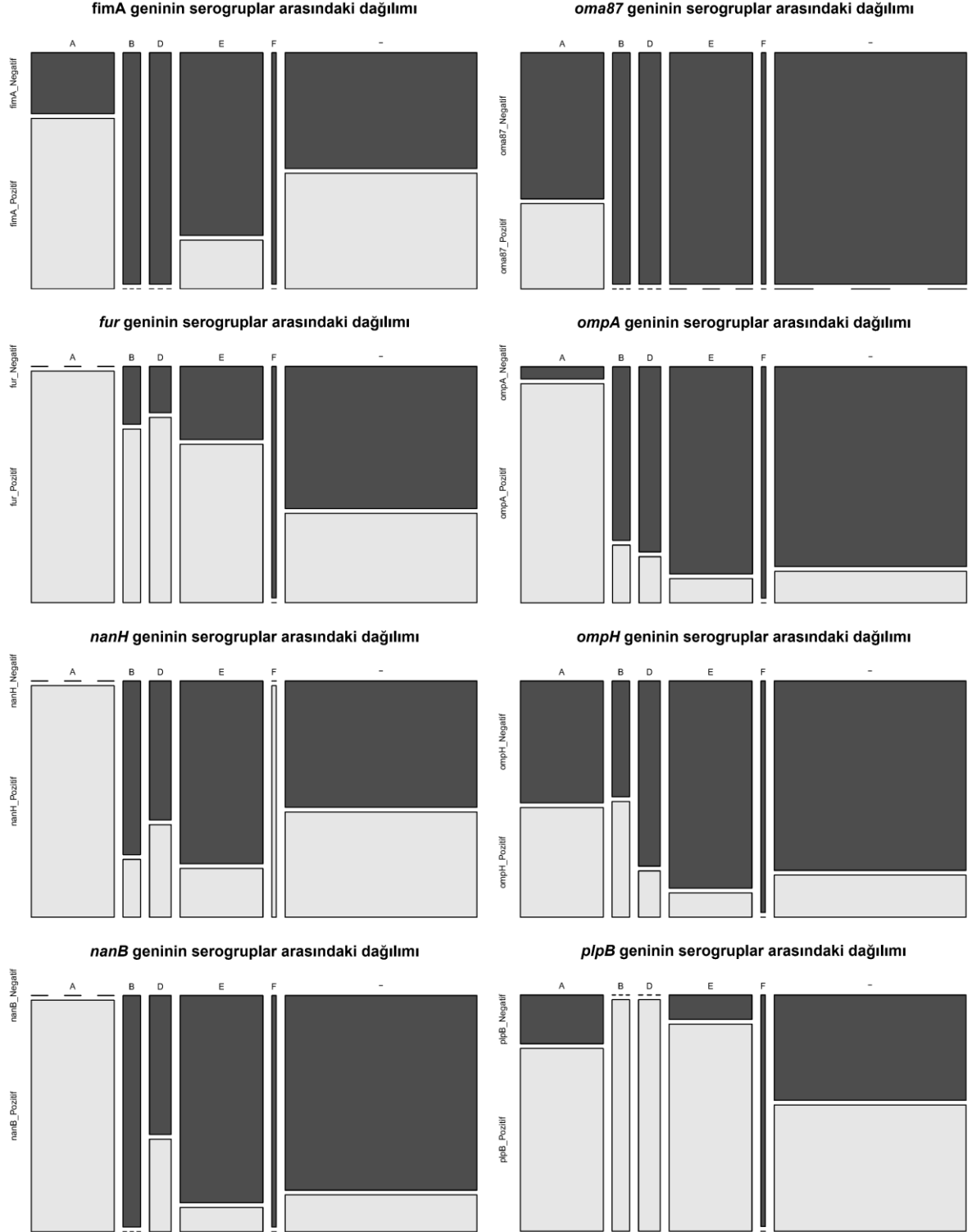
Serogruplandırılmayan izolatlar incelendiğinde ise *tonB* geninin ağırlıklı olarak negatif olduğu görüldü ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Serogrup A ile *fimA*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *pmHAS* ve *sodC* genleri ilişkisinin incelenmesi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

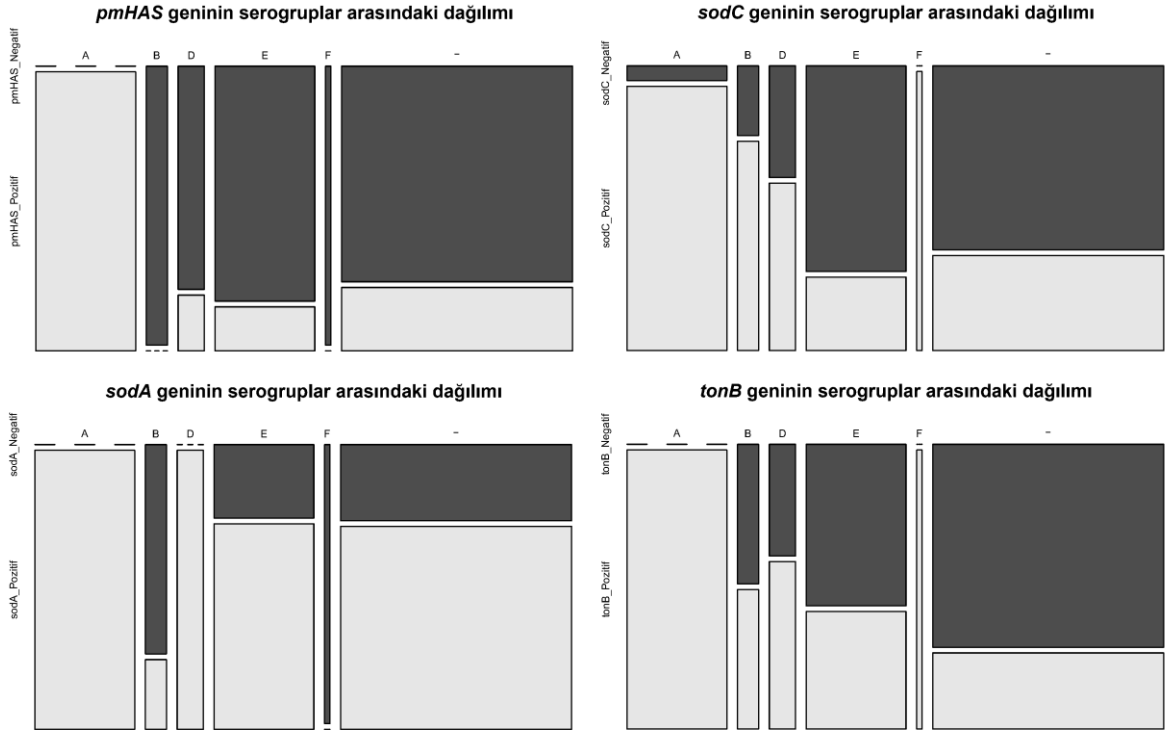
Serogrup B, D, F'nin *fimA*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *pmHAS*, *sodA*, *sodC* ve *tonB* genleri ilişkisinin incelenmesi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

Serogrup E'nin *fimA*, *fur*, *nanB*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *pmHAS*, *sodC* ve *tonB* genleri ilişkisinin incelenmesi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

Serogruplandırılmayan izolatlar ile *fimA*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *pmHAS*, *sodA* ve *sodC* genleri ilişkisinin incelenmesi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi.



Şekil 5.21. Virülens ile ilişkili genlerin serogruplar arasındaki dağılımı



Şekil 5.21. (Devam)

5.7.2. Biyofilm Özelliğinin *P. multocida* Serogrupları ile İlişkisi

Bu çalışmada izole edilen *P. multocida* izolatlarına ait serogruplar içerisinde biyofilm özelliği bakımından bir fark bulunup bulunmadığının belirlenmesi için Fisher'ın Kesin Testi uygulandı (Tablo 5.18). Serogrup D ve Serogrup E ile biyofilm arasında sırasıyla $\chi^2 (1, N = 92) = 4,067, p=,066$ ve $\chi^2 (1, N = 92) = 3,774, p=,070$ değerleri bulundu. Hesaplanan p değerinin, % 10 seviyesinde eşik değer alındığı zaman, anlamlı olduğu görüldü. Ancak genel olarak kabul edilen % 5 seviyesinde p değeri anlamsız olduğundan ötürü H_0 hipotezi reddedilemedi.

Tablo 5.18. Biyofilm ve serogrup ilişkisi

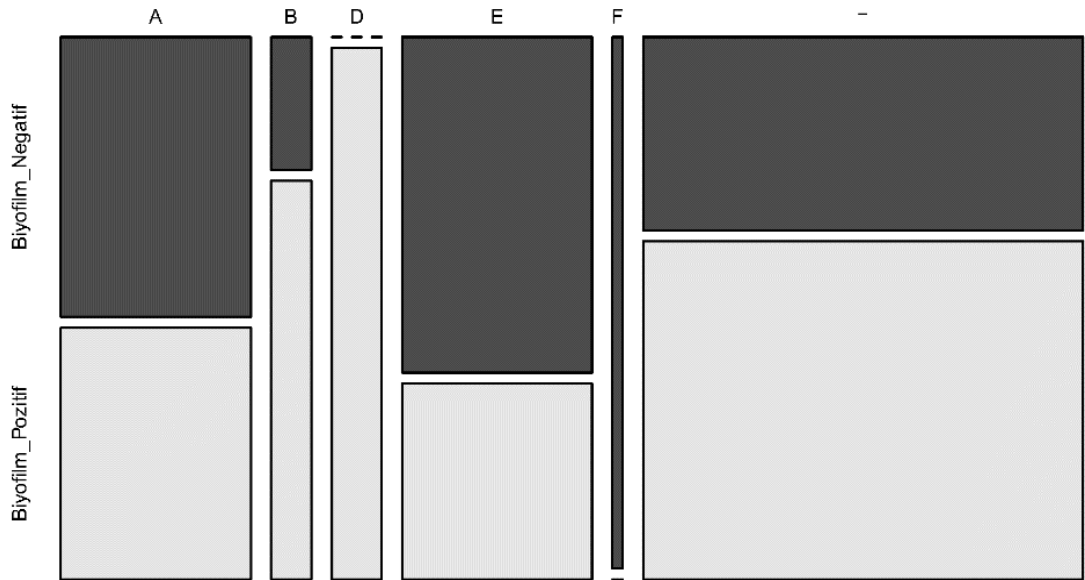
		χ^2	p
Serogrup A	Biyofilm	0,816	○ 0,440
Serogrup B	Biyofilm	0,581	○ 0,630
Serogrup D	Biyofilm	4,067	● 0,066
Serogrup E	Biyofilm	3,774	● 0,070
Serogrup F	Biyofilm	1,314	○ 0,435
Serogruplandırılmayan	Biyofilm	1,737	○ 0,212

p : ● < 0,05 < ● < 0,1 < ○

İstatistiksel anlamlılığa Serogrup D harici en yakın diğer grup olan serogrup E değerlendirildiğinde, biyofilm negatif özelliğin daha baskın olduğu görüldü. Yapılan analiz sonucunda bu iki durumda da H_0 hipotezi % 5 düzeyinde reddedilme durumunda

da, serogrup D biyofilm pozitif izolatlar yönünden baskın, serogrup E ise biyofilm negatif izolatlar yönünden baskın olarak değerlendirildi ($0,05 < p < 0,1$).

Tez kapsamında incelenen izolatların biyofilm ve serogrup özellikleri açısından dağılımı şematize olarak Şekil 5.22’de sunuldu. Dikey ekseninde açık gri olarak biyofilm pozitif izolatlar, koyu gri ile biyofilm negatif izolatlar gösterildi. Yatay ekseninde ise izolatların sayısal büyüklüğü ile orantılı olacak şekilde serogrup A, B, D, F ve tiplendirilemeyenler ifade edildi. Serogruplar arasında biyofilm oluşturma kabiliyeti bakımından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığının araştırılması için gruplar arasında Fisher’in Kesin Testi kullanıldı. Olası bir hataya karşı p değeri Benjamini-Hochberg FDR yöntemi kullanılarak % 5’lik bir kesme değeri üzerinden düzeltildi (Benjamini and Hochberg, 1995).



Şekil 5.22. İzolatların biyofilm ve serogrup karakterlerinin dağılımının şematize gösterimi

Serogruplar arası farklılığın biyofilm açısından değerlendirilmesi ile ilgili veriler Tablo 5.19’da sunuldu. Buna göre, sırasıyla p değerleri açısından 0,05’e oldukça yakın veya küçük olan değerler incelendiğinde Serogrup A ile D arasında, D ile E arasında, E ile serogruplandırılmayan izolatlar arasında biyofilm oluşumu açısından belirlenen fark istatistiksel olarak önemli olarak değerlendirildi. Ancak p değerinin düzeltilmesinin ardından serogruplar arası karşılaştırmaların istatistiksel açıdan önemsiz olduğu sonucuna varıldı ($p > 0,05$).

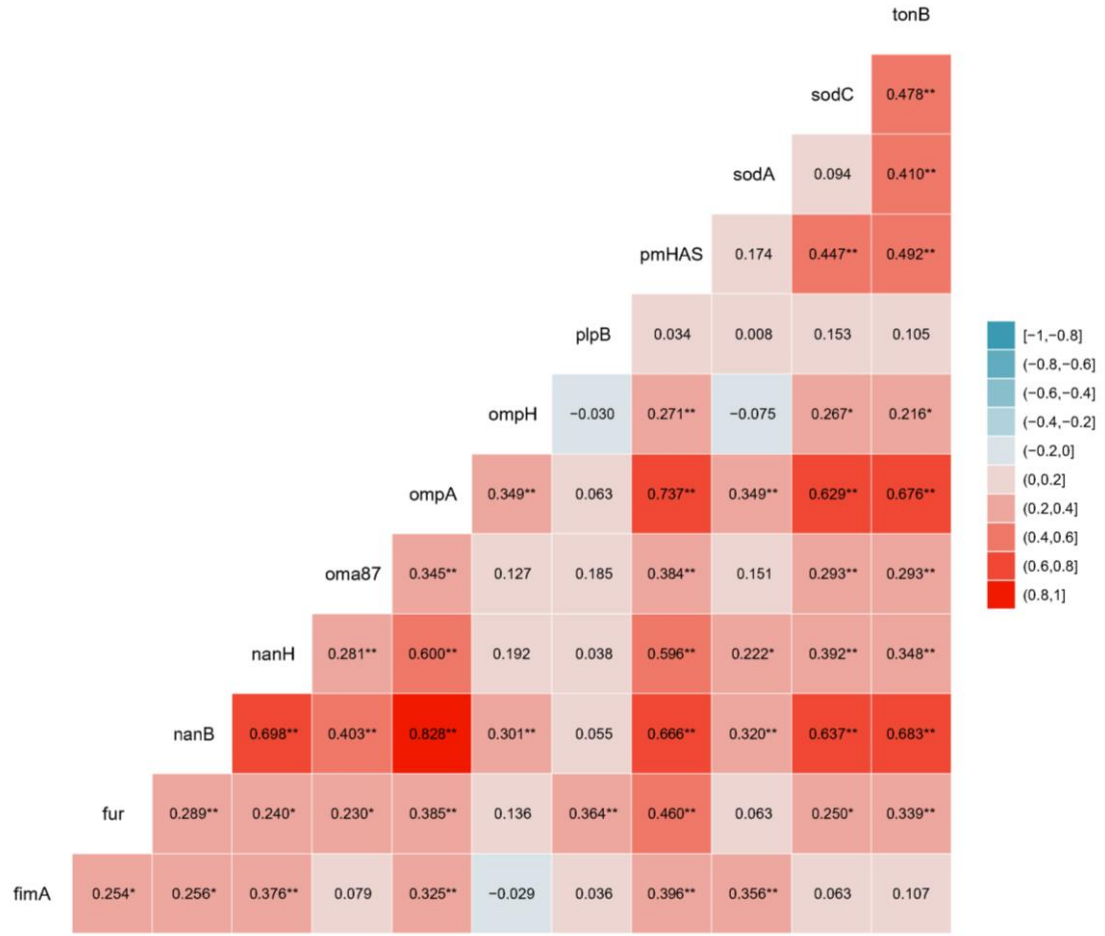
Tablo 5.19. Serogruplar arası farklılığın biyofilm açısından değerlendirilmesi

Grup 1	Grup 2	n	p	p.adj	Anlamlılık
Serogrup-A	Serogrup-B	23	○ 0,59	○ 0,81	ns
Serogrup-A	Serogrup-D	24	● 0,05	○ 0,30	ns
Serogrup-A	Serogrup-E	38	○ 0,74	○ 0,93	ns
Serogrup-A	Serogrup-F	20	○ 1,00	○ 1,00	ns
Serogrup-A	Serogruplandırılmayan	63	○ 0,27	○ 0,60	ns
Serogrup-B	Serogrup-D	9	○ 0,44	○ 0,67	ns
Serogrup-B	Serogrup-E	23	○ 0,28	○ 0,60	ns
Serogrup-B	Serogrup-F	5	○ 0,40	○ 0,67	ns
Serogrup-B	Serogruplandırılmayan	48	○ 1,00	○ 1,00	ns
Serogrup-D	Serogrup-E	24	● 0,04	○ 0,30	ns
Serogrup-D	Serogrup-F	6	○ 0,17	○ 0,50	ns
Serogrup-D	Serogruplandırılmayan	49	○ 0,16	○ 0,50	ns
Serogrup-E	Serogrup-F	20	○ 1,00	○ 1,00	ns
Serogrup-E	Serogruplandırılmayan	63	● 0,06	○ 0,30	ns
Serogrup-F	Serogruplandırılmayan	45	○ 0,38	○ 0,67	ns

p: ● < 0,05 < ● < 0,1 < ○; ns: Anlamsız; p.adj.: Düzeltilmiş p değeri

5.7.3. Virülens İlişkili Genler Arası Etkileşimler

Virülens genleri arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla *fimA*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *pmHAS*, *sodA*, *sodC* ve *tonB* genlerine ait veriler Spearman rho korelasyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Herhangi bir veri bulunmadığı için *toxA* geni analiz dışı bırakıldı. Elde edilen istatistiksel sonuçlar Şekil 5.23'de gösterildi.



Şekil 5.23. Virülens ilişkili genlerin korelasyonu. *Korelasyon $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır; **Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır

Yapılan analiz sonucunda *ompA* ile *nanB* ($r=0,828$) arasında çok yüksek düzeyde pozitif yönde (% 1 seviyesinde) anlamlı bir ilişki bulundu. *tonB* ile *ompA* ($r=0,676$), *tonB* ile *nanB* ($r=0,683$), *sodC* ile *ompA* ($r=0,629$), *sodC* ile *nanB* ($r=0,637$), *pmHAS* ile *ompA* ($r=0,737$), *pmHAS* ile *nanB* ($r=0,666$), *ompA* ile *nanH* ($r=0,600$) ve *nanH* ile *nanB* ($r=0,698$) arasında yüksek düzeyde pozitif yönde (% 1 seviyesinde) anlamlı bir ilişki bulundu. Ayrıca; *tonB* ile *sodC* ($r=0,478$), *tonB* ile *sodA* ($r=0,410$), *tonB* ile *pmHAS* ($r=0,492$), *sodC* ile *pmHAS* ($r=0,447$), *pmHAS* ile *nanH* ($r=0,596$), *pmHAS* ile *fur* ($r=0,460$), *ompA* ile *nanH* ($r=0,600$) ve *oma87* ile *nanB* ($r=0,403$) arasında orta düzeyde pozitif yönde (% 1 seviyesinde) ilişki belirlendi.

Çok yüksek düzeyde, yüksek düzeyde ve orta düzeyde ilişkiye sahip genlerin haricinde; *tonB* ile *oma87* ($r=0,293$), *tonB* ile *nanH* ($r=0,348$), *tonB* ile *fur* ($r=0,339$), *sodC* ile *oma87* ($r=0,293$), *sodC* ile *nanH* ($r=0,392$), *sodA* ile *ompA* ($r=0,349$), *sodA* ile *nanB* ($r=0,320$), *sodA* ile *fimA* ($r=0,356$), *pmHAS* ile *ompH* ($r=0,271$), *pmHAS* ile *oma87* ($r=0,384$), *pmHAS* ile *fimA* ($r=0,396$), *plpB* ile *fur* ($r=0,364$), *ompH* ile *ompA* ($r=0,349$), *ompH* ile *nanB* ($r=0,301$), *ompA* ile *oma87* ($r=0,345$), *ompA* ile *fur*

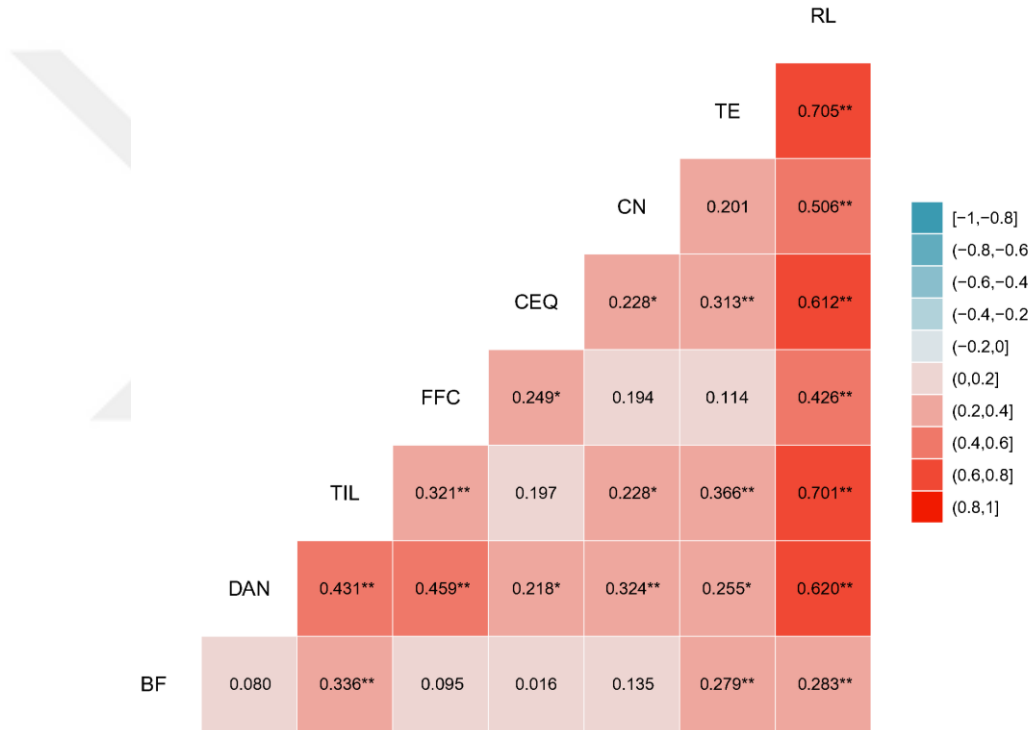
($r=0,385$), *ompA* ile *fimA* ($r=0,325$), *oma87* ile *nanH* ($r=0,281$), *nanH* ile *fimA* ($r=0,376$) ve *nanB* ile *fur* ($r=0,289$) arasında zayıf düzeyde pozitif yönde (% 1 seviyesinde); *tonB* ile *ompH* ($r=0,216$), *sodC* ile *ompH* ($r=0,267$), *sodC* ile *fur* ($r=0,250$), *sodA* ile *nanH* ($r=0,222$), *oma87* ile *fur* ($r=0,230$), *nanH* ile *fur* ($r=0,240$), *nanB* ile *fimA* ($r=0,256$) ve *fur* ile *fimA* ($r=0,254$) arasında zayıf düzeyde pozitif yönde (% 5 seviyesinde) ilişki belirlendi.

Bu ilişkilerin haricinde *tonB* ile *plpB* ($r=0,105$), *tonB* ile *fimA* ($r=0,107$), *sodC* ile *sodA* ($r=0,094$), *sodC* ile *plpB* ($r=0,153$), *sodC* ile *fimA* ($r=0,063$), *sodA* ile *pmHAS* ($r=0,174$), *sodA* ile *plpB* ($r=0,008$), *sodA* ile *oma87* ($r=0,151$), *sodA* ile *fur* ($r=0,063$), *pmHAS* ile *plpB* ($r=0,034$), *plpB* ile *ompA* ($r=0,063$), *plpB* ile *oma87* ($r=0,185$), *plpB* ile *nanH* ($r=0,038$), *plpB* ile *nanB* ($r=0,055$), *plpB* ile *fimA* ($r=0,036$), *ompH* ile *oma87* ($r=0,127$), *ompH* ile *nanH* ($r=0,192$), *ompH* ile *fur* ($r=0,136$) ve *oma87* ile *fimA* ($r=0,079$) arasında çok zayıf düzeyde ya da bir ilişki yok denilebilecek düzeyde pozitif yönde istatistiksel olarak % 5 düzeyinden daha büyük yani anlamsız kabul edilebilecek bir ilişki saptandı. *sodA* ile *ompH* ($r=-0,075$), *plpB* ile *ompH* ($r=-0,030$) ve *ompH* ile *fimA* ($r=-0,029$) arasında ise çok zayıf düzeyde ya da bir ilişki yok denilebilecek düzeyde negatif yönde istatistiksel olarak % 5 düzeyinden daha büyük yani anlamsız kabul edilebilecek bir ilişki bulundu.

5.7.4. Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Oluşumu Arası Etkileşimler

Antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla tetrasiklin, gentamisin, danofloksasin, florfenikol, tilmikosin ve sefkuinom dirençlilikleri ile izolatların biyofilm oluşturma durumlarına ait veriler Spearman rho korelasyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Bunlara ek olarak, her bir örnek için elde edilen antibiyotik dirençliliği verilerinin toplamaları kesikli nicel veri türüne dönüştürüldü ve ayrı bir grup olarak analize eklendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.24’de gösterildi. RL ile TE ($r=0,705$) arasında, RL ile CEQ ($r=0,612$) arasında, RL ile TIL ($r=0,701$) arasında ve RL ile DAN ($r=0,620$) arasında yüksek düzeyde pozitif yönde % 1 düzeyinde anlamlı bir ilişki belirlendi. RL ile CN ($r=0,506$) arasında, RL ile FFC ($r=0,426$) arasında, FFC ile DAN ($r=0,459$) arasında ve TIL ile DAN ($r=0,431$) arasında orta düzeyde pozitif yönde % 1 düzeyinde anlamlı bir ilişki; RL ile BF ($r=0,283$) arasında, TE ile CEQ ($r=0,313$) arasında, TE ile TIL ($r=0,366$) arasında, TE ile BF ($r=0,279$) arasında, CN ile CEQ ($r=0,228$) arasında, CN ile TIL ($r=0,228$) arasında, CN ile DAN ($r=0,324$) arasında, FFC ile TIL ($r=0,321$) arasında ve TIL ile

BF ($r=0,336$) arasında zayıf düzeyde pozitif yönde % 1 seviyesinde anlamlı bir ilişki görüldü. TE ile DAN ($r=0,255$) arasında, CEQ ile FFC ($r=0,249$) arasında ve CEQ ile DAN ($r=0,218$) arasında zayıf düzeyde pozitif yönde % 5 seviyesinde anlamlı bir ilişki; TE ile CN ($r=0,201$) arasında ise zayıf düzeyde pozitif yönde % 5 seviyesinden daha büyük seviyede yani anlamsız olarak kabul edilebilecek bir ilişki; TE ile FFC ($r=0,114$) arasında, CN ile FFC ($r=0,194$) arasında, CN ile BF ($r=0,135$) arasında, CEQ ile TIL ($r=0,197$) arasında, CEQ ile BF ($r=0,016$) arasında, FFC ile BF ($r=0,095$) arasında ve DAN ile BF ($r=0,080$) arasında çok zayıf düzeyde ya da bir ilişki yoktur denilebilecek bir düzeyde % 5 seviyesinden daha yüksek seviyede yani anlamsız olarak kabul edilebilecek bir ilişki saptandı.

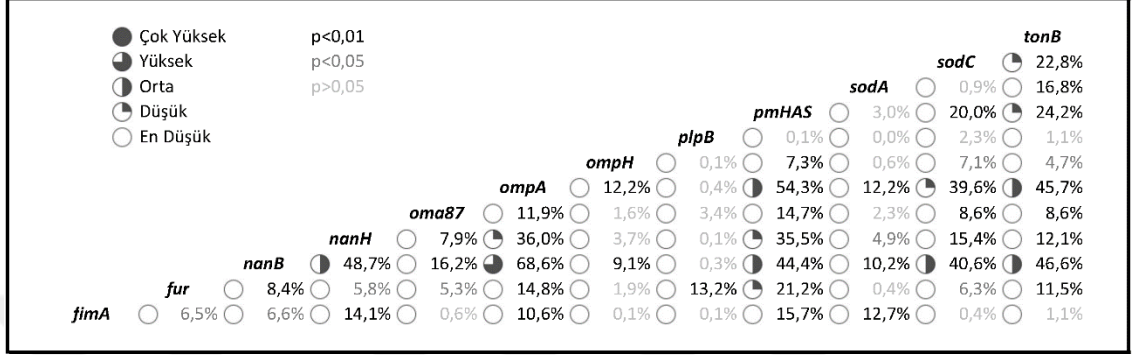


Şekil 5.24. Antibiyotik direnci ve biyofilm korelasyonu. BF: Biyofilm; RL: Direnç Seviyesi; TIL: Tilmikosin; TE: Tetrasiklin; FFC: Florfenikol; DAN: Danofloksasin; CN: Gentamisin; CEQ: Sefkuinom; * Korelasyon $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. ** Korelasyon $p<0,01$ düzeyinde anlamlıdır

5.7.5. Etkileşimleri Araştırılan Unsurların Yorumlanması

Değişkenlerin birbirleri üzerindeki değişimin ortaya koyulması açısından varyans analizi yapıldı. Değişkenler incelenirken yorum kolaylığının sağlanması amacıyla oransal olarak beş eşit gruba temsil edecek şekilde sınıflandırma işlemi uygulandı (Şekil 5.25). Bu bağlamda incelendiğinde, açıklanan varyansı % 68,6 oranında olan *nanB* ile *ompA* ve açıklanan varyansı % 54,3 oranında olan *ompA* ile *pmHAS*'ın diğer değişkenlere göre yüzdesel olarak en yüksek değere sahip olduğu

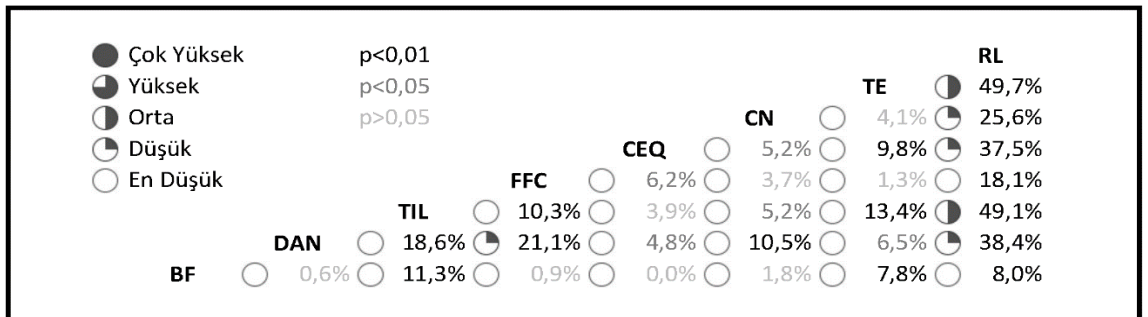
görüldü. *nanB*'deki değişimin % 68,6'sı *ompA*'daki değişimden veya *pmHAS*'daki değişimin % 54,3'ü *ompA*'daki değişimden ötürü kaynaklanabileceği düşünüldü. Ayrıca, *ompA*'daki değişimin % 68,6'sının *nanB*'deki değişimden veya *ompA*'daki değişimin % 54,3'ünün *pmHAS*'daki değişimden kaynaklanıyor olabilir. Bu tabloda gösterilen her bir parametre için her iki şekilde de yorum yapılması mümkündür.



Şekil 5.25. Virülens ilişkili genlerin açıklanan varyansı

Antibiyotik direnç profillerindeki total artış seviyesi ile aralarındaki açıklanan varyans % 49,7 oranında olan TE, % 49,1 oranında olan TIL, % 38,4 oranında olan DAN, % 37,5 oranında olan CEQ, % 25,6 oranında olan CN ve % 18,1 oranında olan FFC verileri incelendiğinde, antibiyotik dirençliliğindeki değişimin en yüksekte en düşüğe doğru sırasıyla TE, TIL, DAN, CEQ, CN ve FFC ile açıklanabilme ihtimali görülmektedir (Şekil 5.26).

İzolatların biyofilm oluşumu ihtimalindeki değişimin % 0'ı CEQ'den, % 0,6'sı DAN'dan, % 0,9'u FFC'den ve % 1,8'i CN'den kaynaklanıyor olabilir, ancak $p > 0,05$ olduğu için bu değişim istatistiksel olarak anlamsız şeklinde yorumlanabilir. İzolatların biyofilm oluşturma ihtimali istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde açıklayabilecek diğer değişkenlerin açıklama oranları % 11,3 ile TIL, % 8 ile RL ve % 7,8 ile TE olarak bulundu. Yani, biyofilm oluşumundaki pozitif değişimin % 11,8'i TIL'deki değişimden, % 8'i RL'deki değişimden, % 7,8'i TE'deki değişimden kaynaklanıyor olabileceği belirlendi.



Şekil 5.26. Antibiyotik direnci profilleri ve biyofilm korelasyonunun açıklanan varyansı

5.7.6. Biyofilm Oluşturma İhtimalini Belirleyen Etkenlerin İncelenmesi

P. multocida izolatlarına ait virülens genleri ve antibiyotik dirençliliği gibi faktörler ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla ikili lojistik regresyon analizi yapıldı. Ön analiz sonucunda değişkenlerin birbirleriyle bağlantısını görmek amacıyla çoklu doğrusallık analizi yapıldı. Analiz sonucunda tolerans ve varyans enflasyon faktörü (VIF) değerleri sırasıyla olmak üzere serogrup A için 0,58 ve 1,73, serogrup B için 0,77 ve 1,30, serogrup D için 0,64 ve 1,55, serogrup E için 0,62 ve 1,62, serogrup F için 0,86 ve 1,16, sefkuinom için 0,48 ve 2,10, gentamisin için 0,47 ve 2,14, danofloksasin için 0,39 ve 2,54, florfenikol için 0,66 ve 1,51, tetrasiklin için 0,67 ve 1,49, tilmikosin için 0,39 ve 2,57, MDR için 0,18 ve 5,47, *fimA* için 0,49 ve 2,04, *fur* için 0,57 ve 1,75, *nanB* için 0,17 ve 5,75, *nanH* için 0,37 ve 2,68, *oma87* için 0,68 ve 1,48, *ompA* için 0,18 ve 5,58, *ompH* için 0,73 ve 1,37, *plpB* için 0,67 ve 1,50, *pmHAS* için 0,32 ve 3,13, *sodA* için 0,47 ve 2,14, *sodC* için 0,43 ve 2,32 ve *tonB* için 0,30 ve 3,32 şeklinde hesaplandı. Serogruplandırılmayan izolatlar için tolerans ve VIF hesaplanamadı ve analiz dışı bırakıldı. Diğer parametreler için çoklu doğrusallık bulunmaması koşulunun sağlandığı görüldü (Midi vd., 2010; Stoltzfus, 2011).

Studentleştirilmiş artık değerlerin incelenmesi sonucunda, veri setinde bulunan vakalardan altı tanesinin aykırı değer olduğu tespit edildi. Aykırı değere sahip vakaların studentleştirilmiş artık değerleri 2,017, -2,494, -2,530, 2,514, -2,334, -2,202 ve -2,203 olarak hesaplandı. Ancak bu değerler veri seti içerisinde tutuldu. Kurulan modelin istatistiksel olarak anlamlı olması biyofilm oluşturan izolatlar ile oluşturmayanlar arasında ayırım yapılabileceğini düşündürdü (χ^2 (24, $N = 92$) = 42,45, $p = 0,011$).

Değişkenler dâhil edilmeden önce model vakaların % 56,5'i doğru olarak sınıflandırmaktaydı. Kurulan model, bağımlı değişkendeki varyansın % 37,0 (Cox & Snell R kare) ile % 49,6'sını (Nagelkerke R kare) açıkladı ve vakaların % 78,3'ünü doğru olarak sınıflandırdı. Serogrup E, tetrasiklin ve *sodA* modele önemli ölçüde katkıda bulunurken serogrup A, B, D, F, sefkuinom, gentamisin, danofloksasin, florfenikol, tilmikosin, MDR, *fimA*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *pmHAS*, *sodC* ve *tonB* değişkenlerinin modele herhangi bir katkı sağlamadığı görüldü (Tablo 5.20).

P. multocida izolatlarının biyofilm oluşturma durumu ile ilgili faktörler incelendiğinde elde edilen veriler ile istatistiksel olarak örtüşen üç değişkenin olduğu saptandı. Bu üç değişkene ait sonuçların istatistiksel olarak yorumlanması şu şekilde örneklendirilebilir: i) *P. multocida* izolatlarının serogrup E olması ihtimalindeki her bir birimlik artış, biyofilm oluşturma ihtimali olasılığını 0,11 kat azaltıyor olabilir; ii) tetrasiklin direncine sahip olma olasılığındaki her bir birimlik artış, biyofilm oluşturma ihtimali olasılığını 5,22 kat arttırıyor olabilir; iii) izolatın *sodA* genine sahip olmaması olasılığındaki her bir birimlik artış, biyofilm oluşturma ihtimali olasılığını 0,043 kat arttırıyor olabilir.

Biyofilm ile çoklu antibiyotik direnci arasında anlamlı bir ilişki durumunun belirlenmesi için ki-kare bağımsızlık testi yapıldı. Pearson'un ki-kare testine göre çift taraflı *p* değeri 0,034 hesaplandı ve anlamlı görünmekteydi [χ^2 (1, *N* = 92) = 4,51, *p*=0,034]. Ancak, 2x2 test gözlerinde gözlenen değerlerden birisinin 10,43 olmasından ötürü Yates Süreklilik Düzeltmesi ve Fisher'in Kesin testi uygulandı (Güngör, 2008). Her iki test ile de aynı *p* değeri hesaplandı [χ^2 (1, *N* = 92) = 4,51, *p*=0,054]. Yeni *p* değeri %5 seviyesinde anlamsız olduğundan ötürü *H₀* hipotezi reddedilemedi.

Tablo 5.20. Biyofilm oluşturma tahmini ihtimalinin lojistik regresyonu

	<i>B</i>	<i>SE</i>	Wald	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>OR</i>	95% CI <i>OR</i>	
							LL	UL
Serogrup A	0,626	0,827	0,573	1	0,449	1,87	0,370	9,463
Serogrup B	20,984	19059,433	0,000	1	0,999	1298374731,16	0,000	
Serogrup D	-0,027	1,473	0,000	1	0,985	0,97	0,054	17,458
Serogrup E	-2,175	1,025	4,508	1	0,034	0,11	0,015	0,846
Serogrup F	21,223	40192,970	0,000	1	1,000	1648542120,24	0,000	
Sefquinom	-0,027	0,798	0,001	1	0,973	0,97	0,204	4,648
Gentamisin	1,920	1,187	2,619	1	0,106	6,82	0,667	69,818
Danofloksasin	-1,198	1,120	1,144	1	0,285	0,30	0,034	2,711
Florfenikol	0,448	1,038	0,186	1	0,666	1,57	0,205	11,976
Tetrasiklin	1,653	0,805	4,210	1	0,040	5,22	1,077	25,305
Tilmikosin	1,836	1,074	2,926	1	0,087	6,27	0,765	51,460
MDR	-0,781	1,640	0,227	1	0,634	0,46	0,018	11,383
<i>fimA</i>	0,396	0,729	0,295	1	0,587	1,49	0,356	6,196
<i>fur</i>	-0,778	0,766	1,032	1	0,310	0,46	0,102	2,062
<i>nanB</i>	-1,036	1,335	0,602	1	0,438	0,35	0,026	4,855
<i>nanH</i>	0,995	0,952	1,092	1	0,296	2,71	0,418	17,501
<i>oma87</i>	0,214	1,181	0,033	1	0,856	1,24	0,122	12,546
<i>ompA</i>	-0,173	1,405	0,015	1	0,902	0,84	0,054	13,194
<i>ompH</i>	-1,287	0,799	2,596	1	0,107	0,28	0,058	1,321
<i>plpB</i>	0,293	0,715	0,168	1	0,682	1,34	0,330	5,441
<i>pmHAS</i>	-1,641	1,059	2,399	1	0,121	0,19	0,024	1,546
<i>sodA</i>	-2,146	1,059	4,110	1	0,043	0,12	0,015	0,931
<i>sodC</i>	0,552	0,856	0,416	1	0,519	1,74	0,324	9,297
<i>tonB</i>	1,094	1,026	1,137	1	0,286	2,99	0,400	22,293
Sabit	0,500	1,088	0,211	1	0,646	1,65		

B: Regresyon katsayısı, *SE*: Standart Hata; *df*: Serbestlik derecesi; *p*: Anlamlılık; *OR*: Odds Oranı; *CI*: Güven aralığı; *LL*: Alt seviye; *UL*: Üst Seviye

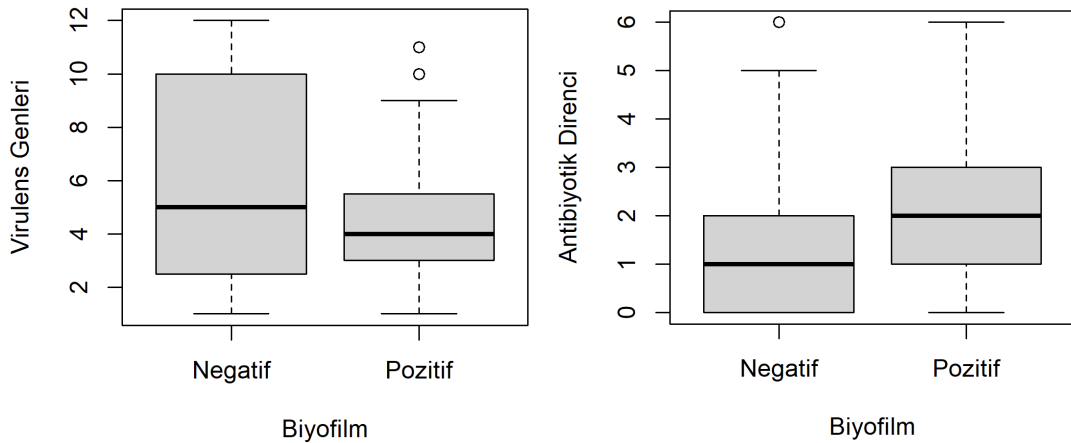
5.7.7. Virülens Genleri ve Antibiyotik Direncinin Sayısal Etkileşiminin Biyofilm Yönünden İncelenmesi

P. multocida izolatlarının biyofilm oluşturma durumunun, virülens genleri ve antibiyotik dirençliliği bakımından dağılımının incelendiği bir frekans grafiği oluşturuldu (Şekil 5.27).

		Antibiyotik Direnci							Antibiyotik Direnci						
		0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6
Virülens Genleri	1	1		2	1						2				
	2	1	1	3				1	1		4	1	1	1	2
	3	4								2	3		1		
	4		1	1					5	5	3	2		1	
	5	3	2		1						3	2			
	6	1		1							3	2			
	7		2											1	
	8	1													
	9		1	1							2	1			
	10		1	1		1				1	3		1	3	
	11		2	2			2					1			
	12			2											
		Biyofilm Negatif %43,48 (n=40)							Biyofilm Pozitif %56,52 (n=52)						

Şekil 5.27. Biyofilm oluşturma özelliğine göre virülens genleri ve direnç seviyesi frekans grafiği

Biyofilm pozitif ve negatif izolatların taşıdıkları virülens genlerinin sayı bakımından benzer dağıldığı görüldü. Ancak, grafik antibiyotik dirençliliği yönünden incelendiğinde biyofilm pozitif izolatların antibiyotik direncinin arttığı bölge içerisine daha yaygın bulunduğu görüldü. Yapılan gözlemlerin daha iyi incelenebilmesi için biyofilm oluşturma özelliğine bağlı olarak izolatların virülens genleri ve antibiyotik direnci parametreleri içerisindeki dağılım durumları iki ayrı kutu grafiği ile görselleştirildi (Şekil 5.28).

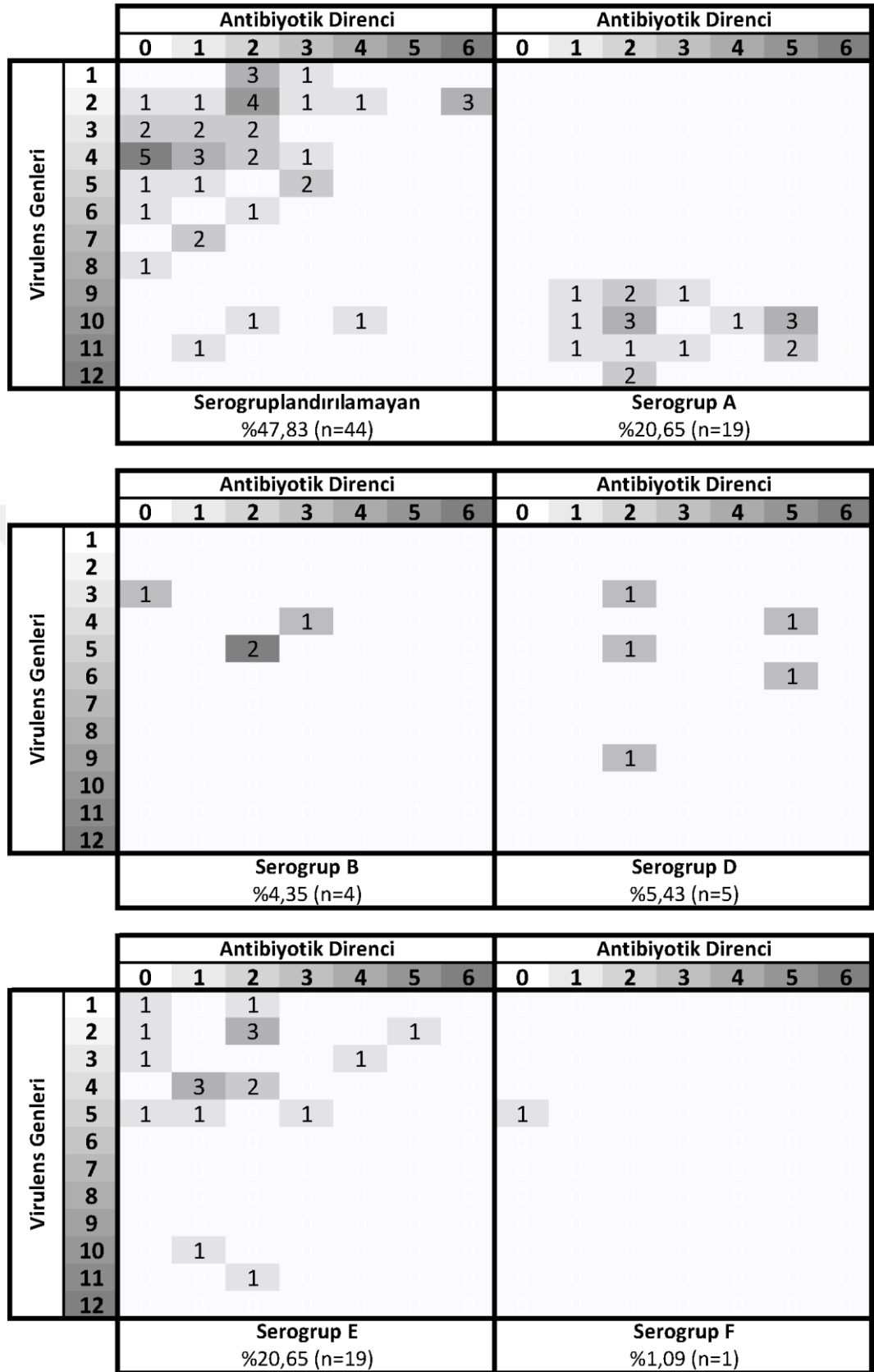


Şekil 5.28. Biyofilm oluşturma durumuna göre virülens geni sayısı (solda) ve biyofilm oluşturma durumuna göre antibiyotik direnci sayısı kutu grafikleri (sağda)

Biyofilm pozitif izolatlar ile biyofilm negatif izolatların taşıdıkları toplam virülens gen sayıları açısından ve dirençli oldukları toplam antibiyotik sayısı açısından oluşturdukları grupların birbirlerinden farkı olup olmadığının değerlendirilmesi için iki farklı Mann-Whitney U testi yapıldı. Yapılan ilk test sonucunda, biyofilm pozitif izolatlar ($Md = 4, n = 52$) ile biyofilm negatif izolatlar ($Md = 5, n = 40$) arasında taşıdıkları virülens geni sayısı bakımından anlamsız bir fark olduğu sonucuna ulaşıldı ($U = 876, z = -1,38, p = 0,17, r = 0,14$). Yapılan ikinci test sonucunda, biyofilm pozitif izolatlar ($Md = 2, n = 52$) ile biyofilm negatif izolatlar ($Md = 1, n = 40$) arasında dirençli oldukları toplam antibiyotik sayısı bakımından anlamlı fark oluşturdukları ($U = 1372, z = 2,70, p = 0,007$), ancak etkisinin küçük olduğu sonucuna ulaşıldı ($r = 0,28$) (Cohen, 1988).

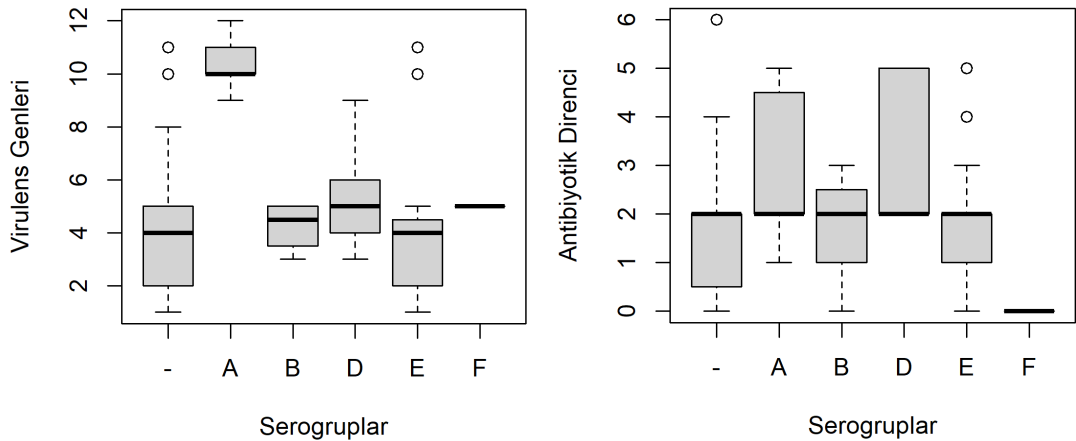
5.7.8. Virülens Genleri ve Antibiyotik Direncinin Sayısal Etkileşiminin Serogruplar Yönünden İncelenmesi

Tez çalışması içerisinde elde edilen *P. multocida* izolatlarının serogrup bazında, virülens genleri ve antibiyotik dirençliliği bakımından dağılımının incelendiği bir frekans grafiği oluşturuldu (Şekil 5.29). Serogruplandırılmayan izolatlar içerisindeki izolatların hem antibiyotik direnci hem de taşıdıkları virülens genleri bakımından sayıca nispeten az olarak ifade edilebilecek bir bölgede yığılma oluşturduğu görüldü. Serogrup A'yı oluşturan izolatların ise diğer gruplara kıyasla taşıdıkları virülens geni sayısı bakımından daha fazla sayıda, antibiyotik direnci sayısı bakımından ise ortalama bir sayıda izolat içerdiğini gösteren bir bölgeye yayıldığı görüldü.



Şekil 5.29. Serogruplar arası virülens genleri ve direnç seviyesi frekans grafiği

Serogrup B içerisindeki izolatların taşıdıkları virülens geni sayısı bakımından az olduğu, ancak sahip oldukları antibiyotik direnci sayısı bakımından ortada yer aldığı görülmektedir. Serogrup D’de ise Serogrup B’ye göre taşıdıkları virülens geni sayısı bakımından 1 izolat hariç oldukça benzer olduğu, ancak antibiyotik direnci bakımından grup olarak nispeten antibiyotiklere daha dirençli oldukları söylenebilir. Serogrup E’ye bakıldığında ise serogruplandırılmayan izolatların oluşturduğu gruba oldukça benzer olduğu ve aynı şekilde serogrup A’ya kıyasla 2 izolat haricinde taşıdıkları virülens geni sayısı bakımından oldukça düşük sayılar içeren bir bölgeye yayılmış olduğu görülmektedir. Antibiyotik direnci bakımından değerlendirildiğinde serogrup A’ya oldukça yakın ancak bir miktar aşağıda gibi görünmektedir. Serogrup F incelendiğinde ise tez çalışması içerisinde incelenen hiçbir antibiyotik grubuna karşı dirençli olmadığı ve virülens geni sayısı açısından diğer gruplarla kıyaslandığında ortada yer aldığı söylenebilir. Ancak bu gözlemler subjektiftir ve istatistiksel açıdan anlamlı bir kıyaslama yapılabilmesi için Serogrup B, D ve F içerisinde bulunan izolat sayısı yetersizdir. Frekans tablolarından yapılan çıkarımlara ek olarak, serogruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olup olmadığının değerlendirilebilmesi için virülens genleri ve antibiyotik dirençliliği unsurları bireysel olarak ele alındı ve kutu grafiği ile ifade edildi (Şekil 5.30). Serogruplar taşıdıkları virülens geni ve antibiyotik dirençleri sayısı bakımından oluşturdukları grupların birbirlerinden farklı olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla iki farklı Kruskal-Wallis H testi yapıldı.



Şekil 5.30. Serogruplar arası virülens geni sayısı (solda) ve serogruplar arası antibiyotik direnci sayısı kutu grafikleri (sağda)

Yapılan ilk test sonucunda toplam virülens geni sayısının serogruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu ortaya koyuldu [χ^2 (5, $n = 92$) = 41,12, $p = 0,000$]. Serogrup A içerisinde yer alan izolatların oluşturduğu medyan skor ($Md = 10$), serogruplandırılmayan izolatlar ($Md = 4$), serogrup B ($Md = 4,5$), serogrup D

($Md = 5$), serogrup E ($Md = 4$) ve serogrup F ($Md = 5$) olmak üzere diğer beş gruptan daha yüksek olarak tespit edildi. Bulunan sonuçların güvenilirliğinin değerlendirilmesi için gruplar arası Mann-Whitney U testi yapıldı. Serogrup A ve serogrup E arasında ($p=0,000$), Serogrup A ve serogruplandırılmayan izolatlar arasında ($p= 0,000$), Serogrup A ve serogrup B arasında ($p=0,017$), Serogrup A ve serogrup D arasında ($p=0,032$) anlamlı sonuç bulundu. Tip I hatadan kaçınmak için Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Bonferroni düzeltmesi uygulandıktan sonra yalnızca Serogrup A ve Serogrup E arasında ($p=0,000$), Serogrup A ve serogruplandırılmayan izolatlar arasında ($p=0,000$) olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Yapılan ikinci test sonucunda toplam antibiyotik direnci sayısının serogruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu ortaya koyuldu [$\chi^2 (5, n = 92) = 12,78$ $p = 0,026$]. Serogruplandırılmayan izolatların oluşturduğu medyan skor ($Md = 2$) ile serogrup A ($Md = 2$), serogrup B ($Md = 2$), serogrup D ($Md = 2$) ve serogrup E ($Md = 2$) eşit olarak tespit edildi. Serogrup F'nin ($Md = 0$) medyan değerinin diğerlerinden farklı olduğu tespit edildi. Bulunan sonuçların güvenilirliğinin değerlendirilmesi için gruplar arası Mann-Whitney U testi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda Serogrup D ve serogrup F ($p=0,047$), serogrup A ile serogrup E ($p=0,018$), serogruplandırılmayan izolatlar grubu ile serogrup A ($p=0,008$) arasında anlamlı ilişki tespit edildi. Tip I hatadan kaçınmak için Bonferroni düzeltmesi uygulandı ancak düzeltme uygulandıktan sonra bulunan bütün sonuçlar istatistiksel açıdan anlamsız olarak tespit edildi ($p>0,05$).

5.8. Aşı Suşu Seçimi

Aşı suşu belirlenmesinde temel kriter olarak biyofilm üretme durumu dikkate alındı. Biyofilm pozitif olduğu belirlenen, filogenotip ve antibiyotip yönünden karakterize edilen suşlardan virülens genleri taşıma durumu ile beraber antibiyotik direnç durumu göz önüne alınarak, her serogrup için 1 adet potansiyel aşı suşu belirlendi. Serogrup F'ye dâhil olan sadece 1 izolat olduğu için, biyofilm üretimi negatif olmasına rağmen potansiyel aşı suşu olarak değerlendirildi. Her serogrup için seçilen aşı suşlarının karakterizasyon sonuçları Tablo 5.21'de sunuldu.

Serogrup A-F için sırasıyla 48, 29, 25, 52 ve 69 no'lu izolatlar *in vivo* aşı denemelerinde kullanılmak üzere seçildi.

Tablo 5.21. Potansiyel aşı suşu olarak seçilen *P. multocida* izolatlarının karakterizasyon sonuçları

İzolat Numarası		48	29	25	52	69
Serogrup		A	B	D	E	F
Biyofilm		+	+	+	+	-
Virülens Genleri	<i>fur</i>	+	-	+	+	-
	<i>sodA</i>	+	+	+	+	+
	<i>pmHAS</i>	+	-	+	+	-
	<i>plpB</i>	+	+	+	+	-
	<i>fimA</i>	+	-	-	+	-
	<i>sodC</i>	+	+	+	+	+
	<i>ompH</i>	-	-	-	-	-
	<i>ompA</i>	+	+	+	+	-
	<i>tonB</i>	+	+	+	+	+
	<i>nanH</i>	+	-	+	+	+
	<i>nanB</i>	+	-	+	+	+
	<i>toxA</i>	-	-	-	-	-
	<i>oma87</i>	+	-	-	-	-
Antibiyotik Direnci	DAN	I	S	I	I	S
	TIL	R	S	R	S	S
	FFC	I	I	S	S	S
	CEQ	R	S	S	S	S
	CN	I	R	S	S	S
	TE	R	R	R	R	S

DAN: Danofloksasin; TIL: Tilmikosin; FFC: Florfenikol; CEQ: Sefkuinom; CN: Gentamisin; TE: Tetrasiklin

6. TARTIŞMA

Birçok farklı türden sağlıklı hayvanın üst solunum yolu epitelinde bulunan Gram negatif özellikte bir bakteri olan *P. multocida*, A, B, D, E ve F olmak üzere 5 serogrup altında kategorize edilmektedir (Dagleish et al., 2010). Bu serogruplar içinde diğerlerine kıyasla sığırlardaki morbiditesi ve mortalitesi daha yüksek olup sığırlarda pnömoniye yol açma ihtimali daha fazla olan serogrup, daha önce yapılan çalışmalara dayanarak serogrup A olarak bildirilmiştir (Griffin 1997; Katsuda et al., 2013; Kong et al., 2014). Selçuk Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada, 2016 ve 2019 yılları arasında Türkiye'nin 4 farklı coğrafik bölgesinden solunum sistemi enfeksiyonu olan 850 buzağı, 300 koyun ve 100 keçiden olmak üzere toplam 1250 adet akciğer örneği alınmıştır. Kültür, biyokimyasal testler ve PCR analizinden sonra, 66'sı (% 71,23) buzağılardan, 19'u (% 20,65) koyunlardan ve 7'si (% 7,60) keçilerden olmak üzere 92 adet *P. multocida* izolatu elde edilmiştir. Referans suşlarla birlikte toplam 96 adet *P. multocida* izolatu incelenmiştir. Araştırmacılar, en yüksek izolasyon oranını (63 adet) İç Anadolu'daki bir çiftlikte yer alan buzağılardan elde ettiklerini ve bu izolatların A, B veya E serogruplarından birine ait olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada bildirilen yalnızca buzağılardan yapılan izolasyon oranına bakıldığında, toplam 70 izolat olduğu ve bunların % 14,29'unun (n=10) serogrup A, % 4,29'unun (n=3) serogrup B, % 1,43'ünün (n=1) serogrup D, % 7,14'ünün (n=5) serogrup E'ye ait olduğu, serogrup F bulunamadığı ve son olarak % 25,71'inin (n=18) serogruplandırılmadığı bildirilmiştir (Sakmanoğlu vd., 2021). Van'da 2016-2017 yılları arasında yapılan bir tez çalışmasında da mezbahada kesimi yapılan 229 sığırın trakebronşiyal ve nazofarengeal bölgelerinden 458'er adet swap örneği ve özel kliniklere pnömoni şüphesiyle gelen sığırların nazofarengeal bölgesinden 52 swap örneği alınmıştır. Mezbaha örneklerinden 48 adet (% 10,48), kliniklerden 12 adet (% 23,08) olmak üzere alınan toplam 510 swap örneğinden 60 adet (% 10,48) *P. multocida* şüpheli izolat elde edilmiştir. Yapılan PCR sonucunda 60 izolatu 53'ü (% 88,33) doğrulanabilmiştir. İzolatların PCR ile serogruplandırılması sonucunda tüm izolatların (% 100) serogrup A olduğu, hiçbir izolatu serogrup B, D, E ve F açısından pozitiflik göstermediği saptanmıştır (Gülaydın, 2018).

İzmir ilinden 350 adet, Aydın ilinden 220 adet olmak üzere toplam 570 adet sığırdan alınan intratrakeal swap örneğinden *P. multocida* izolasyonu ve sonrasında serogruplandırma yapılmıştır. İzmir'den alınan örneklerden 18 adet, Aydın'dan alınan örneklerden 10 adet olmak üzere toplam 28 adet *P. multocida* izolatu elde edilmiştir.

Bu izolatların % 53,6, % 35,7 ve % 3,6'sı sırasıyla serogrup B, A ve D'ye dâhil bulunmuştur. Bununla birlikte, 2 adet (% 7,1) izolat serogruplandırılmamıştır (Erbaş ve Kaya, 2008).

Sakarya, Samsun, Çarşamba, Bafra ve Terme mezbahalarında kesilen 791 adet (% 71,5) sığır ve 315 adet (% 28,5) mandanın nazofaringeal boşluklarından toplam 1106 svap örneği ile yapılan bir çalışmada ise mezbaha örneklerinden 22 adet (% 78,6) ve hasta olduğu bilinen hayvanlardan 6 adet (% 21,4) olmak üzere toplam 28 adet *P. multocida* izole edilmiştir. Agar jel difüzyon testi sonucunda 24 izolat ve farelerde koruma testi yapılarak 28 izolat serogrup B olarak tespit edilmiştir (Batu ve Elverdi, 1973).

Macaristan'da insanlar da dâhil edilmek üzere çeşitli hayvan türlerinden ve değişik lokasyonlardan 1988-2018 yılları arasında elde edilmiş 180 adet *P. multocida* izolatı kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada 81 adet sığır kökenli *P. multocida* izolatı incelenmiş ve izolatların % 90,10'unun serogrup A, % 9,90'nın serogrup D'ye dâhil olduğu ve diğer serogruplara ait izolatlar bulunamadığı görülmüştür. Çalışmada sığırların yanı sıra 15 adet koyun, 5 adet keçi, 40 adet domuz, 28 adet insan ve 11 adet kedi kökenli *P. multocida* izolatı incelenmiştir. İnsan kökenli izolatlardan 2 tanesinin (insan izolatlarının % 7,14'ü) serogrup F'ye ait olduğu, geriye kalan 97 izolatın tamamının serogrup A veya serogrup D içerisinde yer aldığı bildirilmiştir (Ujvári et al., 2019).

Japonya'nın 30 farklı bölgesinden 2009-2012 yılları arasında her bir sürüden bir izolat olacak şekilde 140 adet klinik olarak sağlıklı ve 238 adet SSH kökenli akciğer lezyonu bulunan sığırdan alınan nazal svaplardan izole edilmiş toplam 378 adet *P. multocida* saha izolatı incelenmiştir. Bu izolatların % 93,70'i serogrup A ve % 6,30'u serogrup D olarak tanımlanmıştır (Katsuda et al., 2013).

İran'da 2012-2013 yılları arasında 98'i sütçü ve 71'i etçi olmak üzere toplam 169 adet solunum sistemi enfeksiyonu şüpheli buzağıdan nazal svap örnekleri toplanmıştır. Sütçü buzağının % 82,65'inden, etçi buzağının ise % 84,51'inden olmak üzere toplam 141 adet (% 83,43) *P. multocida* izole edilmiştir. İzolatların % 89,40'ı serogrup A, % 2,10'u serogrup B ve % 8,50'si serogrup D olarak rapor edilmiştir (Jamali et al., 2014).

İtalya'da 2004-2011 yılları arasında farklı bölgelerden ve farklı hayvan türlerinden olmak üzere *P. multocida* saha izolatları dört teşhis laboratuvarında toplanmış, toplam 186 adet izolatın % 20,97'sinin sığırlardan, % 10,22'sinin

koyunlardan, % 21,51'inin domuzlardan ve % 47,31'inin tavşanlardan izole edildiği bildirilmiştir. Sığır izolatlarının 36'sı solunum sistemi enfeksiyonu kökenli, 3'ü diğer nedenlerden olmak üzere tamamı serogrup A olarak tespit edilmiştir. Diğer hayvan türleri de dâhil edilerek serogrupların genel dağılımına bakıldığında izolatların % 74,2'sinin serogrup A, % 0,5'inin serogrup B, % 12,9'unun serogrup D ve % 12,4'ünün serogrup F olduğu görülmüştür. Hiçbir hayvan türünden serogrup E tespit edilememiştir (Cucco et al., 2017).

Hindistan'da altı çiftlikten bir yıllık zaman dilimi içerisinde klinik olarak sağlıklı ve hastalıklı hayvanlardan toplanan 335 adet örnekten 23 adet *P. multocida* izolatu elde edilmiştir. İzolatların % 17,40'ı serogrup A ve % 82,60'ı serogrup B olarak bulunmuştur (Verma et al., 2013).

Suudi Arabistan'da 2014-2015 yılları arasında buzağı, koyun ve keçilerden 425 adet nazofarengeal svap, 175 adet akciğer ve dalak örneği toplanmış ve konvansiyonel metotlar kullanılarak incelenmiştir. Solunum sistemi semptomu gösteren hayvanlardan 80 adet (% 18,82), zorunlu kesime tabii tutulan hayvanlardan ise 77 adet (% 44,00) *P. multocida* izolatu elde edilmiştir. Nazofarengeal svap örneği alınan 200 buzağıdan 35 adet (% 17,50), akciğer ve dalak örneği alınan 75 buzağıdan 30 adet (% 40) olmak üzere, buzağılardan 65 adet (% 23,64) *P. multocida* izole edilmiştir. İzolatlar PCR ile doğrulandıktan sonra tüm izolatlara multipleks PCR ile serogruplandırma yapılmış ve izolatların % 66,88'i serogrup A, % 33,12'si serogrup E bulunmuştur. Serogrup B, D veya F tespit edilememiştir (Al-Maary et al., 2017).

Hindistan'ın çeşitli bölgelerinden izole edilmiş 38 sığır, 34 manda ve 28 koyun kökenli toplam 100 adet *P. multocida* izolatının incelendiği bir çalışmada, PCR sonucunda sığırların % 5,26'sı serogrup A'ya, % 94,74'ü serogrup B'ye dâhil bulunmuştur. Mandaların % 11,76'sı serogrup A, % 88,24'ü serogrup B olarak, koyunların ise % 92,86'sı serogrup A ve % 7,14'ü serogrup F olarak bulunmuştur (Kumar et al., 2009).

Rusya'da yapılan bir çalışmada ölmüş siyah alaca ırkı buzağılardan 161 adet akciğer, 54 adet lenf nodülü, 45 adet dalak örneği olmak üzere toplam 260 adet örnek alınmış ve bu örneklerden 130 adet (% 50) *P. multocida* izolatu elde edilmiştir. İzolasyon oranları akciğer örneklerinden % 63,35, lenf nodülü örneklerinden % 44,44, dalak örneklerinden % 8,89 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen 130 izolatın % 86,15'i (n=112) serogrup A, % 11,54'ü serogrup B ve % 2,31'i (n=3) serogrup D olarak belirlenmiştir (Nefedchenko et al., 2017).

Rusya’da *P. multocida*’lardaki *ompH* proteininin çeşitliliğini araştırmak için yapılan bir çalışmada, Batı Sibirya’nın çeşitli bölgelerindeki 23 çiftlikten 2006-2014 yılları arasında solunum sisteminde patolojik bulgular gösteren sığırların akciğerlerinden 83 adet *P. multocida* izolatı elde edilmiştir. Bölgede yapılan önceki çalışmalara dayanarak izolatlar sadece serogrup A, B ve D bakımından incelenmiş ve izolatların serogrup bakımından dağılımının % 75,90 oranında serogrup A ve % 24,10 oranında serogrup D şeklinde olduğu bildirilmiştir (Nefedchenko et al., 2019).

Amerika’da yapılan bir çalışmada NCBI’nın Short Read arşivi veri tabanından 338 adet, Assembly veri tabanından 193 adet ve Minnesota Üniversitesi’ne ait arşivden 125 adet sekans verisi olmak üzere, 1936-2019 yılları arasında elde edilmiş toplam 656 adet *P. multocida* izolatına ait tüm genom sekansı verisi elde edilmiştir. Toplanan sekans verilerinin % 23,63’ü sığır kökenli izolatlara ait olup, çeşitli coğrafik alanlardan elde edilmişlerdir. *P. multocida*’nın genomik çeşitliliğinin ve moleküler epidemiyolojisinin araştırıldığı bu çalışmada yapılan serogruplandırmaya göre, sığır izolatları % 70,97 oranında serogrup A, % 27,10 serogrup B ve % 1,94 oranında serogrup F olarak bulunmuştur (Smith et al., 2021). Kırk beş adet referans suşun da dâhil edildiği, NCBI veri tabanında yer alan ve birçok farklı türden hayvana ait izolatın genom sekanslarının incelenerek genomik serogruplandırma tahminlerinin yapıldığı bir çalışmada, 107 adet sığır kökenli izolat genomu incelenmiş ve incelenenlerin % 76,64’ü serogrup A, % 21,5’i serogrup B ve % 0,93’ü serogrup F olarak bulunmuştur. İncelenen genomların % 6,54’ü tiplendirilememiştir (Christensen et al., 2022).

Bu tez çalışmasında 92 adet *P. multocida* izolatı elde edilmiştir. Yapılan PCR analizi sonucunda izolatların % 20,65’i (n=19) serogrup A, % 4,35’i (n=4) serogrup B, % 5,43’ü (n=5) serogrup D, % 20,65’i (n=19) serogrup E, % 1,09’u (n=1) serogrup F olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, % 47,83’ü (n=44) herhangi bir serogruba dâhil edilememiştir. Christensen vd. (2022) tarafından bildirilen bulgular çerçevesinde, Amerika, Avustralya, Bangladeş, Çin, Hindistan, İngiltere, İran, İsviçre, Kanada, Kazakistan, Malezya, Pakistan, Sri Lanka, Tayland ve Tibet gibi birçok ülkeden izole edilen suşlar arasında sığır kökenli olanların dominant olarak serogrup A olmak üzere serogrup B ve F’ye dâhil olma ihtimalinin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Smith vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada da yine birçok ülkeden alınan genom bilgilerine dayanarak, sığır kökenli örneklerden baskın serogrup olarak serogrup A olma ihtimali olduğu ve bunu serogrup B ve F’nin takip ettiği bildirilmiştir. Samsun’un ilçelerinden alınan örneklerinin de olduğu Batu ve Elverdi (1973) tarafından yapılmış çalışmada,

izolatların tamamı serogrup B olarak bildirilmiştir. Bu tez çalışması için örnek toplanma aşamasına kadar ki yaklaşık 50 yıllık süre içerisinde teknolojinin gelişmesi, ulaşımın kolaylaşması, hayvan hareketliliğinin artması gibi birçok nedenden dolayı serogrup B oranı azalmış, diğer serogrupların sığır popülasyonu içerisindeki oranı değişmiş olabilir. Erbaş ve Kaya (2008) tarafından yapılan çalışmada, B ve D serogrupları, bu tez çalışmasında bulunanın aksine daha yüksek oranda bulunmuştur. Sakmanoğlu vd. (2021)'nin çalışmasında buzağılarda bildirilen oranlar incelendiğinde, oransal olarak en yüksek grubu serogruplandırılmayan izolatların oluşturduğu, serogruplandırılabilen izolatlar içerisindeyse en büyük grubu serogrup A'nın oluşturduğu ve bunu takiben en büyükten en küçüğe doğru sırasıyla serogrup E, B, D'nin takip ettiği, serogrup F ise bulunamadığı görülmektedir. Verilen oranlar bu tez çalışmasındaki oranlara oldukça benzerdir. Bu durumda hali hazırda kullanılmakta olan primerlerin serogrupları ayırmada yeterince başarılı olmadığı veya Türkiye'de yeni bir veya birden fazla yeni serogrup olabileceği ihtimali düşünülebilir. Serogruplandırılmayan izolatlarda primerlerinin bağlandığı bölgelerde mutasyonel değişimlerin meydana gelmiş olma olasılığı da serogruplandırma sonuçlarını etkilemiş olabilir. Bu nedenlerden dolayı tüm genom sekanslama çalışmaları yapılarak bu coğrafya üzerindeki izolatların evrimsel bir değişim geçirip geçirmediği, geçirdiyse nasıl bir değişim geçirdiği ve dünya çapında geçerli serogrup sınıflandırmasında yer alan izolatlara hangi oranda genetik yakınlık teşkil ettiği araştırılmalıdır.

P. multocida suşlarının patojenitesi, dermonekrotik toksin, çeşitli adezinler, demir kazanım proteini ve dış zar proteinleri (OMP) gibi çeşitli virülens faktörleriyle ilişkilidir. *P. multocida*'nın patojenitesi, virülens faktörleri ve serogruplar tarafından belirlenmesi nedeniyle, bu virülens faktörlerinin değerlendirilmesi önemlidir (Ewers et al., 2006). *P. multocida* izolatları için tanımlanan virülensle ilişkili genler ve bunların örnekleri arasında yapışma ve kolonizasyon faktörleri ile ilişkili *ptfA*, *fimA*, *hsf-1*, *hsf-2*, *pfhA* ve *tadD* genleri, demirle düzenlenen ve kazanım proteinlerini kodlayan *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *hgbB* ve *fur* genleri, nöraminidaz enzimini kodlayan *nanB* ve *nanH*, hiyalüronidazı kodlayan *pmHAS* geni ve süperoksit dismutazları kodlayan *sodA*, *sodC* ve *tbpA* genleri, dermonekrotik toksini kodlayan *toxA* geni, lipopolisakkaritler (LPS), kapsül ve çeşitli dış koruyucular ile ilişkili *ompA*, *ompH*, *oma87* ve *plpB* gibi genler bildirilmiştir (Katoch et al., 2014).

Proteomik çalışmalar neticesinde yapıları ve immunojeniteleri açısından deneysel olarak karakterize edilen ve yapılan çalışmalarda en çok incelenen OmpA,

OmpH, PlpB ve Oma78 proteinleri, *P. multocida* dış membran proteinleri olarak da bilinmekte ve aynı isimli virülens genleri tarafından kodlanmaktadır. Fonksiyonları itibariyle OmpA proteininin dış membran stabilitesinin sağlanmasında rol aldığı ve porin proteini olarak da işlevlerinin olduğu; OmpH proteinin dış membran porini olduğu; PlpB proteininin muhtemelen metiyonin gibi aminoasitleri taşımakta görev alan ABC tipi transport fonksiyonu bulunan bir lipoprotein olduğu; Oma87 proteininin ise dış membran porini olduğu tahmin edilmektedir (Boyce et al., 2006). Yakın bir zamana kadar dış membran proteinleri arasında en iyi karakterize edilmiş olan OmpH'nin virülens faktörü olarak davrandığı ve temelde tüm sığır izolatlarında mevcut olduğu tarafından bildirilmiştir (Dabo et al., 2007). OmpH'nin fare ve tavuklar kullanılarak yapılan eprüvasyon çalışmalarında koruma sağladığı gösterilmiş olup aşı adayı olarak da değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür (Hsuan et al., 2009). Sığır pnömoni kaynaklı *P. multocida* izolatları kullanılarak yapılan çalışmalarda *ompA*, *ompH* *oma87* ve *plpB* gen varlığına bakılmıştır. Peng vd. (2019) tarafından 17 izolat ile yapılan bir çalışmada *oma87* geni % 94,12 (n=16) oranında, *ompA* geni % 76,47 (n=13) oranında, *ompH* geni % 82,35 (n=14) oranında, *plpB* geni % 100,00 (n=17) oranında bulunmuştur. Jolley vd. (2018) tarafından oluşturulmuş internet sitesi üzerindeki *P. multocida*'ya ait genomik verilerin bulunduğu veri tabanındaki veriler kullanılarak 3 adet izolatla yapılan inceleme sonucunda *ompA*, *ompH*, *oma87* ve *plpB* genleri bulunamamıştır. Gharibi vd. (2017) tarafından 10 izolat ile yapılan bir çalışmada *oma87* geni % 90,00 (n=9) oranında ve *ompH* geni % 70,00 (n=7) oranında bildirilmiştir. Aynı çalışma içerisindeki 12 manda kökenli izolatın analizi sonucunda ise *oma87* geni % 91,67 (n=11) oranında ve *ompH* geni % 41,67 (n=5) oranında bulunmuştur. Prajapati vd. (2020) tarafından 4 adet manda kökenli izolat kullanılarak yapılan bir çalışmada *ompA*, *ompH*, *oma87* ve *plpB* genleri % 100 (n=4) oranında tespit edilmiştir. Ewers vd. (2006) tarafından sığır kökenli 104 izolat ile yapılan bir çalışmada ise *oma87* ve *ompH* genleri % 100,00 (n=104) oranında bulunmuştur. Aynı çalışmada manda orijinli 7 izolat da analize dâhil edilmiş ve analiz sonucunda manda kökenli izolatlarda *oma87* ve *ompH* genleri % 100,00 (n=7) oranında saptanmıştır. Katsuda vd. (2013) tarafından 378 izolat ile yapılan bir çalışmada *oma87* ve *ompH* genleri % 100,00 (n=378) oranında belirlenmiştir. Jamali vd. (2014) tarafından 141 izolat ile yapılan bir çalışmada *oma87* ve *ompH* genleri % 100,00 (n=141) oranında bulunurken, Khamesipour vd. (2014) tarafından 30 izolat ile yapılan bir çalışmada, *oma87* geni % 90,00 (n=27) oranında, *ompA* geni % 90,00 (n=27) oranında, *ompH*

geni % 86,67 (n=26) oranında, *plpB* geni % 83,33 (n=25) oranında tespit edilmiştir. Verma vd. (2013) tarafından 23 izolat ile yapılan bir çalışmada *oma87* geni % 91,30 (n=21) oranında rapor edilmiştir. Moğulkoç (2020) tarafından Türkiye’de 9 izolat üzerinden yapılan bir tez çalışmasında da *oma87*, *ompA* ve *ompH* genleri % 100,00 (n=9) oranında bulunmuştur. Abed vd. (2020) tarafından 5 izolat ile yapılan bir çalışmada *oma87* geni % 100,00 (n=5) oranında bulunurken, Prajapati vd. (2022) 3 izolat ile yaptıkları bir çalışmada, *oma87*, *ompA*, *ompH* ve *plpB* genlerini % 100,00 (n=3) oranında belirlemişlerdir. Smith vd. (2021) tarafından 123’ü sığır, 30’u manda ve 3 tanesi vizon kökenli toplam 155 izolat ile yapılan bir çalışmada *plpB* geni % 100,00 (n=155) oranında saptanmıştır. Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından 70 izolat ile yapılan bir çalışmada *oma87* geni hiç bulunamazken, *ompA* geni % 68,57 (n=48) oranında, *ompH* geni % 5,71 (n=4) oranında, *plpB* geni % 54,29 (n=38) oranında belirlenmiştir. Peng vd. (2021) tarafından 106 izolat ile yapılan bir çalışmada *oma87* geni % 99,06 (n=105), *ompA* geni % 98,11 (n=104), *ompH* geni % 99,06 (n=105) ve *plpB* geni % 98,11 (n=104) oranında rapor edilmiştir.

Yapılan çalışmalara *oma87*, *ompA*, *ompH* ve *plpB* genleri açısından bakıldığında, gen varlığının % 0-100 arasında oldukça geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir. *oma87* geninin incelendiği 16 çalışma içerisindeki 8 çalışmada gen varlığı % 100 oranında, 6 çalışmada da bu oran % 90’dan yüksek olduğu bildirilmiştir. Diğer 2 çalışmada ise bu oran % 0 olarak bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen % 7,61’lik bir oran ile son gruba daha yakın oranda bir sonuç bulunduğu görülmektedir. *ompA* geni açısından 8 çalışma karşılaştırılmış ve *ompA* gen varlığı, arasında ülkemizden de bir tez çalışmasının yer aldığı, 3 çalışmada % 100 oranında bildirilmiştir. Bunun yanı sıra 2 çalışmada % 90’ın üzerinde, ülkemizden bir çalışmayı da içeren 2 çalışmada yaklaşık % 65-75 aralığında, 1 çalışmada ise % 0 oranında bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında *ompA* geni, % 30,43 ile diğer bildirilen oranlardan oldukça düşük bir oranda tespit edilmiştir. *ompH* geni açısından, tez çalışması sırasında incelenen 14 çalışmanın sonuçları ile karşılaştırıldığında, ülkemizde yapılan iki çalışmanın sonuçları ile bir benzerlik bulunmamaktadır. Bu çalışmada bulunan % 23,91 oranındaki *ompH* gen varlığının, yurt dışı çalışmalardan Gharibi vd. (2017)’nin tespit ettiği orana en yakın olduğu görülmüştür. Ancak, genel olarak yapılan çalışmaların çoğunluğunda bildirilen *ompH* oranlarına bakıldığında, bu tez çalışmasında bulunan orana uymadığı görülmektedir. *plpB* genine bakıldığında ise, bu çalışmada tespit edilen % 70,65’lik *plpB* gen varlığının, ülkemizde yapılmış ve

yukarıda sözü edilen bir çalışmadan daha fazla olduğu, ancak dünya genelinde bildirilen çalışmalardan oransal olarak daha düşük oranda olduğu görülmektedir.

Gizli değişken modeli kullanılarak hazırlanan bir korelasyon tablosunda *ompH*'nin *plpB* ile arasında 0,93, *toxA* ile arasında 0,95, *pmHAS* ile arasında 0,87, *nanH* ile arasında 0,89 birimlik anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Ancak *ompH* ile *ompA*, *oma87*, *sodC*, *sodA*, *nanB*, *fur* ve *fimA* arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Çalışmada bakılan diğer virülens genleri ile *ompA*, *oma87* arasında önemli bir ilişki belirlenmemiştir. *plpB*'nin *toxA* ile arasında 0,80, *pmHAS* ile arasında 0,64 birimlik anlamlı ilişki bulunmuştur. Ancak, *plpB* geni ile *ompA*, *sodC*, *sodA*, *nanB*, *nanH*, *fur* ve *fimA* genleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (Prajapati et al., 2020). Ewers vd. (2006) tarafından 289 izolata ait verilerin incelenmesi sonucu hazırlanan korelasyon tablosunda *ompH* ve *oma87* ile diğer virülens faktörleri arasındaki korelasyon ilişkisi incelenmiş ve sonuç olarak *oma87* ile *tonB* arasında bulunan % 99,7'lik pozitif yönlü ilişki ($p<0,01$) harici, diğer genler ile aralarında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$). Bu çalışmanın bulgular bölümünde ayrıntılı bir şekilde verilen korelasyon bulguları Prajapati vd. (2020) tarafından bildirilenler ile karşılaştırıldığında, *ompH* ve *plpB* arasındaki güçlü bir korelasyonun ya da *plpB* ile *pmHAS* arasında bulunan orta derecedeki korelasyonun aksine bu tez çalışmasında her iki durum için de korelasyon anlamsız bulunmuştur. *ompH* ile *pmHAS* arasında da bulunan korelasyonlar bu tezde bulunan korelasyon verileri ile uyumlu değildir. Ayrıca *oma87* ile *tonB* arasında Ewers vd. (2006) tarafından çok yüksek düzeyde bir ilişki saptanırken, bu tez çalışmasında zayıf bir ilişki belirlenmiş ve verilerin bu yönden uyumlu olmadığı görülmüştür.

Gen varlıklarının serogruplar içerisindeki dağılımı incelendiği zaman, Verma vd. (2013) tarafından 23 izolat ile yapılan analiz sonucunda izolatların % 82,61'inin (n=19) serogrup B'ye, % 17,39'unun (n=4) ise serogrup A'ya ait olduğu tespit edilmiştir. Serogrup A içindeki izolatların % 75'inde (n=3), serogrup B'ye dâhil izolatların ise % 94,74'ünde (n=18) *oma87* geni varlığını bildirmişlerdir. Toplamda 23 izolat içerisinde % 91,30 (n=21) oranında *oma87* geni saptamışlardır. Ewers vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada birçok türden canlıdan izole edilen toplam 289 izolat kullanılmıştır. Bu izolatlar arasında % 71,63 (n=207) oranında serogrup A, % 3,46 (n=10) oranında serogrup B, % 14,54 (n=42) oranında serogrup D, % 2,42 (n=7) oranında serogrup E, % 2,42 (n=7) oranında serogrup F bulunmuştur. Ayrıca izolatların % 5,54'ü (n=16) serogruplandırılmamıştır. Bu izolatlar içerisinde *ompH*

geni tüm serogruplar içerisinde % 100 oranında tespit edilmiştir. *oma87* geni ise serogrup A-F içerisinde % 100 oranında tespit edilirken, serogruplandırılamayan izolatların oluşturduğu grup % 93,8 (n=15) oranında *oma87* geni açısından pozitif olarak bulunmuştur. Khamesipour vd. (2014)'nin çalışmasında, *ompA* geninin serogruplar içerisindeki oranı incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 86,96 (n=20/23) ve serogrup D içerisinde % 100,00 (n=5/5) ve serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde % 100,00 (n=2/2) oranında bulunmuştur. Aynı çalışmada, *ompH* geninin varlığı serogrup A içerisinde % 91,30 (n=21/23), serogrup D içerisinde % 60,00 (n=3/5) oranında, ve serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde % 100,00 (n=2/2) oranında rapor edilmiştir. Bu izolatlar *oma87* açısından serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 91,30 (n=21/23) oranında ve serogrup D içerisinde % 100,00 (n=5/5) oranında, serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde % 50,00 (n=1/2) oranında belirlenmiştir. Bu izolatlardaki *plpB* gen varlığı serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 78,26 (n=18/23) oranında ve serogrup D içerisinde % 100,00 (n=5/5) oranında, serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde % 100,00 (n=2/2) oranında bulunmuştur.

Sakmanoğlu vd. (2021)'nin çalışmasında, tüm izolatlar içerisinde % 69,79 (n=67/96) oranında olan *ompA* geninin serogruplar içerisinde dağılımına bakıldığında, serogrup A'da % 77,55 (n=38/49), serogrup B'de % 50,00 (n=2/4), serogrup D'de % 100,0 (n=4/4), serogrup E'de % 0,00 (n=0/5) oranında ve serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde ise % 67,65 (n=23/34) oranında bulunmuştur. Tüm izolatlar içerisinde % 4,17 (n=4/96) oranında olan *ompH* geninin serogruplar içerisinde dağılımına bakıldığında, serogrup A'da % 8,16 (n=4/49), serogrup B'de % 0,00 (n=0/4), serogrup D'de % 0,0 (n=0/4), serogrup E'de % 0,00 (n=0/5) oranında ve serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde ise % 0,0 (n=0/34) oranında rapor edilmiştir. Tüm izolatlar içerisinde % 52,08 (n=50/96) oranında olan *plpB* geni serogrup A'da % 55,10 (n=27/49), serogrup B'de % 75,0 (n=3/4), serogrup D'de % 50,00 (n=2/4), serogrup E'de % 0,00 (n=0/5) oranında ve serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde ise % 52,94 (n=18/34) oranında tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, hiçbir izolatta *oma87* geni bulunamadığı için serogruplar arası dağılım hesaplamalarına katılmamıştır.

Bu çalışmada incelenen izolatlarda *ompA* geni serogrup A'da % 94,74 (n=9/19), serogrup B'de % 25,00 (n=1/4), serogrup D'de % 20,00 (n=1/5), serogrup E'de % 10,53 (n=2/19) ve serogruplandırılamayan izolatlarda % 13,64 (n=6/44) oranında

tespit edilmiştir. Serogrup F de ise *ompA* geni bulunmamıştır. İzolatlardaki *ompH* geni serogrup A'da % 47,37 (n=9/19), serogrup B'de % 50,00 (n=2/4), serogrup D'de % 20,00 (n=1/5), serogrup E'de % 10,53 (n=2/19) ve serogruplandırılamayan izolatlarda % 18,18 (n=8/44) oranında olduğu görüldü. Serogrup F ise *ompH* geni açısından negatif bulundu. İzolatlardaki *oma87* geni serogrup A'da % 36,84 (n=7/19) oranında olduğu görüldü. Serogrup B, D, E, F ve serogruplandırılamayan izolatlar *oma87* geni açısından negatif bulundu. İzolatlardaki *plpB* geni serogruplara göre incelendiğinde serogrup A'da % 78,95 (n=15/19), serogrup B'de % 100,0 (n=4/4), serogrup D'de % 100,00 (n=5/5), serogrup E'de % 89,47 (n=17/19) oranında ve serogruplandırılamayan izolatlarda % 54,55 (n=24/44) oranında olduğu görüldü. Serogrup F ise *plpB* geni açısından negatif bulundu.

İncelenen diğer çalışmalara göre serogrup A izolatlarında, *ompA* geni kısmen daha yüksek oranda, *ompH* ve *oma87* geni diğer çalışmaların aksine ortalama bir düzeyde, *plpB* geni Khamesipour vd. (2014) tarafından bulunan ile aynı oranda bulunmuştur. Serogrup B izolatlarındaki *ompA*, *ompH* ve *plpB* gen oranları, bu tez çalışmasında elde edilen bulgular ile kıyaslandığında; *ompA* geni daha düşük oranda, *ompH* orta düzeyde, *plpB* ise daha fazla oranda belirlenmiştir. Serogrup D izolatları içindeki *ompA*, *ompH* ve *plpB* gen oranları açısından kıyaslama yapıldığında; *ompA* geni daha düşük oranda, *ompH* geni nispeten düşük ama Sakmanoğlu vd. (2021) çalışmasıyla benzer oranda ama diğer iki çalışmaya göre düşük bir oranda, *plpB* geni Khamesipour vd. (2014) ile aynı oranda fakat Sakmanoğlu vd. (2021)'ne göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Serogrup E izolatları içindeki *ompA*, *ompH* ve *plpB* gen varlığı oranları bu tez çalışmasında elde edilen bulgular ile kıyaslandığında; *ompA* geni daha yüksek, *ompH* daha düşük ve *plpB* daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Serogrup F izolatları *ompH* geni açısından değerlendirildiğinde ise, bu tez çalışmasında elde edilen bulgular ile kıyaslandığında; Ewers vd. (2006) tarafından yapılan çalışmanın aksine % 0 oranında bulunmuştur. Serogruplandırılamayan izolatlara ait verilere bakıldığında *ompA*, *ompH* ve *oma87* geni bu tez çalışmasında daha düşük oranda bulunduğu veya bulunamadığı görülmüş olup, *plpB* geni ise Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada bildirilen oranda belirlenmiştir. Ayrıca tez çalışması içerisinde yapılan istatistiksel analiz sonucunda, *ompA*, *ompH*, *oma87* ve *plpB* genlerinin *P. multocida* serogrupları içerisinde anlamlı bir farklılık oluşturacak şekilde bulunup bulunmadığı değerlendirildi ve *ompA*, *ompH*, *oma87* genleri için tüm serogruplar, *plpB* geni için serogrup B, D, E, F ve serogruplandırılamayan izolatların

oluşturduğu grup içerisinde anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlendi ($p>0,1$). Serogrup A'da ise *plpB* geni bakımından anlamlı bir farklılık bulunduğu saptandı ($p=0,05$).

Bakteriyel fimbriyaların bir alt birimi olan ve bakteri adezyonunda görev alan 41 kDa'luk hücre yüzeyi proteini fimbrilin, *fimA* geni tarafından kodlanmaktadır (Iwashita et al., 2019). Kolonizasyon faktörleri arasında yer almaktadır ve *P. multocida*'nın temel virülensle ilişkili genlerinden birisi olarak da kabul edilmektedir (Khamesipour et al., 2014). Pnömoni kaynaklı sığır orijinli *P. multocida* izolatları ile yapılan çalışmalarda *fimA* geni varlığının araştırılması önemli olarak düşünülmektedir. Prajapati vd. (2022) tarafından 3 izolat kullanarak yapılan çalışmada % 0,00 ($n=0/3$) oranında, Jolley vd. (2018) tarafından bildirilen veri tabanının incelenmesi sonucunda % 66,67 ($n=2/3$) oranında, Khamesipour vd. (2014), tarafından 30 izolat kullanılarak yapılan çalışmada % 80,00 ($n=24/30$), Prajapati vd. (2020), tarafından 4 izolat kullanılarak yapılan çalışmada % 100,00 ($n=4/4$), Katsuda vd. (2013), tarafından 378 izolat kullanılarak yapılan çalışmada % 100,00 ($n=378/378$), Jamali vd. (2014) tarafından 141 izolat kullanılarak yapılan çalışmada % 100,00 ($n=141/141$), Peng vd. (2021), tarafından 106 izolat ile yapılan çalışmada % 100,00 ($n=106/106$) ve Ujvári vd. (2019), tarafından 81 izolat ile yapılan çalışmada % 100,00 ($n=81/81$) oranında *fimA* geni tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında, 5 çalışmada *fimA* geni varlığının % 100 oranında bildirildiği, 2 çalışmada yaklaşık % 65-80 aralığında olduğu, incelenen son çalışmada % 0 oranında bulunduğu görülmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında *fimA* geni % 43,48 oranında bulundu. Buna göre, incelenen çalışmaların çoğunluğuna nazaran *fimA* geninin daha düşük bir oranda bulunmuş fakat ülkemizde yapılmış çalışmalar arasında söz konusu gen varlığı ile ilgili bir veriye rastlanmamıştır.

Gizli değişken modeli kullanılarak hazırlanan bir korelasyon tablosunda *fimA* geni ile *fur*, *nanH*, *nanB*, *pmHAS*, *sodA*, *toxA*, *sodC*, *ompH*, *ompA*, *plpB* ve *oma87* genleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Prajapati et al., 2020). Bu çalışmada, *fimA*'nın *fur* ve *nanB* ile arasında 0,25, *nanH* ile arasında 0,37, *ompA* ile arasında 0,32, *pmHAS* ile arasında 0,40, *sodA* ile arasında 0,35 birimlik pozitif yönde ve anlamlı bir korelasyon belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *fimA* ile *oma87*, *ompH*, *plpB*, *sodC* ve *tonB* arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamış ve Prajapati vd. (2020) tarafından bildirilen korelasyon oranları değerlendirildiğinde *fimA* ile *fur*, *nanB*, *nanH*, *ompA*, *pmHAS*, *sodA* genleri arasındaki ilişkinin bu tezde bulunan korelasyon durumu ile uyumlu olmadığı görülmüştür.

Khamesipour vd. (2014) tarafından elde edilen izolatlardaki *fimA* gen varlığı serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 86,96 (n=20/23) ve serogrup D içerisinde % 60,00 (n=3/5) oranında, serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde % 50,00 (n=1/2) oranında bulunmuştur. Jamali vd. (2014) tarafından sığır kökenli izolatlar incelenmiş ve bunların % 89,36'sı (n=126/141) serogrup A, % 2,12'si (n=3/141) serogrup B ve % 8,51'i (n=12/141) serogrup D olarak bulunmuştur. Bu izolatların tamamında *fimA* geni bulunduğu bildirilmiştir. Prajapati vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada 4 adet manda izolatu incelenmiş ve izolatların tamamı serogrup B ve *fimA* geni yönünden pozitif olarak tanımlanmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında izolatlardaki *fimA* gen varlığı serogruplara göre incelendiğinde, genin serogrup A'da % 73,68 (n=14/19), serogrup E'de % 21,05 (n=4/19) ve serogruplandırılamayan izolatlarda % 50,00 (n=22/44) oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Serogrup B, D ve F'de yer alan izolatlar *fimA* geni açısından negatif bulunmuştur. İncelenen veriler ile bu tez çalışması sonucunda elde edilen veriler karşılaştırıldığında, *fimA* geninin serogruplar arası dağılımı açısından serogruplandırılamayan izolatlar için Khamesipour vd. (2014) tarafından bildirilen veriler haricinde, bu tez verileriyle uyumlu olmadığı belirlenmiştir. Serogrup A için bakıldığında oranların bu tez çalışmasında incelenen çalışmalara oldukça benzer ancak nispeten düşük bir şekilde seyrettiği görülmüştür. Ayrıca tez çalışması içerisinde yapılan istatistiksel analiz sonucunda, *fimA* geninin *P. multocida* serogrupları içerisinde anlamlı bir farklılık oluşturacak şekilde bulunup bulunmadığı test edilmiş ve anlamlı bir fark bulunmadığı gözlenmiştir ($p>0,1$).

P. multocida'nın siyalometabolizmasına dâhil olduğu varsayılan genler arasında *nanB*, *nanH* genleri bulunmaktadır. Bu genler sialik asit alımına yardımcı olan iki anahtar sialidaz NanB ve NanH proteinlerini kodlamaktadırlar (Peng et al., 2019). Sialidazlar olarak da adlandırılmakla beraber, ana konak reseptörlerinin daha da görünür ve kolay bağlanılır hale getirerek sadece bakteriyel virülensi arttırmakla kalmazlar, aynı zamanda müsin etkinliğini de azaltırlar. Bu sayede epitel yüzeyinin kolonizasyonunda aktif bir rol oynamaktadırlar (Sarangi vd., 2015). Sığır pnömoni kaynaklı 17 *P. multocida* izolatu kullanılarak Peng vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada *nanB* geni % 76,47 (n=13) oranında, *nanH* geni % 82,35 (n=14) oranında bulunmuştur. Jolley vd. (2018) tarafından tasarlanan internet sitesinde paylaşılan sekans verilerine göre, incelenen 3 izolat içerisinde *nanB* geni % 66,67 (n=2) oranında, *nanH* geni % 66,67 (n=2) oranında belirlenmiştir. Gharibi vd. (2017) tarafından 10

izolat ile yapılan bir çalışmada *nanB* geni % 60,00 (n=6) ve *nanH* geni % 90,00 (n=9) oranında tespit edilmiştir. Ewers vd. (2006) tarafından 104 izolat ile yapılan bir çalışmada, *nanB* geni % 100,00 (n=104) oranında, *nanH* geni % 88,46 (n=92) oranında saptanmıştır. Katsuda vd. (2013) tarafından 378 izolat ile yapılan bir çalışmada, *nanB* geni % 100,00 (n=378) ve *nanH* geni % 88,36 (n=334) oranında bulunmuştur. Khamesipour vd. (2014) tarafından 30 izolat ile yapılan bir çalışmada *nanB* geni % 83,33 (n=25) oranında, *nanH* geni % 80,00 (n=24) oranında belirlenmiştir. Jamali vd. (2014) tarafından 141 izolat ile yapılan bir çalışmada, *nanB* geni % 100,00 (n=141) oranında, *nanH* geni % 100,00 (n=141) oranında gözlenmiştir. Verma vd. (2013) tarafından 23 izolat ile yapılan bir çalışmada *nanB* geni % 0,00 (n=0) oranında, *nanH* geni % 100,00 (n=23) oranında tespit edilmiştir. Moğulkoç (2020) tarafından 9 izolat ile yapılan bir çalışmada *nanB* geni % 11,11 (n=1) oranında, *nanH* geni % 88,89 (n=8) oranında saptanmıştır. Abed vd. (2020) tarafından 5 izolat ile yapılan çalışmada *nanB* geni % 100,00 (n=5) oranında bulunmuştur. Prajapati vd. (2022) tarafından 3 izolat ile yapılan çalışmada *nanB* geni % 100,00 (n=3) ve *nanH* geni % 100,00 (n=3) oranında belirlenmiştir. Peng vd. (2021) tarafından 106 izolat ile yapılan çalışmada *nanB* geni % 98,11 (n=104) ve *nanH* geni % 95,28 (n=101) oranında saptanmıştır. Ujvária vd. (2019) tarafından 81 izolat ile yapılan bir çalışmada *nanH* geni % 100,00 (n=81) oranında tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra, Prajapati vd. (2020) tarafından 4 manda izolatu kullanılarak yapılan bir çalışmada *nanB* geni % 100,00 (n=4) oranında, *nanH* geni % 100,00 (n=4) oranında; Ewers vd. (2006) tarafından 7 manda izolatu kullanılarak yapılan bir çalışmada *nanB* geni % 100,00 (n=7) oranında, *nanH* geni % 100,00 (n=7) oranında ve Gharibi vd. (2017) tarafından 12 manda izolatu kullanılarak yapılan bir çalışmada *nanB* geni % 66,67 (n=8) oranında, *nanH* geni % 75,00 (n=9) oranında belirlenmiştir. Yapılan çalışmalara *nanB* ve *nanH* genleri açısından değerlendirildiğinde, gen varlığının % 0-100 arasında oldukça geniş bir yelpazede seyrettiği görülmektedir. Bu tez çalışmasında *nanB* geni % 30,70 oranında tespit edilmiş ve incelenen 15 çalışmanın 13'ündeki oranlardan daha az olduğu ve ülkemizde yapılan bir diğer çalışmanın da bu az oranda *nanB* tespit edilenler grubuna dâhil edilebileceği düşünülmüştür. İncelenen çalışmalarda ki *nanH* oranına bakıldığında, bu çalışmada % 51,09 oranında tespit edilen *nanH* gen varlığının incelenen 15 çalışmadan daha düşük oranda olduğu görülmüştür.

Gizli değişken modeli kullanılarak hazırlanan bir korelasyon tablosunda *nanH* geninin *pmHAS* ile arasında 0,95, *toxA* ile arasında 0,93, *ompH* ile arasında 0,89

birimlik pozitif bir ilişki bulunmuştur. Ancak *fur*, *fimA*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, *ompA*, *plpB*, *oma87* ile arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bir diğer nöraminidaz olan *nanB* geni ile *fimA*, *fur*, *nanH*, *nanB*, *pmHAS*, *sodA*, *toxA*, *sodC*, *ompH*, *ompA*, *plpB* ve *oma87* genleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Prajapati et al., 2020). Ewers vd. (2006) tarafından 289 izolata ait verilerin incelenmesi sonucu hazırlanan korelasyon tablosunda ise *nanB* ve *nanH* ile diğer virülens faktörleri arasında, *nanH-toxA* ikilisi haricinde anlamlı bir ilişki bulunamamıştır, ($p>0,05$). Yapılan inceleme sonucu bulunan *nanH-toxA* arası ilişki % 8,7 olarak hesaplanmıştır ($p<0,01$). Bu tez çalışmasında *nanB* geninin diğer genlerle olan ilişkisi incelendiğinde, *nanH* ile arasında 0,70, *oma87* ile arasında 0,40, *ompA* ile arasında 0,83, *ompH* ile arasında 0,30, *pmHAS* ile arasında 0,66, *sodA* ile arasında 0,32, *sodC* ile arasında 0,63 ve *tonB* ile arasında 0,68 birimlik pozitif yönde ve anlamlı bir korelasyon bulundu. *nanH* geninin diğer genlerle olan ilişkisi incelendiğinde *oma87* ile arasında 0,28, *ompA* ve *pmHAS* ile arasında 0,60, *sodA* ile arasında 0,22, *sodC* ile arasında 0,39, *tonB* ile arasında 0,34 birimlik pozitif yönde ve anlamlı bir korelasyon belirlendi. Bunun yanı sıra *nanB* ile *plpB* arasında, *nanH* ile *ompH* ve *plpB* arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı. Korelasyon oranları değerlendirildiğinde *nanH* ile *pmHAS* arasında Prajapati vd. (2020) tarafından bildirilen korelasyon oranı kadar yüksek olmasa da ortalama bir düzeyde korelasyon görüldü ve bu tezde bildirilen ile uyumlu olarak değerlendirildi. Ancak, *nanH-ompH* çifti korelasyon bakımından incelendiğinde, Prajapati vd. (2020) tarafından bildirilenin aksine bu tez çalışmasında anlamsız bulundu. Bunun yanı sıra her üç çalışmada da *nanH-plpB*, *nanB-plpB* arası ilişki anlamsız bulunmuştur. Ewers vd. (2006) tarafından bildirilen *nanH-toxA* ilişkisi, bu tez çalışmasında *toxA* hakkında yeterli veri toplanamaması nedeniyle hesaplanamadı ve dolayısıyla bir karşılaştırma yapılamadı.

Khamesipour vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada elde edilmiş izolatlardaki *nanB* gen varlığı serogruplara göre incelendiğinde serogrup A içerisinde % 82,61 ($n=19/23$), serogrup D içerisinde % 100,00 ($n=5/5$) ve serogruplandırılmayan izolatlar içerisinde % 50,00 ($n=1/2$) oranında bulunmuştur. Bu izolatlar *nanH* açısından serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 78,26 ($n=18/23$), serogrup D içerisinde % 80,00 ($n=4/5$) ve serogruplandırılmayan izolatlar içerisinde % 100,00 ($n=2/2$) oranında bulunmuştur. Verma vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, serogrup A ve B içerisindeki izolatların % 100'ünde *nanH* ve % 0 oranında *nanB* geni bildirilmiştir. Peng vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, *nanB* ve *nanH*

geni açısından 106 izolat incelenmiştir. Serogrup A'ya ait izolatların % 100,00'ü (n=74), serogrup B'ye ait izolatların % 100'ü (n=29), serogrup F'ye ait izolatların % 100'ü (n=1), serogruplandırılamayan izolatların ise % 0'ı (n=0) *nanB* pozitif bulunmuştur. Serogrup A'ya ait izolatların % 94,59'u (n=70), serogrup B'ye ait izolatların % 100'ü (n=29), serogrup F'ye ait izolatların % 100'ü (n=1) ve serogruplandırılamayan izolatların ise % 50'si (n=1) *nanH* pozitif olarak tespit edilmiştir. Ewers vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, birçok farklı türden izole edilen toplam 289 izolat incelenmiştir. Bu izolatlar içerisinde % 71,63 (n=207) serogrup A, % 3,46 (n=10) serogrup B, % 14,54 (n=42) serogrup D, % 2,42 (n=7) serogrup E ve % 2,42 (n=7) oranında serogrup F belirlenmiştir. Bununla birlikte izolatların % 5,54'ü (n=16) serogruplandırılamamıştır. Bu izolatlar içerisinde *nanB* geni tüm serogruplar içerisinde % 100 oranında tespit edilmiştir. *nanH* geni ise serogrup A içerisinde % 85 (n=176), serogrup B içerisinde % 100 (n=10), serogrup D içerisinde % 90,5 (n=38), serogrup E içerisinde % 100 (n=7), serogrup F içerisinde % 100 (n=7) oranında ve serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde % 87,5 (n=14) oranında saptanmıştır. Bu tez çalışmasında izolatlardaki *nanB* geni varlığı serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A'da % 100,00 (n=19/19), serogrup D'de % 40,00 (n=2/5), serogrup E'de % 10,53 (n=2/19), serogrup F'de % 100,0 (n=1/1) ve serogruplandırılamayan izolatlarda % 15,91 (n=7/44) oranında olduğu görüldü. Serogrup B izolatları ise *nanB* geni açısından negatif bulundu. İzolatlardaki *nanH* geni varlığı serogruplara göre incelendiğinde ise serogrup A'da % 100,00 (n=19/19), serogrup B'de % 25,00 (n=1/4), serogrup D'de % 40,00 (n=2/5), serogrup E'de % 21,05 (n=4/19), serogrup F'de % 100,0 (n=1/1) ve serogruplandırılamayan izolatlarda % 45,45 (n=20/44) oranında olduğu belirlendi.

İncelenen çalışmalar ve tez bulguları *nanB* geni açısından birlikte değerlendirildiğinde, serogrup A'ya ilişkin bulguların Peng vd. (2021) ve Ewers vd. (2006) ile uyumlu olduğu ve Khamesipour vd. (2014)'nin yaptığı çalışma bulgularının bunlara yakın olduğu ancak Verma vd. (2013) ile uyumsuz olduğu görüldü. Serogrup B izolatlarına ait bulguların Verma vd. (2013)'nin bulguları ile uyumlu olduğu ancak diğer iki çalışmada % 100 oranında bulunduğu görüldü. Serogrup D içerisinde karşılaştırıldığında Khamesipour vd. (2014) ve Ewers vd. (2006)'ne göre *nanB*'nin oldukça az oranda olduğu görüldü. Serogrup E içerisinde de Ewers vd. (2006)'ya göre oldukça az oranda olduğu ve Serogrup F içerisinde Verma vd. (2013) çalışması hariç her üç çalışmada da % 100 oranında olduğu ve bulguların uyduğu belirlendi.

Serogruplandırılamayan izolatlar bakıldığında ise Peng vd. (2021) çalışmasında genin % 0, Khamesipour vd. (2014)'de % 50 ve Ewers vd. (2006)'nin çalışmalarında ise % 100 oranında bulunduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında bulunan % 15,91'lik oranın her üçü ile de uyumlu olmadığı gözlemlendi. Bulgular *nanH* geni açısından birlikte değerlendirildiğinde bu tez çalışması da dâhil olmak üzere serogrup A içerisinde *nanH* geninin % 78-100 arası bir aralıkta bulunduğu görülmektedir ve bu tez çalışmasında bulunan oranlar literatür ile uyumludur. Serogrup B için bakıldığında bu tez çalışmasında *nanH* % 25 oranında bulundu, ancak diğer üç çalışmada *nanH* geninin % 100 oranında olduğu görülmektedir. Serogrup D ve E serogruplarındaki *nanH* geni varlığı bakımından Ewers vd. (2006) tarafından bildirilen sırasıyla % 90,5, % 100 oranları ve yalnızca serogrup D için Khamesipour vd. (2014) tarafından bildirilen % 80 oranı ile kıyaslanabildi. Bu tezde bulunan serogrup D ve E olmak üzere sırasıyla % 40 ve % 21,05 *nanH* gen varlığı oranlarının diğer literatür bulgularına oranla daha düşük olduğu görüldü. Serogrup F'ye bakıldığında, tez çalışmasında bulunan oranların Ewers vd. (2006) ve Peng vd. (2021) ile uyumlu olduğu görüldü. Serogruplandırılamayan izolatlar açısından Peng vd. (2021)'de bildirilen % 50 oranı ile bu tezde bulunan % 45,45 oranları uyumlu olmakla beraber Ewers vd. (2006) tarafından % 87,5, Khamesipour vd. (2014) tarafından bildirilen % 100 oranları ile uyumlu olmadığı belirlendi. Ayrıca yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu tez çalışmasında tespit edilen *nanB* ve *nanH* genlerinin serogruplar içerisindeki dağılım durumlarının istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ($p>0,1$).

Bazı bakteriler hücre dışısalına salgılanıp demiri şelatlayabilen, siderofor adı verilen küçük moleküller sentezler. Bazılarıysa hemoglobin, transferrin veya laktoferrin gibi demir bağlayıcı konak moleküller için spesifik reseptörler olarak hareket eden dış membran proteinleri sunar. Demirin bu sistemlerle bakteri hücresine taşınması, hem sitoplazmik hem de dış membranı birbirine bağlayan ve böylece bu işlem için gerekli enerjinin transferini sağlayan *tonB* geninin ürününü gerektirir. TonB proteinini stabilize eden bir iç zar bulunmakta ve bu iç zarda ExbB ve ExbD proteinleri yer almaktadır. Bu yapı tonB kutusu olarak da bilinmektedir ve iç zar proteinleri ile tonB proteini arasındaki etkileşimi sağlamaktadır. Demir yüklü moleküller dış membran reseptörlerine bağlandıktan sonra tonB üzerindeki gözeneklerde sağlanan bir değişiklik ile geçişi gerçekleştirilir ve proteinleriyle aynı isimdeki bu üç gen *P. multocida*'nın enfeksiyon mekanizmasında yer alan virülens için gerekli komponentler olup *fur* geni ile de oldukça yakından ilişkililerdir (Bosch et al., 2002a). Bununla

beraber, fazla demir hücreler için oldukça toksiktir. Demir, oksijen toksisitesini arttırıcı etkiye sahiptir. Çünkü demir metali, hidrojen peroksiti oldukça reaktif hidroksil radikaline dönüştüren Fenton reaksiyonunu etkili bir şekilde katalize etmektedir. Bu nedenle, demir alımı işlemi sırasında bakteriler, alınan oranı ayarlayarak ideal bir aralıkta dinamik bir iyon dengesi sağlarlar. Hücre içi demir konsantrasyonunun kesin regülasyonu, genellikle ferrik alım regülatörü ya da bir diğer adıyla Fur proteini aracılığıyla kontrol edilmektedir ve demir kazanım genleri ile yakından ilişkilidir (Liu et al., 2019). Pnömoni kaynaklı sığır orijinli *P. multocida* izolatlarında 17 izolat ile yapılan bir çalışmada Peng vd. (2019) tarafından *fur* geni % 100,00 (n=17) oranında bulunmuştur. Jolley vd. (2018) tarafından tasarlanan internet sitesinde paylaşılan sekans verilerine göre *fur* geni % 0,00 (n=0) ve *tonB* geni % 66,67 (n=2) oranında bildirilmiştir. Gharibi vd. (2017) tarafından 10 izolat ile yapılan çalışmada *tonB* geni % 90,00 (n=9) oranında tespit edilmiştir. Ewers vd. (2006) 104 izolat ile yaptıkları çalışmada *tonB* genini % 100,00 (n=104) oranında bildirilmişlerdir. Katsuda vd. (2013) tarafından 378 izolat ile yapılan çalışmada da *tonB* geni % 100,00 (n=378) oranında saptanmıştır. Aynı şekilde, Prajapati vd. (2022) *fur* ve *tonB* geni % 100,00 (n=3) oranında bildirilmiştir. Moğulkoç (2020) tarafından 9 izolat ile yapılan çalışmada da *tonB* geni % 100,00 (n=9) oranında bulunmuştur. Khamesipour vd. (2014) tarafından 30 izolat ile yapılan çalışmada ise *fur* ve *tonB* geni % 83,33 (n=25) oranında tespit edilmiştir. Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından 70 izolat ile yapılan bir çalışmada ise *tonB* geni % 35,71 (n=25) oranında belirlenmiştir. Peng vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada *fur* ve *tonB* geni % 99,06 (n=105) oranında bulunmuştur. Bunların yanı sıra, Prajapati vd. (2020) tarafından 4 manda izolatu ile yapılan çalışmada *fur* ve *tonB* geni % 100,00 (n=4) oranında bildirilmiştir. Ewers vd. (2006) tarafından 7 manda izolatu ile yapılan bir çalışmada *tonB* geni % 100,00 (n=7) oranında, Gharibi vd. (2017) tarafından 12 manda izolatu ile yapılan bir çalışmada ise % 91,67 (n=11) oranında rapor edilmiştir. Bu tez çalışmasında *fur* geni % 60,87 oranında bulundu ve bu oranın incelenen çalışmalardan düşük olduğu görüldü. Ayrıca *tonB* geni % 48,91 oranında bulundu ve bu oranının ülkemizde yapılmış bir diğer çalışmada bildirilen oranla (Sakmanoğlu et al., 2021) benzer olarak değerlendirildi.

Gizli değişken modeli kullanılarak hazırlanan korelasyon tablosunda *fur* ile *fimA*, *nanH*, *nanB*, *pmHAS*, *sodA*, *toxA*, *sodC*, *ompH*, *ompA*, *plpB* ve *oma87* genleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Prajapati et al., 2020). Ewers vd. (2006) tarafından 289 izolata ait verilerin incelenmesi sonucu hazırlanan korelasyon

tablosunda *tonB* geni ile diğer virülens genleri arasındaki korelasyonlar incelendiğinde, *tonB* ve *oma87* genleri arasında % 99,7'lik anlamlı bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir, ($p<0,01$). Bu çalışmada, *tonB*'nin diğer genlerle olan ilişkisi incelendiğinde *sodC* ile 0,48, *sodA* ile 0,41, *pmHAS* ile 0,49, *ompA* ile 0,67, *oma87* ile 0,29, *nanH* ile 0,35, *nanB* ile 0,68 ve *fur* ile 0,34 birimlik pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu saptandı. Aynı şekilde *fur* geni ile diğer genlerle arasındaki ilişki incelendiğinde, *fur* geni ile *tonB* arasında 0,34, *sodC* ile 0,25, *pmHAS* ile 0,46, *plpB* ile 0,36, *ompA* ile 0,38, *oma87* ile 0,23, *nanH* ile 0,24, *nanB* ile 0,29 birimlik pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu. Bildirilmiş olan ve elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, Prajapati vd. (2020) tarafından *tonB* ile *oma87* arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı, Ewers vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada ise çok güçlü bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan bu tezde diğer çalışmaların aksine zayıf derecede pozitif yönde anlamlı bir korelasyon saptandı ve diğer çalışmalar ile uyumlu olmadığı görüldü. Bunun yanı sıra bu tez çalışmasında anlamlı bulunan diğer bir çok korelasyon parametresi, incelenen çalışmalarda anlamsız olarak bildirilmiştir.

Ewers vd. (2006) tarafından yapılan çalışmadaki izolatların tamamı, *tonB* geni açısından bütün serogruplar içerisinde % 100 oranında tespit edilmiştir. Khamesipour vd. (2014)'nin çalışmasında, izolatlar *tonB* açısından serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 100,00 (n=23/23) ve serogrup D içerisinde % 0,00 (n=0/5) oranında, serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde ise % 100,00 (n=2/2) oranında bulunmuştur. Bu izolatlar *fur* açısından serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 82,61 (n=19/23) oranında ve serogrup D içerisinde % 100,00 (n=2/5) oranında, serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde % 50,00 (n=1/2) oranında belirlenmiştir. Peng vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada da serogrup A'ya ait izolatların % 99,46'sı, serogrup B'ye ait izolatların % 100'ü, serogrup D'ye ait izolatların % 100'ü, serogrup F'ye ait izolatların % 100'ü, serogruplandırılamayan izolatların ise % 85,71'i *tonB* geni açısından pozitif bulunmuştur. Çalışmadaki izolatların tamamı *fur* geni açısından % 95,42 oranında pozitif olarak rapor edilmiştir. Serogrup A'ya ait izolatların % 96,20'si, serogrup B'ye ait izolatların % 100'ü, serogrup D'ye ait izolatların % 89,29'u, serogrup F'ye ait izolatların % 100'ü, serogruplandırılamayan izolatların ise % 71,43'ü *fur* geni bakımından pozitif bulunmuştur. Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada *tonB* geninin serogruplar içerisinde dağılımına bakıldığında, serogrup A'da % 32,65 oranında, serogrup B'de % 75,00 oranında, serogrup D'de % 100,00 oranında,

serogrup E’de % 0,00 oranında ve serogruplandırılamayan izolatlar içerisinde ise % 29,41 oranında tespit edilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında izolatlardaki *fur* geni varlığı serogruplara göre incelendiğinde serogrup A’da % 100,00 oranında, serogrup B’de % 75,00 oranında, serogrup D’de % 80,00, serogrup E’de % 68,42 ve serogruplandırılamayan izolatlarda % 38,64 oranında olduğu görüldü. Serogrup F ise *fur* geni açısından negatif bulundu. İzolatlardaki *tonB* geni serogruplara göre incelendiğinde serogrup A’da % 100,00, serogrup B’de % 50,00, serogrup D’de % 60,00, serogrup E’de % 42,11, serogrup F’de % 100,00 ve serogruplandırılamayan izolatlarda % 27,27 oranında olduğu görüldü.

İncelenen çalışmalar ve tez bulguları *tonB* geni açısından birlikte değerlendirildiğinde, serogrup A içerisinde Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından yapılan çalışma haricinde, diğer üç çalışmanın tamamında da % 99,5-100 oranlarında bildirilmiş ve bu tez çalışmasının bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür. *tonB* geninin, serogrup B ve serogrup D içerisinde Ewers vd. (2006), Peng vd. (2021) ve Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından yapılan çalışmaların aksine daha düşük oranda olduğu belirlenmiştir. Serogrup E içerisinde bu tez çalışmasında bulunan oran Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından bulunan oranın aksine daha yüksek, Ewers vd. (2006) tarafından bulunan oranın aksine daha düşük bulunmakla beraber, serogrup F içerisinde bu tez çalışmasında bulunan oran, Peng vd. (2021) tarafından bildirilen ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Serogruplandırılamayan izolatlar tarafından oluşturulan gruptan elde edilen oran ise Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından bulunan oran ile uyumlu bulunmuş, fakat diğer dört çalışmada bildirilen % 85-100 arasında seyreden oranlar ile uyumlu olmadığı belirlenmiştir.

İncelenen çalışmalar ve tez bulguları *fur* geni açısından birlikte değerlendirildiğinde, serogrup A, B, D ve serogruplandırılamayan izolatlar bakımından incelenen diğer literatür çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Serogrup E için yeterli veri bulunmadığından ötürü karşılaştırma yapılamamış, serogrup F için ise Peng vd. (2021) tarafından bildirilen oran ile uyumlu olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu tez içerisinde elde edilen *fur* geni serogruplar içerisindeki dağılım durumunun istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunmuştur ($p>0,1$). Aynı şekilde *tonB* geni incelendiğinde serogrup A ($p<0,05$) ve serogruplandırılamayan izolatlar ($p=0,007$) açısından grup içi dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Hiyalüronan sentaz olarak da bilinen PmHAS, genellikle serogrup A'nın kapsüler materyali olan hiyalüronik asit oluşumunda, değişen d-glukuronik asit ve N-asetil-d-glukozamin birimlerini transfer eden çift etkili bir sentazdır (Furian et al., 2016). Ayrıca, pmHAS proteini bakteri kapsülünü oluşturur. Moleküler etkileşimlerde ve sinyalleşmede çok önemli bir rol oynar ve *pmHAS* geni tarafından kodlanmaktadır (Jing and DeAngelis, 2003). Prajapati vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada % 0,00 (n=0/3), Peng vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada % 29,41 (n=5/17), Khamesipour vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada % 33,33 (n=10/33), Peng vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada % 70,75 (n=75/106), Katsuda vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada % 92,59 (n=350/378) ve Jolley vd. (2018) tarafından tasarlanan internet sitesinde paylaşılan sekans verilerine göre incelenen 3 izolat içerisinde % 100,00 (n=3/3) oranında *pmHAS* geni bulunmuştur. Bunların yanı sıra Prajapati vd. (2020) tarafından 3 manda izolatu kullanılarak yapılan bir çalışmada da % 0,00 (n=0/3) oranında *pmHAS* geni rapor edilmiştir. Ülkemize dair bir veriye rastlanmamış olup, bu tez çalışmasında % 35,87 (n=33) oranında *pmHAS* geni belirlenmiştir. Bu oran Khamesipour vd. (2014) ve Peng vd. (2019)'nin çalışma bulgularına benzerlik göstermektedir.

Gizli değişken modeli kullanılarak hazırlanan korelasyon tablosunda *pmHAS* geni ile *nanH* geni arasında 0,95, *tox*A geni arasında 0,96, *ompH* geni arasında 0,87 ve *plpB* geni arasında 0,64 birimlik pozitif bir ilişki bulunmuştur. Ancak *fimA*, *fur*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, *ompA* ve *oma87* genleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Prajapati et al., 2020).Yapılan bu tez çalışmasında, *pmHAS* geni ile diğer virülens genleri arasındaki korelasyonlar incelendiğinde, *pmHAS* ile *tonB* arasında 0,48, *sodC* arasında 0,45, *ompH* ile arasında 0,27, *ompA* ile arasında 0,74, *oma87* ile arasında 0,38, *nanH* ile arasında 0,60, *nanB* ile arasında 0,67, *fur* ile arasında 0,46, *fimA* ile arasında 0,40 birimlik pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki saptandı. Bu tez çalışmasından elde edilen *pmHAS*'a dair korelasyon bulguları Prajapati vd. (2020) tarafından bildirilenler ile kıyaslandığında *nanH* ile her iki çalışmada da pozitif yönde bir ilişki bulunduğu saptandı. Ancak, korelasyonu derecesi bu tez çalışmasında yüksek düzeyde bulunurken, Prajapati vd. (2020) tarafından çok yüksek düzeyde ilişkili olduğu bildirilmiştir. *pmHAS-ompH* genleri arasında bu tez çalışmasında zayıf düzeyde ilişki saptanırken, Prajapati vd. (2020) tarafından çok yüksek düzeyde ilişki bildirilmiştir. *PmHAS-plpB* genleri arasında bu tez çalışmasında anlamsız ilişki saptanırken, Prajapati vd. (2020) tarafından yüksek düzeyde ilişki bildirilmiştir.

pmHAS geni ile serogruplar arasındaki ilişki Peng vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada sığır, domuz, koyun, keçi gibi çeşitli canlılardan elde edilmiş 262 izolat için incelenmiştir. Çalışmadaki isolatların tamamı *pmHAS* geni açısından % 72,52 (n=190) oranında pozitif bulunmuştur. Serogrup A'ya ait isolatların % 98,91'i (n=182/184), serogrup B'ye ait isolatların % 0'ı (n=0/33), serogrup D'ye ait isolatların % 0'ı (n=0/28), serogrup F'ye ait isolatların % 80'i (n=8/10), serogruplandırılamayan isolatların ise % 0'ı (n=0/7) *pmHAS* geni açısından pozitif olarak belirlenmiştir. Yalnızca sığırlardan elde edilen isolatlar değerlendirildiğinde *pmHAS* pozitifliği % 70,75 olarak bildirilmiştir. Serogrup A'ya ait isolatların % 100,00'ü (n=74/74), serogrup B'ye ait isolatların % 0'ı (n=0/29), serogrup F'ye ait isolatların % 100,00'ü (n=1/1), serogruplandırılamayan isolatların ise % 0'ı (n=0/2) *pmHAS* geni açısından pozitif bulunmuştur. Khamesipour vd. (2014) tarafından yapılan çalışmanın isolatları serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisindeki isolatların % 34,78'inde ve serogrup D içerisindeki isolatların % 40,0'ında *pmHAS* geni rapor edilmiştir. Serogruplandırılamayan isolatlar içerisinde *pmHAS* geni bulunamamıştır. Yapılan bu tez çalışmasında, isolatlardaki *pmHAS* geni serogruplara göre incelendiğinde serogrup A'da % 100,00, serogrup D'de % 20,00, serogrup E'de % 15,79 ve serogruplandırılamayan isolatlarda % 22,73 oranında olduğu görüldü. Serogrup F ve B ise *pmHAS* geni açısından negatif bulundu.

İncelenen çalışmalar ve tez bulguları *pmHAS* geni açısından birlikte değerlendirildiğinde, serogrup A içerisinde Khamesipour vd. (2014) tarafından bildirilen oran ile uyumlu olmadığı, fakat Peng vd. (2021) tarafından bildirilen hem çeşitli hayvanlardan elde edilen isolatların oranı ile hem de yalnızca sığır isolatlarından elde edilen oran ile uyumlu olduğu görüldü. Serogrup B, E ve serogruplandırılamayan isolatlar açısından incelenen çalışmaların hiçbirisinde *pmHAS* geni bildirilmediği görülmektedir. Serogrup D içerisinde bulunan *pmHAS* geni oranı ise Khamesipour vd. (2014) tarafından bildirilen ile paralel seyrederken, serogrup F içerisinde bulunan *pmHAS* geni oranı ile Peng vd. (2021) tarafından bildirilen oran uyumlu bulunmadı. Ayrıca tez çalışması içerisinde yapılan istatistiksel analiz sonucunda *pmHAS* geninin *P. multocida* serogrupları içerisinde anlamlı bir farklılık oluşturacak şekilde bulunup bulunmadığı test edildi ve anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($p>0,1$).

Süperoksit dismutazlar olan *sodA* ve *sodC*, normalde hücrelerde üretilen ve biyolojik sistemler için toksik olan süperoksit anyon radikallerini yok ederler. *SodA*,

demir/mangan süperoksit dismutaz ailesine, *sodC* ise bakır-çinko süperoksit dismutaz ailesine aittir (Szklarczyk et al., 2023). Oksidatif stres tepkisinde ve oksidatif strese karşı korunmada önemlidirler (Kroll et al., 1995). Peng vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada pnömoni kaynaklı sığır orijinli *P. multocida* izolatlarında *sodA* geni % 94,12 (n=16) oranında ve *sodC* geni % 82,35 (n=14) oranında saptanmıştır. Jolley vd. (2018) tarafından tasarlanan internet sitesinde paylaşılan sekans verilerinde *sodA* geni % 66,67 (n=2) oranında, *sodC* geni % 66,67 (n=2) oranında bildirilmiştir. Gharibi vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada *tonB* geni % 60,00 (n=6) oranında rapor edilmiştir. Ewers vd. (2006) tarafından 104 izolat ile yapılan bir çalışmada da *sodA* ve *sodC* geni % 100,00 (n=104) oranında belirlenmiştir. Katsuda vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada *sodA* ve *sodC* geni % 100,00 (n=378) oranında bildirilmiştir. Khamesipour vd. (2014) tarafından 30 izolat ile yapılan bir çalışmada *sodA* geni % 83,33 (n=25) oranında ve *sodC* geni % 86,67 (n=26) oranında bulunmuştur. Verma vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada *sodA* geni % 39,13 (n=9) oranında ve *sodC* geni % 91,30 (n=21) oranında tespit edilmiştir. Prajapati vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada *sodA* ve *sodC* geni % 100,00 (n=3) oranında belirlenmiştir. Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından ülkemizde 70 izolat ile yapılan çalışmada *tonB* geni % 35,71 (n=25) oranında rapor edilmiştir. Peng vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada *sodA* ve *sodC* geni % 99,06 (n=105) oranında bulunmuştur. Bunların yanı sıra, Prajapati vd. (2020) tarafından 4 manda izolat ile yapılan bir çalışmada *sodA* ve *sodC* geni % 100,00 (n=4) oranında belirlenmiştir. Ewers vd. (2006) tarafından 7 manda izolatu ile yapılan bir çalışmada da *sodA* ve *sodC* geni % 100,00 (n=7) oranında bulunmuştur. Gharibi vd. (2017) tarafından 12 manda izolatu ile yapılan bir çalışmada *sodA* geni % 66,67 (n=8) oranında ve *sodC* geni % 100,00 (n=12) oranında rapor edilmiştir. Bu tez çalışmasında *sodA* geni % 78,26 oranında tespit edildi ve bu açıdan incelenen diğer çalışmalar göz önüne alındığında, ortalama bir oranda olduğu kanısına varıldı. Bu çalışmada ayrıca *sodC* geni % 48,91 oranında bulundu ve bu geninin diğer çalışmalardan daha düşük bir oranda bulunduğu görüldü.

Gizli değişken modeli kullanılarak hazırlanan korelasyon tablosunda *sodA* ve *sodC* genleri ile *fimA*, *fur*, *nanH*, *nanB*, *pmHAS*, *toxA*, *ompH*, *ompA*, *plpB* ve *oma87* ile arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Prajapati vd., 2020). Ewers vd. (2006) tarafından 289 izolata ait verilerin incelenmesi sonucu hazırlanan korelasyon tablosunda da *sodA* ile *ompH*, *oma87*, *nanB*, *nanH*, *toxA*, *tonB*, *sodC* arasında anlamlı bir korelasyon ilişkisi belirlenmemiştir, ($p>0,05$). Benzer şekilde, *sodC* ile *ompH*,

oma87, *nanB*, *nanH*, *toxA*, *tonB*, *sodA* arasında anlamlı bir korelasyon ilişkisi bulunamamıştır, ($p>0,05$). Yapılan bu tez çalışmasında *sodA* ve *sodC* genleri ile diğer virülens genleri arasındaki korelasyonlar incelendiğinde, *sodA* geni *tonB* ile arasında 0,41, *ompA* ile arasında 0,35, *nanH* ile arasında 0,22, *nanB* ile arasında 0,32, *fimA* ile arasında 0,35 birimlik pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki saptanırken; *sodC* geni *tonB* ile arasında 0,48, *pmHAS* ile arasında 0,45, *ompH* ile arasında 0,27, *ompA* ile arasında 0,63, *oma87* ile arasında 0,29, *nanH* ile arasında 0,40, *nanB* ile arasında 0,64, *fur* ile arasında 0,25 birimlik pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki belirlendi. Tez çalışmasındaki korelasyon bulgularının aksine Ewers vd. (2006) ve Prajapati vd. (2020) tarafından yapılan çalışmalarda *sodA* ve *sodC* genleri için anlamlı bir korelasyon bildirilmemiştir ve bu açıdan bulgular ile uyumsuz olarak değerlendirilmiştir.

Verma vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, serogrup A izolatlarının % 50'sinde *sodA* ve *sodC*, serogrup B içerisindeki izolatların ise % 39,84'ünde *sodA* ve % 100 *sodC* geni varlığını bildirilmiştir. Khamesipour vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada izolatlar *sodA* açısından serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 100,00, serogrup D içerisinde % 40,00 ve serogruplandırılmayan izolatlar içerisinde % 0,00 oranında bulunmuştur. Bu izolatlar *sodC* açısından serogruplara göre incelendiğinde, serogrup A içerisinde % 100,00 ve serogrup D içerisinde % 60,00 oranında bulunmasına rağmen serogruplandırılmayan izolatlar içerisinde bulunamamıştır. Yapılan bu tez çalışmasında izolatlardaki *sodA* geni serogruplara göre incelendiğinde serogrup A'da % 100,00, serogrup B'de % 25,00, serogrup D'de % 100,00 oranında, serogrup E'de % 73,68, serogrup F'de % 100,00 ve serogruplandırılmayan izolatlarda % 72,73 oranında olduğu görüldü. İzolatlardaki *sodC* geni serogruplara göre incelendiğinde ise serogrup A'da % 94,74, serogrup B'de % 75,00, serogrup D'de % 60,00, serogrup E'de % 26,32, serogrup F'de % 100,00 oranında ve serogruplandırılmayan izolatlarda % 48,91 oranında olduğu belirlendi. İncelenen çalışmalar ve tez bulguları *sodA* ve *sodC* genleri açısından birlikte değerlendirildiğinde, serogrup A içerisinde bu tez çalışmasında bulunan veriler her iki gen için de Khamesipour vd. (2014) tarafından bulunan oran ile uyumlu ancak Verma vd. (2013) tarafından bildirilen oran ile uyumlu olmadığı tespit edildi. Serogrup B için bakıldığında hem *sodA* hem de *sodC* genleri için bulunan oran Verma vd. (2013) tarafından bildirilen ile uyumlu görülür iken, serogrup D için bakıldığında Khamesipour vd. (2014) tarafından bildirilen oran, bu tez çalışmasında bulunan oran ile *sodA* geni için uyumlu olmayıp *sodC* geni açısından aynı oran belirlendi. Serogrup

E ve F açısından karşılaştırma yapılamadı. Serogruplandırılmayan izolatlar değerlendirildiğinde ise Khamesipour vd. (2014) her iki geni de satayamamış ve bu tez çalışmasında kısmen yüksek oranlar bulunmuştur. Ayrıca, yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu tez içerisinde elde edilen *sodC* geni serogruplar içerisindeki dağılım durumunun istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ($p>0,1$). Aynı şekilde *sodA* geni incelendiğinde serogrup E açısından grup içi dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,01$).

P. multocida'nın 146-kDa'lık tek zincirli G-proteini-deamidasyon toksini (PMT) *toxA* geni tarafından kodlanmaktadır. Domuzlarda progresif atrofik rinite neden olan *toxA* geni pozitif *P. multocida* izolatları, genellikle serogrup D ile ilişkilendirilmektedir. Patojen olarak *toxA* geni taşıyan *P. multocida* izolatları insan, koyun ve keçiler gibi birçok farklı konakta bildirilmiş ve nazal akıntı ile birlikte seyrettiği vurgulanmıştır. Vakalarda genellikle nazal akıntı görülüyor olmasının pnömoni ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Einarsdottir et al., 2016; Cid et al., 2019). Progresif atrofik rinit vakası bulunan bir domuzdan elde edilmiş toksijenik *P. multocida* izolatı kullanılarak yapılan sekans analizi çalışması sonucunda *toxA* geninin bir tRNA genine (tRNA^{Trp}) bitişik korunmuş bir profaj üzerinde yer aldığı görülmüştür. Bu fajın mitomisin C kullanılarak uyarılması sonucunda *Siphoviridae* familyasına ait fajlara benzer morfolojik özellikler gösterdiği ortaya koyulmuştur (Pullinger et al., 2004). Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, PMT toksininin regülasyonu ve dışarı salınımı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır ancak spekülasyon seviyesinde konak enfeksiyonu sırasında karşılaşılan çevresel faktörlerin neden olduğu bakteriyel yanıtın, fajın litik döngüsünün uyarılmasına yol açabileceği düşünülmektedir. Bu uyarım sonucunda da bakteriyel hücre lizisi ve toksin salınımının gerçekleştiği düşünülmektedir (Pullinger et al., 2004; Peng et al., 2019).

Pnömoni kaynaklı sığır orijinli *P. multocida* izolatları kullanılarak yapılan ve Jolley vd. (2018) tarafından tasarlanan internet sitesinde paylaşılan sekans verilerine göre *toxA* geni % 0,00 (n=0) oranında bulunmuştur. Gharibi vd. (2017) tarafından 10 izolat ile yapılan bir çalışmada *toxA* geni % 20,00 (n=2) oranında rapor edilmiştir. Ewers vd. (2006) tarafından 104 izolat ile yapılan çalışmada *toxA* geni % 5,77 (n=6) oranında bildirilmiştir. Khamesipour vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada *toxA* geni % 10,00 (n=3) oranında tespit edilmiştir. Verma vd. (2013), Ewers vd. (2006), Ujvária vd. (2019), Peng vd. (2021) ve Prajapati vd. (2022) tarafından yapılan çalışmalarda *toxA* geni saptanamamıştır. Moğulkoç (2020) tarafından yapılan

çalışmada da *toxA* geni % 11,11 (n=1) oranında bildirilmiştir. Abed vd. (2020) tarafından 5 izolat ile yapılan çalışmada ise *toxA* geni % 100,00 (n=5) oranında rapor edilmiştir. Sakmanoğlu vd. (2021) tarafından 70 izolat ile yapılan çalışmada *toxA* geni % 2,86 (n=2) oranında tespit edilmiştir. Gharibi vd. (2017) tarafından 12 adet manda izolatu ile yapılan bir çalışmada da % 25,00 (n=3) oranında *toxA* geni belirlenmiştir. Yapılan çalışmalara *toxA* genleri açısından bakıldığında gen varlığının % 0-100 arasında oldukça geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir. Ancak, yalnızca sığır popülasyonundan elde edilmiş izolatların kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde, bu çalışmalardan 14'ünden 8'inde gen varlığının % 0 oranında bildirildiği görülmektedir. Ülkemizden 2 çalışmanın da olduğu toplam 4 çalışmada ise bu oranın % 2-10 arasında seyrettiği görülmektedir. Bunlar haricinde yalnızca iki çalışmada % 20 ve % 100 oranında *toxA* geni varlığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da *toxA* geni bulunamadı. Bu açıdan dünya genelinde yapılan araştırmaların çoğunluğuna benzemektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalar oran olarak değil de sayı bazında değerlendirildiği takdirde, sayı olarak oldukça az olmaları nedeniyle bu tez çalışmasında elde edilen sonuçtan çok da farklı olmadıkları düşünülmektedir.

Gizli değişken modeli kullanılarak hazırlanan korelasyon tablosunda *toxA* geninin *nanH* ile arasında 0,93, *pmHAS* ile arasında 0,96, *ompH* ile arasında 0,95, *plpB* ile arasında 0,80 birimlik pozitif bir ilişki bulunmuştur. Ancak *fur*, *fimA*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, *ompA* ve *oma87* ile arasında anlamlı bir ilişki belirlenememiştir (Prajapati vd., 2020). Bu tez çalışmasından elde edilen izolatlar arasında *toxA* geni bulunamadı. Bu yüzden diğer virülens genleri ile *toxA* geni arasında anlamlı ya da anlamsız bir korelasyon verisi elde edilemedi. Aynı şekilde, serogruplar arası karşılaştırma da yapılamadı.

Tez çalışmasında elde edilen izolatlar serogruplandırılarak bu serogruplar içindeki izolatlar arasında çeşitli virülens genlerinin ne oranda bulunduğu belirlendi. Serogruplar arasındaki söz konusu virülens genlerini içermeleri yönünden farklılık, istatistiksel olarak değerlendirildi. Buna göre, serogrup A içinde gruplandırılan izolatların toplam virülens genleri sayısı bakımından, diğer bazı serogruplardan farklı olduğu ve Şekil 5.30'da da görülebileceği üzere daha fazla virülens geni barındırdığı ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya konuldu ($p < 0,01$). Benzer şekilde serogruplar arasında, izolatların gösterdikleri antibiyotik direnç profilleri yönünden değerlendirme yapıldığında, antibiyotik direnci bakımından serogruplar

arası bir farklılık bulunmadığı veya bazı serogruplardaki izolat sayısının az olması nedeniyle incelenen bu durumun istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü.

İnfeksiyöz hastalıkların patogeneğinde mikroorganizmaların vejetatif/planktonik formlarının yanı sıra biyofilm yapıları da önemli rol oynamaktadır. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarının görülme sıklığında görülen artışlar, biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik araştırmalara ilgiyi arttırmıştır. Biyofilm oluşumunun engellenmesi ve antibakteriyel direnç mekanizmalarının anlaşılması için biyofilm oluşumunun belirlenmesi önemlidir. Günümüzde gelişen teknolojinin yardımıyla biyofilm oluşumunu saptamada çok sayıda farklı *in vitro* yöntemden ve deney hayvanlarında biyofilm enfeksiyonu oluşturulmasına dayalı *in vivo* yöntemlerden faydalanılmaktadır. CRA, tüp aderens, Christensen ve mikropalak yöntemleri biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar *P. multocida*'nın da biyofilm üretebildiğini ve bu özellikteki suşların sığır solunum yolu hastalığında rol aldığını desteklemektedir (Ross, 2006; Petruzzi et al., 2020). Biyofilmin konakçıda *P. multocida*'nın hayatta kalabilmesi açısından önemli bir virülens faktörü olduğu düşünülmektedir (Rajagopal et al. 2013). Bununla birlikte *P. multocida*'nın biyofilm üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar sayıca azdır ve biyofilm oluşturma kabiliyeti ile bakterinin patojenitesi veya virülensi hakkında kıyaslama yapılmamıştır. Petruzzi vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada *P. multocida* suşlarında kapsüler polisakkarit üretimi ile *in vitro* biyofilm üretiminin ters ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, yüksek oranda mukoid olup zayıf biyofilm oluşturan suşlar bile, kapsüler polisakkarit kaybıyla veya biyofilm oluşturma koşulları altındaki *in vitro* pasajları takiben bol miktarda biyofilm oluşturabilir. Bu nedenle, *P. multocida* ile taşıyıcılık durumu veya subklinik kronik enfeksiyonlar, eş zamanlı gelişmiş biyofilm oluşumu ile birlikte kapsüler polisakkaritin aşağı regülasyonundan kaynaklanabilir. Boukhail ve Czuprynski (2018) tarafından yapılan araştırmada, *M. haemolytica* ve *P. multocida*'nın bağımsız olarak sığır bronşiyal epitel hücrelerinde biyofilm oluşturabildiği, ancak birlikte bulundukları durumda karşılıklı olarak birbirlerinin biyofilmlerini inhibe ettikleri ortaya konulmuştur. Bu durum epitelyal yüzeyde *M. haemolytica* ve *P. multocida*'nın birbirine yakın kolonize oldukları durumda birbirlerini mutualistik olarak etkilediklerini düşündürmüştür (Boukahil and Czuprynski, 2018). Prajapati vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, manda, koyun, keçi, domuz ve tavşan gibi farklı orijinlerden elde edilmiş 41 *P. multocida* suşu

biyofilm üretimi ve antibiyotik dirençliliği bakımından incelenmiştir. Biyofilm oluşturma seviyeleri değerlendirildiğinde izolatlar, güçlü biyofilm oluşturan grup (% 22), orta seviyeli biyofilm oluşturan grup (% 19), zayıf düzeyde biyofilm oluşturan grup (% 51) ve non-aderent grup (% 7) şeklinde sınıflandırılmıştır. Serogrup A veya B'ye ait suşlar belirgin miktarda biyofilm oluşumu gösterirken, serogrup D'ye ait suşların biyofilm oluşumu göstermediği bildirilmiştir.

Mukozal yüzeylerdeki kolonizasyon süreci düşünüldüğünde, *in vivo* enfeksiyon esnasında *P. multocida* mikroaerofilik ortam şartlarıyla karşılaşması nedeniyle *in vivo* ortamda *P. multocida*'nın biyofilm oluşturmaabilmesi için % 10 CO₂'in gerekli olduğu bildirilmiştir (Olson et al., 2002). Ancak, yapılan bir çalışmada mikroaerofilik (% 5 CO₂) ortam sağlanmış koşullarda biyofilm oluşumunda önem teşkil eden herhangi bir değişiklik oluşmadığı saptanmıştır (Prajapati et al., 2020). Bununla beraber, biyofilm üretiminin ortam koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir. Kongo Kırmızısı eklenmiş BHI'da % 21 civarında biyofilm oluşumu gösteren izolatlarda, besi yerine % 1 glikoz eklenmesi ile birlikte bu oranın % 27'ye ve % 1 glikoz eklenmiş BHI'nin % 5 CO₂ içeren ortam şartlarında inkübe edildiği durumda ise % 29'a kadar çıktığı saptanmıştır. Bir diğer çalışmada (Kandimalla et al., 2022), hemorajik sepsis nedeniyle ölmüş mandalardan izole edilen *P. multocida* suşlarında biyofilm oluşumunu *in vitro* olarak saptamak için % 5 sükröz içeren % 0,08'lik Kongo Kırmızılı Agar hazırlanmıştır. Çalışmada elde edilen izolatların % 50'sinin biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Boianovskiy vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada da klinik olarak sağlıklı ve hastalıklı çeşitli hayvanlardan (tavşan, domuz, kedi ve köpek) 50 adet örnekleme yapılmış ve 11 adet *P. multocida* izole edilmiştir. Değerlendirme sonucunda 1 (% 9,1) izolatın yüksek, 3 (% 27,3) izolatın orta, 7 (% 63,6) izolatın ise düşük olmak üzere bütün suşların (% 100) biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Saha vd. (2021) tarafından yapılan araştırmada ise kanatlı kolerası şüpheli tavuklardan izole edilen *P. multocida* suşlarının biyofilm oluşturma kabiliyetleri polistiren pleyt ile kristal viyole boyama yöntemi uygulanarak test edilmiştir. Çalışmada elde edilen suşlarının % 81,82'sinin biyofilm üretme kabiliyetine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunlar da kendi arasında kategorize edildiğinde güçlü biyofilm oluşturan grup % 36,37, orta seviyeli biyofilm oluşturan grup % 27,27 ve zayıf biyofilm oluşturan grup % 18,18 olarak bulunmuştur. Ayrıca izolatların % 18,18'inin biyofilm oluşturmadığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra güçlü biyofilm oluşturan suşların orta ve zayıf seviyeli biyofilm oluşturan suşlara göre

daha yüksek oranda antibiyotik direnci gösterdiğini bildirmişlerdir (Saha et al., 2021). Petruzzi vd. (2020) yaptıkları çalışmada, *P. multocida* ve *H. somni*'nin *in vivo* ve *in vitro* polimikrobiyal biyofilm içerisindeki etkileşimini incelemişlerdir. İki bakterinin biyofilm içerisindeki etkileşiminin niceliği ve karakterizasyonu Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniğiyle belirlenmiştir. Her türe ait biyofilm matriksleri, ekzopolisakkarit (EPS)'lere özel floresanla işaretlenmiş lektin (FTL) kullanan konfokal lazer tarama mikroskobu aracılığıyla incelenmiş ve bakteriyel etkileşimleri belirlemek amacıyla otoagregasyon ve biyofilm morfolojisi dikkate alınmıştır. *P. multocida* ve *H. somni*'nin *in vitro* biyofilm içerisinde eşit derecede bulundukları ve polimikrobiyal biyofilm matriksine her iki bakterinin de katkı sağladığı saptanmıştır. Araştırmacılar, biyofilmin total protein ve karbonhidrat içeriğinin, ortalama biyokütlesinin ve biyofilm kalınlığının her iki bakterinin de birlikte olduğu durumda en fazla olduğunu belirlemişler ve tek bakteri türü süspansiyonu ile polimikrobiyal bakteri süspansiyonunu karşılaştırdıklarında, bakteri süspansiyonlarının bakterilerin birlikte olmadığı durumlarda daha hızlı şekilde otoagregasyon olduklarını, bu nedenden ötürü de iki türden bakterinin bulunduğu durumda bir tür fiziksel etkileşim olabileceğini rapor etmişlerdir. Tek tür tarafından oluşturulan biyofilm organizasyonuna kıyasla, bakterilerin bir polimikrobiyal biyofilm içinde olduğu durumda, yaklaşık 300 *P. multocida* geninin oldukça farklı şekilde regüle olduğu, RNA-sekanslaması yöntemi kullanılarak ortaya konulmuştur. Tek başlarına tam bir biyofilm oluşumu şekillendiremeyen kapsüllü *P. multocida* izolatlarının, *H. somni* ile birlikte *in vitro* polimikrobiyal biyofilm oluşumunu güçlendirmesi, polimikrobiyal biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Kapsüllü *P. multocida* izolatlarının *in vivo* polimikrobiyal biyofilm oluşumunu güçlendirdiğine dair dolaylı kanıtlar da bulunmaktadır. *H. somni* ile yapılan epruvasyonun ardından sığır dokularının FTL boyamasıyla yalnızca *H. somni* EPS'si saptanabilmiştir. Her iki tür sığır akciğerlerinden izole edebilmiş, her iki türün biyofilm matriksine karşı oluşan immün yanıtın, planktonik hücrelere karşı oluşan immün yanıtın oldukça büyük olduğu belirlenmiştir. Bu da kapsüllü *P. multocida*'nın kronik BRD sırasında konak içerisinde kalıcı olabilmek için *H. somni* biyofilminden yararlanıyor olabileceğini düşündürmüştür (Petruzzi et al., 2020).

Tez çalışmasında *P. multocida* izolatlarının biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak CRA yöntemi ile incelendi ve bu izolatların % 55,4'ü CRA yöntemi ile biyofilm oluşturma özelliği yönünden pozitif bulundu. Literatür taramasında

belirlenen sınırlı sayıdaki çalışmada, *P. multocida* izolatları arasındaki biyofilm oluşum oranları % 21-100 arasında değişkenlik göstermektedir. Çalışmada biyofilm üretiminin serogruplar arasındaki farklılıkları da ortaya konmuş olup, Serogrup A-E içerisinde yer alanlar ile beraber serogruplandırılamayan izolatların sırasıyla % 47,37, % 75,00, % 100, % 36,84 ve % 63,64 oranında biyofilm oluşturduğu ve serogrup F içerisinde bulunan bir adet izolatın ise biyofilm üretimi yönünden negatif olduğu belirlendi. Bununla beraber, biyofilm oluşturma kabiliyeti açısından serogruplar arası dağılımın serogrup E haricinde istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulundu ($p>0.05$). Bu tez çalışmasında tespit edilen biyofilm oluşturma oranı, literatürde bildirilen oranların ortalamalarında yer almaktadır. Bu durum biyofilm oluşumunun çeşitli faktörler tarafından etkilendiğini düşündürmektedir. Bu faktörler Tablo 5.20'de de gösterildiği üzere istatistiksel analiz ile belirlenen unsurların birisinden (serogrup E olmaması, *sodA* geni bulunmaması, tetrasiklin direnci) kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü. Ayrıca, Prajapati vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi izolatlar tarafından üretilen biyofilm yoğunlukları arasında bir farklılık olması ve/veya Boukhail ve Czuprynski (2018) tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi *M. haemolytica* gibi bakteriler ile bir arada bulunduğu durumda kapsüler polisakkarit sentezi yeniden düzenleniyor ve biyofilm sentezi buna göre şekilleniyor olabileceği kanısına varıldı. Bununla beraber, SSH'nin oluşumunda rol alan *H. somni* gibi diğer bakterilerin biyofilmini kullandığı için *P. multocida*'nın bizzat kendisinin biyofilm üretme ihtiyacı duymuyor olması da gözden kaçırılmamalıdır.

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

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

Direnç faktörlerinin bazılarının SSH'ye neden olan *P. multocida*, *M. haemolytica*, *M. bovis*, *H. somni* arasında yüksek oranda korunarak aktarıldığı da bildirilmiştir (Stanford et al., 2020). Sığır kökenli *P. multocida* izolatlarının antibiyotik direnç oranlarındaki paralel artış, direnç belirleyicilerinin yayılımının ortak olduğunu yani birçok farklı kaynaktan yayılabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda *P. multocida* suşları farklı antibiyotik gruplarına karşı direnç kazandıran birçok plazmid taşıyabilmektedir. Bu antibiyotik gruplarının yaygın örnekleri arasında beta-laktamlar, tetrasiklinler, streptomisin ve sülfonamidler gösterilebilir (Kadlec et al., 2011). Antibiyotik direncinin düşük oranda bulunduğu çalışmalarda, bu oranın çalışmanın yapıldığı zaman aralığı içerisinde çalışma bölgesindeki antibiyotik kullanımının düşük seviyede olması ile ilişkili olduğuna dair veriler de bildirilmiştir (Bourély et al., 2019).

Danofloksasin sığır ve domuzlarda SSH tedavisinde kullanılan üçüncü nesil florokinolon grubu olan sentetik bir antimikrobiyal ajandır (Beyi et al., 2021). *Mycoplasma* ve *Chlamydia* türleri de dâhil olmak üzere birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteriye karşı yüksek oranda antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Xiao et al., 2018). Özellikle ABD gibi ülkelerde, besi yetiştiriciliği mortalite ve morbidite açısından ele alındığında en yaygın hastalıklardan birisi olarak kabul edilen SSH'nin

azaltılması için antibiyotiklerin metaflaktik olarak kullanılması önemli bir araçtır (Smith et al., 2017). Danofloksasinin etten arınma süresinin kısa olması, et üreticileri tarafından en çok tercih edilen antibiyotiklerden biri olmasını sağlamaktadır (Beyi et al., 2021).

SSH ilişkili 5 adet *P. multocida* izolatının danofloksasine bağlı antimikrobiyal direnç profilinin saptanması amacıyla 2021 yılında Mısır'da yapılan bir çalışmada % 94,5 (n=52) oranında direnç saptanmıştır (Elsayed et al., 2021). Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'ni kapsayan bir çalışmada 2004-2009 yılları arasında 2366 izolat antibiyotik dirençliliği yönünden test edilmiştir ve danofloksasine karşı % 8,5-11,8 arasında değişen oranlarda direnç bildirilmiştir. İzolatların danofloksasine karşı ortalama direnci de % 10,88 olarak hesaplanmıştır (Portis et al., 2012). Kentucky-Amerika'da yapılan bir çalışmada 2012-2017 yılları arasında SSH'den izole edilen *P. multocida*'ların danofloksasine karşı herhangi bir direnç saptanamamıştır (Morehouse, 2018). 2009-2012 yılları arasında 10 Avrupa Birliği ülkesinden (Belçika'dan 8, Çekya'dan 16, Danimarka'dan 7, Fransa'dan 23, Almanya'dan 31, İtalya'dan 25, İspanya'dan 19, İngiltere'den 5) toplam 134 sığır kökenli *P. multocida* izolatı'nın incelendiği bir çalışmada da danofloksasine karşı % 3,7 oranında direnç rapor edilmiştir (El Garch et al. 2016). Türkiye'de yapılan bir çalışmada pnömonili koyun akciğerinden izole edilen 17 *Pasteurella* spp. izolatından % 5,89'i danofloksasine karşı dirençli olarak rapor edilmiştir (Öztürk ve Çorlu, 2006). Hemorajik septisemi nedeniyle ölmüş manda kökenli 10 B serogrubu *P. multocida* izolatının 5'inin (% 50) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. İzolatların % 40'ının enrofloksasine ve % 20'sinin siprofloksasine karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Tüm izolatlar levofloksasine karşı duyarlı olduğu için levofloksasin açısından biyofilm oluşturan ve oluşturmayan izolatlar arasında herhangi bir fark bulunamamıştır. Enrofloksasin'e karşı, biyofilm oluşturmayan izolatlardan 4'ü (% 40) duyarlı, 1'i (% 10) dirençli bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 2'si (% 20) duyarlı, 3'ü (% 30) dirençli bulunmuştur. Siprofloksasin'e karşı biyofilm oluşturmayan izolatların 5'i (% 50) duyarlı bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 2'si (% 20) dirençli, 3'i (% 30) duyarlı bulunmuştur (Kandimalla et al., 2022). Bu çalışmada florokinolon grubu antibiyotikleri temsilen izolatların danofloksasine karşı direnç profili belirlendi. İncelenen izolatların 22'sinde (% 23,91) danofloksasine karşı direnç tespit edildi. Dirençli bulunan izolatların 6 (% 6,52) tanesinin serogrup A, 2 (% 2,17) tanesinin serogrup D, 5 (% 5,43) tanesinin serogrup E, 9 (% 9,78) tanesinin ise serogrup negatif

olarak belirlendi. Serogrup B ve F izolatlarında danofloksasin direnci görülmedi. Biyofilm oluşturmayan izolatların 32'si (% 34,78) danofloksasin'e karşı duyarlı ve 8'i (% 8,70) dirençli bulunurken; biyofilm oluşturan izolatların 38'i (% 41,30) duyarlı, 14'ü (% 15,22) dirençli bulundu. Grobbel vd. (2007) tarafından bildirilenin aksine, Elsayed vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, danofloksasinin norfloksasine kıyasla daha az etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak her iki çalışmada da, danofloksasinin diğer florokinolon grubu üyelerine göre daha az etkili olabileceği rapor edilmiştir. Bu çalışmada bulunan danofloksasin direnci ABD ve Kanada'da Portis vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada bildirilen orana benzer bulunmuştur. Morehouse (2018) tarafından yapılan ABD'deki bir diğer çalışma ile veya direnç bulunmamış diğer çalışmalar ile bu tez çalışmasında bulunan direnç uyumlu değildir. Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda bildirilen direnç oranı bu çalışmada bulunan ile kıyaslandığında, Avrupa ülkelerindeki direnç oranları daha düşük görülmektedir. Mısır ve Hindistan'da ise diğer çalışmalara göre, gerek danofloksasine gerekse diğer florokinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç oranı daha yüksek görülmektedir. Ayrıca El-Seedy vd. (2020), tarafından yapılan çalışma, diğer bakteriler ile miks olarak uygulanan antibiyogram testinde, antibiyotik dirençliliğinin daha yüksek oranda belirlendiğini ortaya koymuştur. Kandimalla vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada ise biyofilm oluşturan izolatlarda florokinolon grubu üyelerinden olan enrofloksasin ve siprofloksasine karşı direncin arttığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında direnç durumu incelenen florokinolon grubu bir antibiyotik olan danofloksasin ile de bu durumun benzerlik gösterdiği ortaya konuldu.

Tilmikosin veteriner sahada preparat olarak özellikle sığır, koyun ve domuzlarda genellikle solunum sistemi enfeksiyonlarına karşı kullanılan makrolid grubu antibiyotiklerden biridir (Scoreaux and Shryock, 1999; Giguère, 2013). Tilmikosinin, solunum sistemi hastalıklarıyla ilişkili *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *M. haemolytica*, ve *Mycoplasma* spp. gibi birçok Gram negatif bakteri üzerine *in vitro* aktivitesi olduğu bilinmektedir (Giguère, 2013). Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılmış olan bir çalışmada SSH orijinli *P. multocida* izolatlarında tilmikosine karşı % 23,8 oranında direnç saptanmıştır (Portis et al. 2012; Michaellet al., 2018). Almanya'da 2013 yılında sığırlardan izole edilen *P. multocida* izolatlarında ise tilmikosin direnci % 2,1 oranında bildirilmiştir (Michaellet al., 2018). Amerika-Kentucky'de yapılan bir çalışmada *P. multocida*'larda % 28-40 arasında değişen oranlarda tilmikosin direnci saptanmıştır. Aynı çalışmada, 2012 yılında %

27,12 ve 2017 yılında ise % 35,71 oranında tilmikosin direnci saptanmış ancak direnç artışındaki önem seviyesi ($p=0,2962$) istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Morehouse, 2018). Fransa’da 2012-2017 yıllarını kapsayan süreçte, tamamı SSH ilişkili *P. multocida* izolatları kullanılarak oluşturulan toplam 1470 izolatın kullanıldığı bir çalışmada, üç aylık periyotlar üzerinden hesaplanan tilmikosin direncinin % 8 seviyesinden % 26 seviyesine oldukça lineer bir şekilde arttığı görülmüştür (Bourély et al. 2019). Oklahoma Hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı’na 1994 ve 2002 yılları arasında gönderilen 6-18 aylık pnömonili sığırların akciğer örneklerinden toplam 292 adet *P. multocida* izole edilmiş ve bu izolatlarda 1994 yılında en düşük % 8, 2000 yılında en yüksek % 40 ve ortalama % 24,22 oranında olmak üzere tilmikosin direnci belirlenmiştir (Welsh et al. 2004). İtalya’da 39’u sığır kökenli olmak üzere farklı hayvan türlerinden izole edilen % 63,97’si solunum sistemi kökenli 186 *P. multocida* izolatında da tilmikosine karşı % 1,6 oranında direnç bildirilmiştir (Cucco et al. 2017). Japonya’da yapılan bir çalışmada ağırlıklı olarak pulmoner ve nazal lezyonlardan olmak üzere elde edilen 72 adet sığır orijinli *P. multocida* izolatının tilmikosine % 4,16 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (Yoshimura vd. 2001).

Ülkemizde yapılan bir çalışma Konya’da gerçekleştirilmiş ve SSH kökenli 14 adet *P. multocida* izolatının tamamı tilmikosine karşı duyarlı bulunmuştur (Ok vd., 2019). Türkiye’deki farklı çiftliklerden alınmış ve histopatolojik incelemeler sonucu pnömonik olduğu saptanmış akciğer örneklerinden 8 adet *P. multocida* izole edilmiş ve izolatların tilmikosine karşı % 75 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (Özdemir vd., 2019). Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü’ne 2001-2012 yılları arasında gönderilen çeşitli hayvanlara ait akciğer ve nazal swap örneklerinden 50 adet *P. multocida* izolatı elde edilmiş ve tilmikosine karşı % 6 oranında direnç saptanmıştır (Güler vd., 2013). Bu çalışmada izolatların, makrolid grubu antibiyotikleri temsilen tilmikosine karşı direnç durumları belirlendi. Çalışma kapsamında incelenen izolatların 33’ü (% 35,87) tilmikosine karşı dirençli bulundu. Dirençli bulunan izolatların 7 (% 7,61) tanesinin serogrup A, 2 (% 2,17)’sinin serogrup B, 5 (% 5,43)’inin serogrup D, 4 (% 3,35)’ünün serogrup E, 15 (% 16,30)’inin ise serogrup negatif olduğu belirlendi. Serogrup F’ye ait bir izolatta tilmikosin direnci görülmedi. Biyofilm oluşturmayan izolatların 33’ü (% 35,87) tilmikosine duyarlı ve 7’si (% 7,61) dirençli bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 26’sı (% 28,26) duyarlı, 26’sı (% 28,26) dirençli bulundu. Yapılan çalışmalardaki tilmikosin direncinin % 0 ile % 75 arasında oldukça geniş bir aralıkta

seyrettiği görülmektedir ve bu değerlerin her iki uç noktası da ülkemizde yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Ok vd., 2019; Özdemir vd., 2019). Sayı olarak fazla ve uzun yıllar sürdürülmüş kapsamlı çalışmalar incelendiğinde, sığırlarda diğer hayvanlara kıyasla solunum sistemi hastalıkları ilişkili *P. multocida* izolatlarında daha fazla makrolid direnci olduğu görülmektedir. Ayrıca birçok çalışmada, tilmikosin direncinin lineer bir şekilde arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmalardan birinde artışın istatistiksel analizi gerçekleştirilmiş ve anlamsız bulunmuş olmasına rağmen (Morehouse, 2018), diğer çalışmalarda herhangi bir analiz yapılmadığı için artışın önem durumu bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında tilmikosin direnci açısından biyofilme bağlı olarak direncin arttığı belirlendi.

Florfenikol, kloramfenikolün florlanmış bir türevidir. Yalnızca veteriner sahada kullanılan florfenikol klinik kullanıma 1990'lı yılların ortalarında sunulmuştur. Kloramfenikolde olan geri dönüşümsüz anaplastik anemi gibi ciddi bir yan etkinin florlanmış derivatında görülmemesi florfenikolü sığır ve domuzlarda SSH tedavisinde kullanılır hale getirmiştir (Schwarz et al., 2004; Dowling, 2013b). Gram negatif bakterilerde florfenikol direnci, *floR* geninin plazmid transferi ile ilişkilidir. Bu gen florfenikolün dışarıya atılımını sağlayan, membranla ilişkili bir efluks proteinini kodlar (Schwarz et al., 2004) Ayrıca tek doz florfenikol uygulamasının ardından dışkı florasında çoklu direnç gösteren *E. coli* izolatları görülmüş ve bunların *floR* geninin diğer direnç genleriyle de bağlantılı bir plazmid üzerinde taşındığı için çoklu dirence neden olduğu düşünülmüştür (Berge et al., 2005). Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'ni kapsayan bir çalışmada, 2000-2009 yılları arasında SSH'den izole edilen sığır orijinli *P. multocida* izolatlarında florfenikole karşı % 12,36 oranında direnç saptanmıştır (Portis et al., 2012). Almanya'da 2013 yılında yapılan bir çalışmada, sığırlardan elde edilen 48 adet *P. multocida* izolatu florfenikol direnci yönünden incelenmiş ve izolatların tamamının duyarlı olduğu görülmüştür (Michaelet al., 2018). Fransa'da 1695 adet *P. multocida* izolatının incelendiği bir çalışmada, florfenikol direncinin % 0,2-0,8 arasında değiştiği görülmüştür. Diğer hayvanlara ait solunum sistemi hastalığı kökenli *P. multocida* izolatlarının direnç ortalamaları incelendiğinde, domuz izolatlarında % 0,8 oranında, kedi izolatlarında % 0,5 oranında, ördek izolatlarında ise % 0,3 oranında florfenikol direnci olduğu, koyun, köpek ve tavşan kökenli olanlarda ise direnç olmadığı bildirilmiştir (Bourély et al., 2019). Morehouse (2018) tarafından yapılan çalışmada, SSH izolatu *P. multocida*'ların florfenikole karşı direnci 2012 yılında % 7,14 oranında, 2017 yılında ise % 5,43 oranında olmak üzere,

2012-2017 yılları arasında % 3-22 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir. Kanada’da yapılan bir çalışmada ise SSH gelişme riski yüksek dana ve düvelerden izole edilen *P. multocida* suşlarının florfenikole karşı % 14,07 oranında dirençli oldukları saptanmıştır (Timsit et al., 2017). Oklahoma Hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı’na yapılan çalışmada 1996-1998 yılları arasında en düşük % 0, 2000 yılında en yüksek % 14 olmak üzere ortalama % 4,71 oranında florfenikol direnci olduğu tespit edilmiştir (Welsh et al., 2004). On Avrupa Birliği ülkesinde 2009-2012 yılları arasında toplam 134 sığır kökenli *P. multocida* izolatının incelendiği bir çalışmada florfenikole karşı direnç tespit edilmemiştir (El Garch et al., 2016).

İran’da yapılan bir çalışmada, pnömonili ve sağlıklı sığırlardan alınmış örneklerden elde edilen 30 adet *P. multocida* izolatı incelenmiş ve florfenikole karşı % 16,7 oranında direnç rapor edilmiştir. Kloramfenikole karşı ise tüm izolatlar duyarlı bulunmuştur (Khamesipour et al., 2014). Etiyopya’da 2012-2013 yılları arasında pnömonik ve sağlıklı görünen sığırlardan alınan örneklerden izole edilen *P. multocida* suşlarının tamamı florfenikole duyarlı bulunmuştur (Abera et al., 2014). Japonya’da yapılan çalışmada da klinik olarak sağlıklı ve hastalıklı buzağılardan izole edilmiş *P. multocida* izolatlarının florfenikole karşı % 0,5 oranında ve tiamfenikole karşı % 13,2 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (Katsuda et al., 2013). Mısır’da El-Seedy vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, solunum sistemi bulguları gösteren buzağılardan 406 adet derin nazal svap örneği alınmış ve 74 (% 18,2) adet *P. multocida* izolasyonu yapılmıştır. *P. multocida*’nın tek başına izole edildiği enfeksiyonlarda kloramfenikole karşı direnç oranının % 50 olduğu, *P. multocida*’nın diğer bakteriler ile birlikte bulunduğu yani enfeksiyonun miks olarak seyrettiği durumda kloramfenikole karşı olan direnç oranının % 70 olduğu görülmüştür (El-Seedy et al., 2020).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada Ege Bölgesi’nde mezbahalardaki sığırlardan alınan örneklerden izole edilen *P. multocida* suşlarının florfenikole karşı % 7 oranında dirençli oldukları bildirilmiştir (Erbaş ve Kaya, 2008). Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü’nde 2001-2012 yılları arasında çeşitli hayvanlara ait akciğer ve nazal svap örneklerinden izole edilen *P. multocida* suşlarının tamamı florfenikole karşı duyarlı bulunmuştur (Güler vd., 2013). Bu çalışmada izolatların, fenikol grubu antibiyotikleri temsilen florfenikole karşı direnci % 10,87 (izolatların 10’unda) oranında tespit edildi. Dirençli bulunan izolatların 2 (% 2,17) tanesi serogrup A, 2 (% 2,17) tanesi serogrup D, 1 (% 1,09) tanesi serogrup E, 5 (% 5,43) tanesi ise serogrup negatif olarak belirlendi. Serogrup B ve F’e ait izolatlarda florfenikol direnci görülmedi. Biyofilm

oluşturmayan izolatların 37'si (% 40,22) florfenikole karşı duyarlı ve 3'ü (% 3,26) dirençli bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 45'i (% 48,91) duyarlı, 7'si (% 7,61) dirençli bulundu. Yapılan çalışmalardaki florfenikol direncinin % 0 ile % 100 arasında değişen bir aralıkta seyrettiği görülmektedir. Bölgesel olarak incelendiğinde Avrupa ve Amerika kökenli çalışmalarda bildirilen direncin genellikle düşük olduğu, Orta Doğu'da ve Asya'da ise daha yüksek direnç olduğu görülmektedir. Direnç oranlarının biyofilm oluşturan izolatlarda oluşturmayanlara kıyasla sayısal olarak daha fazla olduğu görülmekle birlikte, bu tez çalışmasında belirlenen artış istatistiksel olarak anlamsız bulundu Kandimalla vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer şekilde biyofilm oluşturan izolatlar açısından sayısal bir fazlalık bildirilmiştir.

Sefkuinom, dördüncü kuşak sefalosporin olarak sınıflandırılan betalaktam grubu bir antibiyotiktir (Ahmad et al., 2015). Özellikle Avrupa'da sığırlarda solunum sistemi hastalıklarında, akut *E. coli* kaynaklı mastitiste veya ayak çürüğünde ya da buzağılarda *E. coli* septisemisinde kullanım alanı bulmaktadır. Sığır ve domuzlardaki enfeksiyonların tedavisine yönelik olarak yapılan saha çalışmalarında sefkuinomun etkinliği seftiofurunkine oldukça benzer olduğu saptanmıştır. İnsanlarda nozokomiyal enfeksiyonların veya popülasyon kaynaklı alt solunum yolu enfeksiyonlarının, bakteriyel menenjit, idrar yolu enfeksiyonları, basit deri veya deri ile ilgili enfeksiyonların tedavisinde de kullanılmaktadır. Bu nedenle öncelikle duyarlılık testlerine başvurulmalı, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanılamayacağı belirlendiği takdirde yani başka alternatif bulunmaması durumunda kullanımı tavsiye edilmektedir (Prescott, 2013). Mısır'da El-Seedy vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, solunum sistemi bulguları gösteren buzağılardan *P. multocida*'lar 20 (% 4,9) tane örnekten tek başına, 54 (% 13,3) tanesinden *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus spp.*'den biri veya birkaçı ile birlikte izole edilmiştir. Yapılan antibiyogram sonucunda *P. multocida*'nın tek başına izole edildiği enfeksiyonlarda sefkuinoma karşı olan direnç % 10, seftriaksona karşı olan direnç % 40; *P. multocida*'nın diğer bakteriler ile birlikte bulunduğu durumda sefkuinoma karşı olan direnç % 20, seftriaksona karşı olan direnç ise % 70 bulunmuştur (El-Seedy et al., 2020). İran'da yapılan çalışmada besi ve süt çiftliklerindeki sığır solunum sistemi enfeksiyonu vakası bulunan buzağılardan izole edilen *P. multocida* izolatların tamamının sefkuinoma duyarlı olduğu bildirilmiştir (Jamali et al., 2014). Japonya'da yapılan çalışmada da benzer şekilde klinik olarak sağlıklı ve hastalıklı buzağılardan elde edilmiş 378 *P. multocida* izolatının tamamının sefkuinoma, seftiofura ve

sefazoline karşı duyarlı olduğu bulunmuştur (Katsuda et al., 2013). Konya’da yapılan bir çalışmada sığır solunum sistemi hastalığı kökenli 14 adet *P. multocida* izolatının % 21,42’sinin (n=3) sefkuinoma karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Ok vd., 2019). Hemorajik sepsis nedeniyle ölmüş mandalardan alınan örneklerden 10 adet *P. multocida* serogrup B izolatının 5’inin (% 50) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. İzolatların % 20’sinin sefotaksime karşı dirençli olduğu, tamamının seftiaksona, sefoperazon-sulbaktam ve seftiofura karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. Sefotaksime karşı, biyofilm oluşturmayan izolatların 5’i (% 50) duyarlı bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 2’si (% 20) dirençli, 3’i (% 30) duyarlı bulunmuştur (Kandimalla et al., 2022). Bu çalışmada izolatların, sefalosporin grubu antibiyotikleri temsilen sefkuinoma karşı direnç durumu araştırıldı. Çalışmada incelenen izolatların 33’ü (% 35,87) sefkuinoma karşı dirençli bulundu. Dirençli bulunan izolatların 14 (% 15,22) tanesi serogrup A, 2 (% 2,17) tanesi serogrup D, 4 (% 4,35) tanesi serogrup E, 13 (% 14,13) tanesi ise serogrup negatif olarak tanımlandı. Serogrup B ve F’ye ait izolatlarda sefkuinom direnci görülmeydi. Biyofilm oluşturmayan izolatların 26’sı (% 28,26) sefkuinom’a karşı duyarlı ve 14’ü (% 15,22) dirençli bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 33’ü (% 35,87) duyarlı, 19’u (% 20,65) dirençli olarak değerlendirildi. Yapılan çalışmalardaki sefkuinom direncinin % 0-21,42 arasında bir aralıkta seyrettiği gözlemlendi. Bu tez çalışmasında bulunan sefkuinom direnci, diğer bildirilenlere göre biraz daha yüksek olmakla birlikte benzer oranda olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasındaki veriler ile Kandimalla vd. (2022) tarafından yapılan çalışmadaki veriler, sefalosporin grubu antibiyotiklerden birisine karşı sayıca çok az da olsa biyofilm oluşturan izolatların daha dirençli olabileceğini düşündürmektedir. Her ne kadar sayıca artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuş olsa da, konu hakkındaki çalışma sayısının yetersiz olması nedeniyle kesin bir kanıya varılamamıştır ve daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerekmektedir. Ayrıca Mısır’da El-Seedy vd. (2020), tarafından yapılan çalışma miks enfeksiyonlarda sefalosporin direncinin artabileceğine işaret etmektedir.

Gentamisin, aminoglikozid grubu içinde en aktif antimikrobiyal ilaçlardan birisi olarak tanımlanmaktadır (Strateva and Yordanov, 2009). Pnömoniye yol açan *Haemophilus* spp. ve *Pasteurella* spp. genel olarak gentamisine karşı duyarlıdır. Maliyetinin pahalı olması ve dokularda uzun süreli olarak kalıntı bırakması nedeniyle sığır, koyun ve keçilerde kullanımı sınırlıdır (Dowling, 2013a). Fransa’da toplam 1511 *P. multocida* izolatının incelendiği bir çalışmada, gentamisin direncinin % 4,6

ortalama ile % 3,6 ve % 5,8 seviyesi arasında değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, diğer hayvanlara ait solunum sistemi hastalığı kökenli *P. multocida* izolatlarının direnç ortalamaları incelendiğinde, domuz kökenli izolatlarda % 3,5 oranında, kedi izolatlarında % 9,3 oranında, koyun kökenlilerde % 6,7 oranında, köpek izolatlarında % 6,0 oranında ve tavşan izolatlarında ise % 1,8 oranında gentamisin direnci olduğu bildirilmiştir (Bourély et al., 2019). Hemorajik Septisemi tanısı koyulmuş 38 sığır, 34 manda ve 28 koyun kökenli toplam 100 adet *P. multocida* izolatında gentamisine karşı % 29 oranında, yalnızca sığırlarda ise % 36,84 oranında direnç saptanmıştır (Kumar et al., 2009). İtalya’da 39 sığır, 40 domuz, 19 koyun ve 88 tavşandan izole edilen % 63,97’si (n=119) solunum sistemi kökenli 186 *P. multocida* izolatında gentamisine karşı % 1,6 (n=3) oranında direnç belirlenmiştir (Cucco et al., 2017). Mısır’da yapılan çalışmada da *P. multocida* izolatlarında gentamisine karşı direnç oranının % 4 (n=2) olduğu rapor edilmiştir. (Elshehemy and Abd-Elrahman 2013). İran’da yapılan çalışmada pnömonili ve sağlıklı sığırlardan alınmış örneklerden elde edilen 30 adet *P. multocida* izolatının tamamı gentamisine karşı duyarlı bulunmuştur (Khamesipour et al., 2014). Hemorajik septisemi nedeniyle ölmüş mandalardan alınan örneklerden 10 adet *P. multocida* serogrup B izole edilmiş ve yapılan testler sonrasında 10 izolatın 5’inin (% 50) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. İzolatların % 50’sinin gentamisine karşı dirençli olduğu, tamamının kanamisine karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. Gentamisine karşı, biyofilm oluşturmayan izolatlardan 4’ü (% 40) duyarlı, 1’i (% 10) dirençli bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 1’i (% 10) duyarlı, 4’ü (% 40) dirençli bulunmuştur (Kandimalla et al., 2022).

Türkiye’de Aydın ilinden 10, İzmir ilinden 18 olmak üzere mezbahalardaki sığırlardan alınan örneklerden toplam 28 adet *P. multocida* izolatında gentamisine karşı % 64 oranında direnç bildirilmiştir (Erbaş ve Kaya, 2008). Türkiye’deki farklı çiftliklerden alınmış histopatolojik incelemeler sonucu pnömonik olduğu saptanan akciğer örneklerinden 8 adet *P. multocida* izole edilmiş ve tüm izolatlar gentamisine karşı dirençli olarak rapor edilmiştir (Özdemir vd., 2019). Bu tez çalışmasında izolatların, aminoglikozid grubu antibiyotikleri temsilen gentamisine karşı direnç durumu araştırıldı. Çalışmada incelenen izolatların 17’si (% 18,48) gentamisine karşı dirençli bulundu. Dirençli bulunan izolatların 6 (% 6,52) tanesi serogrup A, 2 (% 2,17) tanesi serogrup B, 3 (% 3,26) tanesi serogrup E, 6 (% 6,52) tanesi ise serogrup negatif olarak bulundu. Serogrup D ve F’e ait izolatlarda gentamisin direnci görülmedi.

Biyofilm oluşturmeyan izolatların 35'i (% 38,04) gentamisine karşı duyarlı ve 5'i (% 5,43) dirençli bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 40'ı (% 43,48) duyarlı, 12'si (% 13,04) dirençli olarak tanımlandı. Yapılan çalışmalardaki gentamisin direncinin % 0-100 arasında oldukça geniş bir aralıkta seyrettiği dikkat çekmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında ise gentamisine karşı direncin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Mısır'da Elshemey ve Abd-Elrahman (2013), tarafından yapılan çalışmada gentamisine karşı % 4 tespit edilmiş ve tedavide üçlü kombinasyon antibiyotik uygulanmıştır. Buna rağmen % 80'lik bir başarı sağlanmıştır. Hastalığın multifaktöryel olması, başka bakterilerin, virüslerin veya biyofilm ortamlarının olaya dâhil olması bu durumun nedeni olarak düşünülmüştür. Yine Mısır'da El-Seedy vd. (2020), tarafından yapılan çalışma incelendiğinde aminoglikozid grubu antibiyotiklerden amikasin ve kanamisinine karşı direnç önce sadece *P. multocida* için ardından da enfeksiyondan izole edilen diğer bakteriler ile birlikte miks olarak belirlenmiştir. Enfeksiyonun miks olarak seyrettiği durumda antibiyotik direncinin arttığı gözlenmiştir. Kandimalla vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada ise biyofilm oluşturan izolatlarda oluşturmeyanlara kıyasla aminoglikozid grubu üyelerinden olan gentamisine karşı direncin oransal olarak arttığı görülmektedir.

Tetrasiklin, tetrasiklinler grubuna ait bir antibiyotik olup veteriner sahada en çok kullanılan antibiyotik sınıfıdır (Riviere and Papich, 2018). Oksitetrasiklin ve tetrasiklin SSH'nin neden olduğu pnömonilerde özellikle de *M. haemolytica*, *P. multocida* ve *H. somni*'ye karşı tercih edilmektedirler (Apley and Coetzee, 2013). Almanya'da 2013 yılında yapılan bir çalışmada sığırlardan izole edilen 48 adet *P. multocida* izolatı tetrasiklin direnci yönünden incelenmiş ve % 10,4 oranında direnç olduğu bildirilmiştir (Michaëlet al., 2018). Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'ni kapsayan bir çalışmada da % 44,03 oranında tetrasikline karşı direnç saptanmıştır (Portis et al., 2012). On Avrupa Birliği ülkesinde toplam 134 sığır kökenli *P. multocida* izolatı kullanılarak yapılan çalışma sonucunda tetrasikline karşı % 11,2 oranında direnç bulunmuştur (El Garch et al., 2016). Fransa'da ise toplam 1702 izolatın incelendiği çalışmada, tetrasiklin direncinin % 13 seviyesinden % 34 seviyesine oldukça lineer bir şekilde arttığı görülmüştür (Bourély et al., 2019). Hemorajik sepsisemi tanısı koyulmuş 38 sığır, 34 manda ve 28 koyun kökenli toplam 100 adet *P. multocida* izolatında, tetrasikline karşı % 14 oranında, yalnızca sığırlarda da % 15,7 oranında direnç belirlenmiştir (Kumar et al., 2009). Oklahoma Hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı'nda toplam 292 adet *P. multocida* izole edilmiş ve en düşük 1994

yılında % 29, 2000 yılında en yüksek % 60 olmak üzere ortalama % 45 oranında tetrasiklin direnci olduğu tespit edilmiştir (Welsh et al., 2004). İtalya’da 39 sığır, 40 domuz, 19 koyun ve 88 tavşandan izole edilen % 63,97’si solunum sistemi kökenli 186 *P. multocida* izolatında tetrasikline karşı % 7,5 (n=14) oranında direnç bulunmuştur (Cucco et al., 2017). Mısır’da yapılan çalışmada hemorajik septisemi orijinli *P. multocida* izolatlarında tetrasiklin direncinin % 38 olduğu bildirilmiştir (Elshemey and Abd-Elrahman, 2013). Etiyopya’da 2012-2013 yılları arasında pnömonik ve sağlıklı görünen sığırlardan elde edilen *P. multocida* izolatlarının tetrasikline direnç oranı % 45,45 olarak bulunmuştur (Abera et al., 2014). İran’da yapılan bir çalışmada pnömonili ve sağlıklı sığırlardan alınmış örneklerden elde edilen 30 adet *P. multocida* izolatının tamamı tetrasikline karşı duyarlı bulunmuştur (Khamesipour et al., 2014).

Mısır’da El-Seedy vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *P. multocida*’nın tek başına izole edildiği enfeksiyonlarda oksitetrasikline karşı olan direnç % 90, *P. multocida*’nın diğer bakteriler ile birlikte bulunduğu enfeksiyon durumunda oksitetrasikline karşı olan direnç % 100 olarak bulunmuştur (El-Seedy et al., 2020). Hemorajik septisemi nedeniyle ölmüş manda izolatu 10 adet serogrup B *P. multocida* izolatının % 50’sinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. İzolatların % 70’inin 10 µg tetrasikline karşı dirençli olduğu ve tamamının ise 30 µg tetrasikline karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. Tetrasikline karşı, biyofilm oluşturmayan izolatlardan 2’si (% 20) duyarlı 3’ü (% 30) dirençli bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 4’ü (% 40) dirençli, 1’i (% 10) duyarlı bulunmuştur. Tetrasiklin (30 µg) açısından biyofilm oluşturan ve oluşturmayan izolatlar arasında herhangi bir fark bulunamamıştır (Kandimalla et al., 2022).

Ülkemizde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalardan birisinde Konya’da sığır solunum sistemi hastalığı kökenli 14 adet *P. multocida* izolatının % 85,71’inin tetrasikline karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Ok vd., 2019). Türkiye’deki bir başka çalışmada farklı çiftliklerden alınmış pnömonik akciğer örneklerinden 8 adet *P. multocida* izole edilmiş ve izolatların tetrasikline karşı % 75 oranında dirençli olduğu rapor edilmiştir (Özdemir vd., 2019). Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü’ne 2001-2012 yılları arasında izole edilen SSH kökenli 50 adet *P. multocida* izolatında tetrasikline karşı % 12 oranında direnç saptanmıştır (Güler vd., 2013). Aydın ve İzmir İllerindeki mezbahalardan alınan sığır kökenli örneklerden izole edilen *P. multocida* izolatlarında ise oksitetrasikline karşı % 46 oranında direnç bildirilmiştir (Erbaş ve

Kaya, 2008). Bu çalışmada izolatların, tetrasiklin grubu antibiyotikleri temsilen tetrasikline karşı direnci araştırıldı. Tez çalışmasındaki izolatların 70'i (% 76,09) tetrasikline (30 µg) karşı dirençli bulundu. Dirençli bulunan izolatların 19 (% 20,65) tanesi serogrup A, 3 (% 3,26) tanesi serogrup B, 5 (% 5,43) tanesi serogrup D, 14 (% 15,22) tanesi serogrup E, 29 (% 31,52) tanesi ise serogrup negatif olarak bulundu. Serogrup F'e ait izolat tetrasiklin direnci göstermedi. Biyofilm oluşturmeyan izolatların 15'i (% 16,30) tetrasikline karşı duyarlı ve 25'i (% 27,17) dirençli bulunurken, biyofilm oluşturan izolatların 7'si (% 7,61) duyarlı, 45'i (% 48,91) dirençli bulundu. Yapılan çalışmalardaki tetrasiklin direncinin % 0-96,5 arasında oldukça geniş bir yelpazede seyrettiği görülmektedir. Aynı bölgede uzun süreli tekrar eden çalışmalar incelendiğinde ise dirençte sürekli bir şekilde dalgalanmalar olduğu veya lineer bir şekilde direncin arttığı görülmektedir (Welsh et al., 2004; Portis et al., 2012; Bourély et al., 2019). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da % 12-85,71 arasında değişen oranda tetrasiklin direnci olduğu görülmektedir. Tetrasiklin grubu üyesi diğer antibiyotiklere bakıldığında ise % 1,4-98,2 arasında değişen oranda oksitetrasikline karşı direnç olduğu, doksisisiklin, klortetrasikline karşı ise en azından bir çalışmada direnç bildirildiği görülmektedir. Ayrıca El-Seedy vd. (2020), tarafından yapılan çalışma antibiyogramın diğer bakteriler ile miks olarak yapıldığı durumda oksitetrasiklin açısından antibiyotik dirençliliğinin arttığı ve % 100 dirençli olduğu görülmektedir. Kandimalla vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada ise biyofilm oluşturan izolatlarda oransal olarak da olsa tetrasikline karşı direncin arttığı görülmektedir.

Biyofilm oluşumu ile ÇİD arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, ÇİD pozitif izolatlardan 6'sının (% 6,52) biyofilm negatif, 18'inin (% 19,57) biyofilm pozitif olduğu, bununla birlikte ÇİD negatif izolatların 34'ünün (% 36,96) biyofilm negatif, 34'ünün (% 36,96) biyofilm pozitif olduğu tespit edildi. Diğer bir ifade ile bu çalışmada izole edilen biyofilm pozitif *P. multocida* suşlarının biyofilm negatif olanlara göre daha yüksek oranda çoklu ilaç direnci gösterdiği ortaya konuldu. Yapılan ikili lojistik regresyon analizi ile ÇİD'in biyofilm oluşumu üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunurken ($p>0,1$), izolatların biyofilm oluşturma durumlarına göre oluşturduğu grupların toplam antibiyotik direnci bakımından birbirlerinden farklı olduğu ($p<0,01$) ve biyofilm pozitif izolatların toplam antibiyotik direncinin biyofilm negatiflere göre daha yüksek olduğu ancak biyofilmin toplam direnç üzerine olan bu etkisinin küçük olduğu saptandı (Şekil 5.28). Bunun yanı sıra

izolatların biyofilm oluşturma durumlarına göre oluşturduğu grupların toplam virülens geni sayısı açısından anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü ($p>0,1$).

Enfeksiyonlardan korunma için etkili kontrol stratejilerinin oluşturulması için patojenlerin dağılımı ve yakınlıkları ile beraber bakteriyel enfeksiyonların epidemiyolojisinin belirlenmesi temel bir hedef olarak gösterilmektedir (Nazik et al., 2007). Bakterilerin tiplendirilmesinde antibiyotiplendirme, serotiplendirme, faj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme ve biyotiplendirme gibi fenotipik metotlar çevresel faktörlerden daha çok etkilendiği için, son yıllarda moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Moleküler analizler fenotipik yöntemler ile kıyaslandığında, *P. multocida*'nın epidemiyolojisini anlamak açısından daha aydınlatıcıdır. Bu amaçla kullanılan moleküler teknikler arasında restriksiyon endonükleaz analizi (REA), ribotipleme, rRNA sekanslaması, polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu (PCR parmak izi / RAPD), pulse-field jel elektroforezi (PFGE) ve multi-lokus sekans analizi gibi yöntemler yer almaktadır. Göreceli düşük maliyeti ve yürütme kolaylığı nedeniyle, PCR çok sık tercih edilen bir tekniktir ve çok sayıda araştırmacı çeşitli hayvan türlerinde *P. multocida*'nın epidemiyolojik araştırması amacıyla PCR tabanlı teknikler kullanmıştır (Dabo et al., 2008). Polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu (RAPD) tekniği, tekli veya çoklu ampikonlar oluşturmak için gelişigüzel kısa primerler (8-12 nükleotit) ile amplifiye edilebilen polimorfik DNA'ya dayanmaktadır. Agaroz jel üzerinde yürütülerek incelenen suşlardan DNA fragmanlarının profilleri karşılaştırılabilir. RAPD-PCR tekniğinin, ribotiplemenin yapamadığı durumlarda *P. multocida* suşlarını güvenilir bir şekilde ayırt ettiği (Dziva et al., 2004) ve uygun bir tarama aracı olarak *P. multocida* ve *M. haemolytica* ilişkisini değerlendirmek amacıyla epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceği bildirilmiştir (Alhamami et al., 2021). Alhamami vd. (2021) tarafından Avustralya besi sığırları üzerinde yapılan çalışmada, elde edilen *P. multocida* izolatlarının genetik olarak heterojen olduğunu ve 10 farklı profile sahip olduğu RAPD-PCR analizi ile ortaya çıkarılmıştır. Ancak bu tez çalışmasında kullanılan benzerlik katsayısı kullanılarak araştırmacılar tarafından bildirilen dendrogram değerlendirildiğinde 140 *P. multocida* izolatının 43 farklı genotip oluşturduğu görülmektedir. Biwas et al. (2004) tarafından yapılan araştırmada, Hindistan mandalarını etkilemiş hemorajik sepsisemi salgınından izole edilen beş *P. multocida* izolatına REP-PCR, ERIC-PCR ve tek primerli PCR uygulanmıştır. Salgına karışan tüm izolatların, standart *P. multocida* suşundan (P_{52}) farklı bir genetik profile sahip olduğu bulunmuştur. Ancak, üç izolat benzer profile

sahipken, kalan iki izolatin her biri farklı bir profile sahip olduğu görülmüştür. Çalışma, sığırlarda tek bir hemorajik septisemi salgınında birden çok *P. multocida* suşunun rol oynadığını göstermiştir. Çeşitli türlerden hayvanları kapsayan, İran’da yapılan bir çalışmada 131 *P. multocida* izolatu RAPD-PCR ve REP-PCR metotları kullanılarak karakterize edilmiştir. Yapılan RAPD-PCR analizi sonucunda 63 genotip ve 9 tiplendirilemeyen izolat, REP-PCR analizi sonucunda 81 genotip ve 6 tiplendirilemeyen izolat olduğu tespit edilmiştir. Analiz sonuçları İran bölgesinden izole edilen *P. multocida* izolatlarının karakterizasyonu açısından REP-PCR’ın RAPD’e göre daha yüksek ayırım gücü sağladığını ortaya koymuştur. Aynı hayvandan veya coğrafyadan köken alan *P. multocida* izolatlarında dahi dikkate değer bir seviyede genetik çeşitlilik olduğu görülmüştür. İzolatların bölge ve konak spesifik bir profile seyretnmediği tespit edilmiştir. Yalnızca sığır orijinli 11 *P. multocida* izolatından elde edilen RAPD profillerine bu tezde kullanılan benzerlik katsayısı ile bakıldığında 2 farklı genotip olduğu görülmüştür (Shirzad-Aski and Tabatabaei, 2016). Taylor et al. (2010) tarafından, SSH orijinli 41 *P. multocida* izolatının kullanılarak yapıldığı RAPD-PCR analizi sonucunda elde edilen dendrogramda %92,5’luk benzerlik indeksi kullanılarak 9 farklı genotip olduğu bildirilmiştir. Veriler bu tezde kullanılan benzerlik katsayısı ile incelendiğinde 2 farklı genotip olduğu tespit edilmiştir. Kore’de domuzlar üzerinde yapılan bir çalışmada yapılan multipleks kapsüler PCR testi ile çalışmada izole edilen 69 *P. multocida* suşunun, serogrup A (n=47, %68,1) veya serogrup D’nin (n=22, %31,9) kapsüllerinin biyosentetik lokusuna sahip olduğunu ortaya çıkartılmıştır. RAPD-PCR analizi sonuçlarına göre serogrup D pozitif olan 22 suş dört kümeye, serogrup pozitif olan 47 suş 12 kümeye ayrılmıştır. Bu çalışmada *P. multocida* suşları, kullanılan antimikrobiyal ajanların çoğuna duyarlı bulunmuştur. Antimikrobiyal direncin ve virülens gen modelinin RAPD ile birleştirilmiş bir analizi, belirli bir *P. multocida* suşunun genetik olarak özdeş görüldüğünü göstermiştir. Bu bulgu araştırmacıların suşun tek bir çiftlikte kalıcı olduğu düşüncesine yöneltmiştir (Lee et al., 2012). Hotchkiss et al. (2011) tarafından yapılan araştırma doğrultusunda, 105 İskoç izolatu arasında 15 RAPD profili saptanmıştır. Araştırmanın yapıldığı çiftliklerin çoğunluğunda, çiftlikte bulunan tüm hayvanlardan elde edilen RAPD profilleri ayırt edilemez olarak değerlendirilmiştir. Kalan beş çiftlikten yalnızca iki RAPD profili saptanmıştır. Ayrıca, 140 Fransız izolatından 23 RAPD profili çizilmiştir. Araştırılan 20 çiftlikten 10’undan örneklenen buzağılardan yalnızca bir profil oluşturulmuştur ve bu RAPD

profilinin Fransız izolatlarının % 60'ını (84/140) oluşturduğu tespit edilmiştir. Ancak çiftlikler arası profillerine kıyasla çiftlik içinden elde edilen RAPD profillerinde heterojenlik tespit edilmiştir. Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde PFGE'nin, RAPD'den daha ayırmacı olduğu görülürken, MLST'nin çiftlik düzeyinde epidemiyoloji için ayırım gücünün yeterli olmadığı kanısına varılmıştır.

Ülkemizde Elazığ'da 30 sığır, 15 koyun ve 1 keçiden izole edilen *P. multocida* izolatı ile yapılan RAPD-PCR analizi sonucunda sığırlardan 2, koyunlardan 3 farklı ayırt edici profil tespit edildiği ve bunun sonucunda izolatlar içerisinde çok az miktarda heterojenite olduğu bildirilmiştir (Özbey vd., 2004). Bu tezde yapılan RAPD-PCR analizi sonucunda serogrup A pozitif izolatlar içerisinde 4 (%7,14), serogrup B pozitif izolatlar içerisinde 3 (%5,36), serogrup D pozitif izolatlar içerisinde 4 (%7,14), serogrup E pozitif izolatlar içerisinde 14 (%25,00), serogrup F pozitif izolatlar içerisinde 1 (%1,79), serogruplandırılmayan izolatlar içerisinde ise 30 (%53,57) RAPD profili / genotipi olduğu ve 92 adet *P. multocida* izolatından toplam 56 farklı RAPD profili / genotipi olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen izolatların kantitatif antibiyotiplendirmesi ile farklı serogruplara ait *P. multocida* izolatları arasındaki baskın özellik taşıyan antibiyotik duyarlılık profilinin ortaya konulması amaçlandı. Bununla beraber, her serogrup içerisinde belirlenen baskın antibiyotiplerin seçildiği, biyofilm ve çoklu antibiyotik direnci yönünden incelendiği ve aşı suşu olma ihtimali yönünden tekli antibiyotipler ile karşılaştırıldığı genel bir değerlendirme yapıldı. Serogrup A'ya dâhil olduğu belirlenen izolatlar incelendiğinde, baskın antibiyotipin AAE olduğu gözlenirken, serogrup B içinde yer alan 4 izolatın, çalışmada temel alınan benzerlik eşik değeri (% 75) dikkate alındığında benzersiz antibiyotipler olması nedeniyle tamamı değerlendirmeye alındı. Serogrup D incelendiğinde ADB antibiyotipinin baskın olduğu sonucuna varıldı. Serogruplandırılabilen izolatlar arasında serogrup A ile eşit sayıda izolatı içeren serogrup E, antibiyotiplendirme sonunda 3 benzersiz tip ve 4 küme oluşturdu. Kümeler arasında en fazla izolat sayısına sahip baskın antibiyotip AEG olarak saptanırken bu izolatlar arasındaki benzerliğin % 79 olduğu görüldü. Bununla birlikte AEE antibiyotipinin sadece iki izolat içermekle birlikte % 98 oranında benzer olduğu ortaya konuldu. Serogruplandırılmayan çok sayıda (44 adet) izolat içerisinde yapılan antibiyotiplendirme sonucunda, baskın antibiyotipin ANK olduğu, 11 izolatın bu grup içerisinde yer aldığı ve izolatlar arasındaki çeşitliliğin oldukça fazla olduğu gözlemlendi.

Baskın antibiyotiplerin ÇİD ve biyofilm oluşturma durumları da çalışma kapsamında değerlendirildi. Serogrup A'yı temsilen alınan ve 10 izolattan oluşan AAE'nin % 80 oranında biyofilm negatif, % 20 oranında biyofilm pozitif, % 90 oranında ÇİD negatif ve % 10 oranında ÇİD pozitif olduğu görüldü. Serogrup B içerisindeki dört antibiyotip bu iki özellik bakımından incelendiğinde yalnızca ABA antibiyotipinin her iki özellik bakımından da pozitif olduğu görüldü. Serogrup D içerisinde de 3 izolattan oluşan baskın antibiyotip ADB, % 100 oranında biyofilm pozitif, % 0 oranında ÇİD pozitif olarak belirlendi. Serogrup E içindeki AEG antibiyotipinin % 20 oranında biyofilm pozitif, % 0 oranında ÇİD pozitif olduğu görüldü. Serogrup F içerisinde zaten tek bir izolat bulunduğu için incelemeye alınmadı. Serogruplandırılmayan izolatlar içerisinde baskın antibiyotip olan ve 11 izolattan oluşan ANK incelendiğindeyse % 81,1 oranında biyofilm pozitif, % 0 oranında ÇİD pozitif olduğu görüldü. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, tüm serogruplar içerisindeki baskın antibiyotiplerden biyofilm özelliği bakımından pozitif ve çoklu ilaç direncine sahip baskın karakterde bir grup seçmenin mümkün olmadığı saptandı. Aksine biyofilm ve ÇİD pozitif izolatların daha küçük gruplar halinde veya tek başlarına bulunduğu ve diğer izolatlara antibiyotip bakımından benzerliğinin düşük olduğu ve aşı suşu olarak bu tür bireysel gruplara yönelmenin daha uygun olacağı kanaatine varıldı.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antibakteriyel ajanlar her ne kadar bakteriyel enfeksiyonları kontrol etmek için önemli bir yaklaşım olsa da, özellikle bakterilerin geliştirdikleri direnç durumları nedeniyle, hayvan enfeksiyonlarını yönetmek için profilaksi gibi diğer olası kontrol önlemlerinin alınma ihtiyacı açıkça ortadadır. Bakteriyel hastalıkları antibiyotiklerle tedavi etmek yerine, bu hastalıklardan korunmak için aşılama en iyi yöntemlerden birisidir. Aşılama, çiftlik hayvanlarının sağlık ve refahını iyileştirmede ve hayvanlardan insanlara bulaşmayı önlemede önemli bir rol oynar ve böylece önemli bir halk sağlığı stratejisi de oluşturur. SSHK'daki önemli bakteriyel etkenlerden birisi olan *P. multocida*'ya karşı, genellikle diğer etkenlerle kombine şekilde olmakla birlikte, tüm hücre bakterin ve canlı attenüe aşılar kullanılmaktadır. Ayrıca asellüler, rekombinant ve DNA aşıları geliştirme çalışmaları da devam etmektedir. Bakteriyel aşılamanın en önemli eksikliklerinden biri, çapraz serogrup/serotip korumasının olmamasıdır. Ayrıca, bağışıklık süresinin de kısa olması da önemli bir sorundur. Bu sorunların çözümü için gerekli stratejilerden birisi lokal/bölgesel olarak veya ülke genelinde baskın serogrup/serotiplerin belirlenmesi ve aşı bileşimine dâhil edilmesi olarak düşünülmektedir. Dünya genelinde son yıllarda SSHK oluşumundan sorumlu etkenlerin belirlenmesi, biyotip ve serogruplandırmalarının yapılması, antibiyotik direncinin belirlenmesi ve özellikle aşı çalışmaları artmaktadır. Ülkemizde ticari olarak farklı firmaların SSHK'ya karşı standart ve yerli olmayan *P. multocida* suşlarını içeren kombine aşılar bulunmasına rağmen, aşılar enfeksiyon oluşumunun önüne geçememekte ve yeterli profilaksiyi sağlamamaktadır. Bu durumun SSHK'ya neden olan bakterilerin serogrup ve biyotip çeşitliliğinden, aşı suşlarının güncel olmamasından ve ülkemizde yaygın ve/veya dominant olarak görülen serogrup ve biyotipleri temsil edecek şekilde bir içeriğe sahip olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle aşı suşu seçiminde enfeksiyona neden olan yaygın serogrupların belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Tez çalışması kapsamında sığır akciğer örneklerinden *P. multocida* izolasyonu, karakterizasyonu ve aşı suşu olma potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aşı suşu belirlenmesinde temel kriter olarak biyofilm üretme durumu dikkate alınmış ve biyofilm pozitif olarak belirlenen, filogenotip ve antibiyotip yönünden karakterize edilen suşlardan virülens genleri taşıma durumu ile beraber antibiyotik direnç durumu göz önüne alınarak, her serogrup için 1'er adet potansiyel aşı suşu belirlenmiştir. Serogrup F'ye dâhil olan

sadece 1 izolat olduğu için, biyofilm üretimi negatif olmasına rağmen potansiyel aşı suşu olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda potansiyel aşı suşu olarak seçilmiş olan suşlarla 4 monovalan, 1 bivalan ve 1 tetravalan aşı prototipi geliştirilmesi planlanmaktadır. Geliştirilmesi planlanan aşı prototiplerinin biyofilm üreten suşlardan oluşması (ticari olarak biyofilm tabanlı bir *P. multocida* aşısı bulunmamaktadır), dört serogruptan monovalan aşılarda valide edilmesi (otovaksin olarak ticarileştirme potansiyeli bulunmaktadır), bivalan ve tetravalan aşılarda valide edilmesi (ticari olarak mevcut aşılarda ya serogrup belirtilmemiştir ya da sadece serogrup A'yı içermektedir ve dolayısı ile çoklu serogrup nedenli enfeksiyonlarda kullanılma ve ticarileştirilme potansiyeli bulunmaktadır) için hedef hayvan denemelerinin yapılmasının gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdullahi, M.Z., Gilmour, N.J. and Poxton, I.R. (1990). Outer membrane proteins of bovine strains of *Pasteurella multocida* type A and their doubtful role as protective antigens. *Journal of Medical Microbiology*, 32, 55-61.
- Abed, A.H., El-Seedy, F.R., Hassan, H.M., Nabih, A.M., Khalifa, E., Salem, S.E., Wareth, G. and Menshaw, A.M.S. (2020). Serotyping, genotyping and virulence genes characterization of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates recovered from pneumonic cattle calves in North Upper Egypt. *Veterinary Sciences*, 7(4), 174.
- Abera, D., Sisay, T. and 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. *Journal of Bacteriology Research*, 6(5), 32-41.
- Adler, B., Bulach, D., Chung, J., Doughty, S., Hunt, M., Rajakumar, K., Serrano, M., Van Zanden, A., Zhang, Y. and Ruffolo, C. (1999). Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *Journal of Biotechnology*, 73, 83-90.
- Ahmad, I., Hao, H., Huang, L., Sanders, P., Wang, X., Chen, D., Tao, Y., Xie, S., Xiuhua, K., Li, J., Dan, W. and Yuan, Z. (2015). Integration of PK/PD for dose optimization of Cefquinome against *Staphylococcus aureus* causing septicemia in cattle. *Frontiers in Microbiology*, 6, 588.
- Akkoyunlu, M., Janson, H., Ruan, M. and Forsgren, A. (1996). Biological activity of serum antibodies to a nonacylated form of lipoprotein D of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, 64, 4586-4592.
- Al-Haddawi, M., Jasni, H., Zamri-Saad, S., Mutalib, M., Zulkifli, A., Son, I. and Sheikh-Omar, A. (2000). *In vitro* study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lung, and aorta of rabbits. *The Veterinary Journal*, 159, 274-281.
- Alhamami, T., Chowdhury, P.R., Gomes, N., Carr, M., Veltman, T., Khazandi, M., Mollinger, J., Deutscher, A.T., Turni, C., Mahdi, L., Venter, H., Abraham, S., Djordjevic, S.P. and Trott, D.J. (2021). First emergence of resistance to macrolides and tetracycline identified in *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates from beef feedlots in Australia. *Microorganisms*, 9(6), 6.
- Ali, H.A., Sawada, T., Hatakeyama, H., Ohtsuki, N. and Itoh, O. (2004). Characterization of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*, 100, 43-53.
- Allen, J.W., Viel, L., Bateman, K.G., Rosendal, S., Shewen, P.E. and Physick-Sheard, P. (1991). The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55, 341-346.
- Allen, J.W., Viel, L., Bateman, K.G., Nagy, E., Rosendal, S. and Shewen, P.E. (1992). Serological titers to bovine herpesvirus 1, bovine viral diarrhea virus, parainfluenza 3 virus, bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica* in feedlot calves with respiratory disease: associations with bacteriological and pulmonary cytological variables. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56, 281-288.
- Al-Maary, K.S., Dawoud, T.M., Mubarak, A.S., Hessain, A.M., Galal, H.M., Kabli, S.A. and Mohamed, M.I. (2017). Molecular characterization of the capsular antigens of *Pasteurella multocida* isolates using multiplex PCR. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(2), 367-370.

- Apley, M.D. and Coetzee, J.F. (2013). Antimicrobial drug use in cattle. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd., pp.: 495-518.
- Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Lung, L.T., Sekawi, Z., Ghaznavi-Rad, E., and Pei, C.P. (2012). Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 417-427.
- Autio, T., Pohjanvirta, T., Holopainen, R., Rikula, U., Pentikainen, J., Huovilainen, A., Rusanen, H., Soveri, T., Sihvonen, L. and Pelkonen, S. (2007). Etiology of respiratory disease in nonvaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Veterinary Microbiology*, 119, 256-265.
- Ayalew, S., Confer, A.W., Payton, M.E., Garrels, K.D., Shrestha, B., Ingram, K.R., Montelongo, M.A., and Taylor, J.D. (2008). *Mannheimia haemolytica* chimeric protein vaccine composed of the major surface-exposed epitope of outer membrane lipoprotein PlpE and the neutralizing epitope of leukotoxin. *Vaccine*, 26, 4955-4961.
- Babiuk, L.A., van Drunen, L., Hurk, S., and Tiloo, S.K. (2004). Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis and infectious pustular balanoposthitis. In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. 2nd edition, *Infectious disease of livestock*, 2. Cape Town (South Africa): Oxford University Press; pp.: 875-886.
- Badie, G., Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L. and Mahan, M.J. (2007). Altered levels of *Salmonella* DNA adenine methylase are associated with defects in gene expression, motility, flagellar synthesis, and bile resistance in the pathogenic strain 14028 but not in the laboratory strain LT2. *Journal of Bacteriology*, 189, 1556-1564.
- Basagoudanavar, S.H., Singh, D.K., and Varshney, B.C. (2006). Immunization with outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* (6:B) provides protection in mice. *Journal of Veterinary Medicine A Physiology, Pathology & Clinical Medicine*, 53(10), 524-530.
- Batu, A. ve Elverdi, R. (1973). Türkiye’de sığır ve mandalardan izole edilen *Pasteurella* serotiplerinin tayini. *Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Gurubu*, VHAG-74, 1-11.
- Berge, A.C.B., Epperson, W.B. and Pritchard, R.H. (2005). Assessing the effect of a single dose florfenicol treatment in feedlot cattle on the antimicrobial resistance patterns in faecal *Escherichia coli*. *Veterinary Research*, 36(5-6), 723-734.
- Beyi, A.F., Brito-Goulart, D., Hawbecker, T., Slagel, C., Ruddell, B., Hassall, A., Dewell, R., Dewell, G., Sahin, O., Zhang, Q. and Plummer, P.J. (2021). Danofloxacin treatment alters the diversity and resistome profile of gut microbiota in calves. *Microorganisms*, 9(10), 10.
- Biswas, A., Shivachandra, S.B., Saxena, M.K., Kumar, A.A., Singh, V.P. and Srivastava, S.K. (2004). Molecular variability among strains of *Pasteurella multocida* isolated from an outbreak of haemorrhagic septicaemia in India. *Veterinary Research Communications*, 28(4), 287-298.
- Blanco-Viera, F.J., Trigo, F.J., Jaramillo-Meza, L. and Aguilar-Romero, F. (1995). Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 37, 121-126.
- Boianovskiy, S., Ushkalov, V., Vygovska, L., Mazur, T., Ishchenko, L., Rudnieva, K., Ushkalov, A. and Melnyk, V. (2022). Studija znakov patogenosti kod *Pasteurella multocida*, izolirane iz životinja različitih vrsta. *Veterinarska Stanica*, 54(3), 301-310.
- Borrathybay, E., Sawada, T., Kataoka, Y., Ohtsu, N., Takagi, M., Nakamura, S. and 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., Tarrago, R., Garrido, M.E., Campoy, S., Fernandez de Henestrosa, A.R., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I. and Barbe, J. (2001). Expression of the *Pasteurella multocida* ompH gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiology Letters*, 203, 35-40.
- Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I. and Barbe, J. (2002a). *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiology Letters*, 210, 201-208.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Llagostera, M., Perez De Rozas, A.M., Badiola, I. and Barbe, J. (2002b). Characterization of the *Pasteurella multocida* *hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infection and Immunity*, 70, 5955-5964.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbe, J. and Llagostera, M. (2004). *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin and haemoglobin-binding proteins. *Veterinary Microbiology*, 99, 103-112.
- Boukahil, I. and Czuprynski, C.J. (2018). Mutual antagonism between *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* when forming a biofilm on bovine bronchial epithelial cells *in vitro*. *Veterinary Microbiology*, 216, 218-222.
- Bourély, C., Cazeau, G., Jouy, E., Haenni, M., Madec, J.Y., Jarrige, N., Leblond, A. and Gay, E. (2019). Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets. *Veterinary Microbiology*, 235, 280-284.
- Boyce, J.D. and Adler, B. (2000). The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infection and Immunity*, 68, 3463-3468.
- Boyce, J.D., Cullen, P.A., Nguyen, V., Wilkie, I. and Adler, B. (2006). Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the *in vivo* environment of the natural host. *Proteomics*, 6, 870-880.
- Bresser, P., Virkola, R., Jonsson-Vihanne, M., Jansen, H., Korhonen, T. and van Alphen, L. (2000). Interaction of clinical isolates of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* with mammalian extracellular matrix proteins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 28, 129-132.
- Capitini, C.M., Herrero, I.A., Patel, R., Ishitani, M.B. and Boyce, T.G. (2002). Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clinical Infectious Diseases*, 34, E74-E76.
- Carpenter, T., Khalid, S., and Sansom, M.S. (2007). A multidomain outer membrane protein from *Pasteurella multocida*: modelling and simulation studies of PmOmpA. *Biochimica Biophysica Acta*, 1768, 2831-2840.
- Catry, B., Chiers, K., Schwarz, S., Kehrenberg, C., Decostere, A. and 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., Kehrenberg, C., de Kruif, A., and Haesebrouck, F. (2006). Detection of tetracycline-resistant and susceptible pasteurellaceae in the nasopharynx of loose group-housed calves. *Veterinary Research and Community*, 30, 707-715.
- Chaudhuri, P. and Goswami, P.P. (2001). Cloning of 87 kDa outer membrane protein gene of *Pasteurella multocida* P52. *Research in Veterinary Science*, 70, 255-256.
- Chen, L., Paulsen, D.B., Scruggs, D.W., Banes, M.M., Reeks, B.Y. and Lawrence, M.L. (2003). Alteration of DNA adenine methylase (Dam) activity in *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous mutation frequency and attenuation in mice. *Microbiology*, 149, 2283-2290.

- Choi-Kim, K., Maheswaran, S.K., Felice, L.J. and Molitor, T.W. (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.
- Chomnawang, M.T., Nabnuengsap, J., Kittiworakarn, J. and Pathanasophon, P. (2009). Expression and immunoprotective property of a 39-kDa PlpB protein of *Pasteurella multocida*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(11), 1479-1485.
- Christensen, H., Sajid, S.M., Bisgaard, M., Magistrali, C.F., Massacci, F.R., Liman, M., Menke, T., Bischoff, H. and Olsen, J.E. (2022). Prediction of *Pasteurella multocida* serotypes based on whole genomic sequences. *Veterinary Microbiology*, 271, 109492.
- Chung, J.Y., Wilkie, I., Boyce, J., Townsend, K., Frost, A., Ghoddusi, M. and Adler, B. (2001). Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infection and Immunity*, 69, 2487-2492.
- Cid, D., García-Alvarez, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. and Vela, A.I. (2019). *Pasteurella multocida* isolates associated with ovine pneumonia are toxigenic. *Veterinary Microbiology*, 232, 70-73.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2019). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 4th ed. CLSI supplement VET08, Wayne, Pennsylvania.
- Cole, S., Guiney, D. and Corbeil, L. (1993). Molecular analysis of a gene encoding a serum-resistance-associated 76 kDa surface antigen of *Haemophilus somnus*. *Journal of General Microbiology*, 139, 2135-2143.
- Collins, F.M. (1977). Mechanisms of acquired resistance to *Pasteurella multocida* infection: a review. *The Cornell Veterinarian*, 67, 103-138.
- Confer, A.W. (1993). Immunogens of *Pasteurella*. *Veterinary Microbiology*, 37, 353-368.
- Confer, A.W., Nutt, S.H., Dabo, S.M., Panciera, R.J. and Murphy, G.L. (1996). Antibody responses of cattle to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3. *American Journal of Veterinary Research*, 57, 1453-1457.
- Cox, A.J., Hunt, M.L., Boyce, J.D. and Adler, B. (2003). Functional characterization of HgbB, a new hemoglobi binding protein of *Pasteurella multocida*. *Microbial Pathogenesis*, 34, 287-296.
- Cucco, L., Massacci, F.R., Sebastiani, C., Mangili, P., Bano, L., Cocchi, M., Luppi, A., Ortenzi, R., Pezzotti, G. and Magistrali, C.F. (2017). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* strains isolated from hosts affected by various diseases in Italy. *Veterinaria Italiana*, 53(1), 21-27.
- Cusack, T.P., Ashley, E.A., Ling, C.L., Rattanavong, S., Roberts, T., Turner, P., Wangrangsimakul, T. and Dance, D.A.B. (2019). Impact of CLSI and EUCAST breakpoint discrepancies on reporting of antimicrobial susceptibility and AMR surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 910-911.
- Dabo, S.M., Confer, A.W. and Murphy, G.L. (1997). Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Veterinary Microbiology*, 54, 167-183.
- Dabo, S.M., Debey, B., Montelongo, M. and Confer, A. (1999). Genomic DNA restriction site heterogeneity in bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates detected with an rRNA probe. *Journal of Medical Microbiology*, 48, 279-286.
- Dabo, S.M., Confer, A.W. and Lu, Y.S. (2000). Single primer polymerase chain reaction fingerprinting for *Pasteurella multocida* isolates from laboratory rabbits. *American Journal of Veterinary Research*, 61, 305-309.
- Dabo, S.M., and Confer, A.W. (2001). PmFHA, GenBank accession no.: AY035342.

- Dabo, S.M., Confer, A.W. and Quijano-Blas, R.A. (2003). Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathogenesis*, 35, 147-157.
- Dabo, S.M., Confer, A.W. and Hartson, S.D. (2005). Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Veterinary Microbiology*, 110, 265-275.
- Dabo, S., Taylor, J. and Confer, A. (2007). *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 8(2), 129-150.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D., and Confer, A.W. (2008). *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health and Research Reviews*, 8, 129-150.
- Dagleish, M.P., Finlayson, J., Bayne, C., MacDonald, S., Sales, J. and Hodgson, J.C. (2010). Characterization and time course of pulmonary lesions in calves after intratracheal infection with *Pasteurella multocida* A:3. *Journal of Comparative Pathology*, 142(2), 157-169.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R., Baillie, S. and Caffrey, B. (2003a). Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 59-67.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R. and Caffrey, B. (2003b). Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. *Veterinary Microbiology*, 91, 169-182.
- Davies, R.L. and Lee, I. (2004). Sequence diversity and molecular evolution of the heat-modifiable outer membrane protein gene (OmpA) of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *Journal of Bacteriology*, 186, 5741-5752.
- DeAngelis, P.L. and White, C.L. (2002). Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type D. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 7209-7213.
- DeRosa, D.C., Mechor, G.D., Staats, J.J., Chengappa, M.M. and Shryock, T.R. (2000). Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 327-332.
- Doughty, S.W., Ruffolo, C.G. and Adler, B. (2000). The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 72, 79-90.
- Dowling, A., Hodgson, J.C., Dagleish, M.P., Eckersall, P.D. and Sales, J. (2004). Pathophysiological and immune cell responses in calves prior to and following lung challenge with formalin killed *Pasteurella multocida* biotype A:3 and protection studies involving subsequent homologous live challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100, 197-207.
- Dowling, P.M. (2013a). Aminoglycosides and Aminocyclitols. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd. pp.: 233-255
- Dowling, P.M. (2013b). Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd. pp.: 269-277
- Dungworth, D.C. (1985). The respiratory system. In: Jubb KVF, Kennedy PC and Palmer N (eds) *Pathology of Domestic Animals*, Orlando, FL: Academic Press, pp.: 448-489.
- Dziva, F., Christensen, H., van Leengoed, L.A., Mohan, K. and Olsen, J.E. (2004). Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. *Veterinary Microbiology*, 102, 117-122.

- Einarsdottir, T., Gunnarsson, E., Sigurdardottir, O.G., Jorundsson, E., Fridriksdottir, V., Thorarinsdottir, G.E. and Hjartardottir, S. (2016). Variability of *Pasteurella multocida* isolated from Icelandic sheep and detection of the *toxA* gene. *Journal of Medical Microbiology*, 65(9), 897-904.
- El Garch, F., de Jong, A., Simjee, S., Moyaert, H., Klein, U., Ludwig, C., Marion, H., Haag-Diergarten, S., Richard-Mazet, A., Thomas, V. and Siegwart, E. (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.
- Elsayed, M.S.A.E., Eldsouky, S.M., Roshdy, T., Said, L., Thabet, N., Allam, T., Mohammed, A.B.A., Nasr, G.M., Basiouny, M.S.M., Akl, B.A., Nader, M.M., Hasan, A.S. and Salah, A. (2021). Virulence determinants and antimicrobial profiles of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and humans in Egypt. *Antibiotics*, 10(5), 5.
- El-Seedy, F.R., Hassan, H.M., Nabih, A.M., Salem, S.E., Khalifa, E., Menshawy, A. M.S. and Abed, A.H. (2020). Respiratory affections in calves in upper and middle Egypt: Bacteriologic, immunologic and epidemiologic studies. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 8(5), 558-569.
- Elshemey, T. and Abd-Elrahman, A.H. (2013). Hemorrhagic septicemia outbreak as a consequence to SAT2FMD infection in Buffalo and Cattle in Alexandria province, Egypt. *Life Science Journal*, 10, 816-822.
- Erbaş, G. ve Kaya, O. (2008). Aydın ve İzmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi*, 30(44), 7-14.
- Esslinger, J., Seleim, R.S., Herrmann, G. and Blobel, H. (1994). Adhesion of *Pasteurella multocida* to HeLa cells and to macrophages of different animal species. *Revue de Medicine Veterinaire*, 145, 49-53.
- Ewers, C., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Kießling, S., Filter, M., and Wieler, L.H. (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology*, 114(3), 304-317.
- Fajfar-Whetstone, C.J., Coleman, L., Biggs, D.R. and Fox, B.C. (1995). *Pasteurella multocida* septicemia and subsequent *Pasteurella dagmatis* septicemia in a diabetic patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 202-204.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B. and Svanborg, C. (2006). Mechanism of pathogen specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *European Journal of Immunology*, 36, 267-277.
- Frank, G.H., Briggs, R.E. and Zehr, E.S. (1995). Colonization of the tonsils and nasopharynx of calves by rifampicin-resistant *Pasteurella haemolytica* and its inhibition by vaccination. *American Journal of Veterinary Research*, 56, 866-869.
- Fuller, T.E., Kennedy, M.J. and Lowery, D.E. (2000). Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature tagged mutagenesis. *Microbial Pathogenesis*, 29, 25-38.
- Fulton, R.W., Purdy, C.W., Confer, A.W., Saliki, J.T., Loan, R.W., Briggs, R.E. and Burge, L.J. (2000). Bovine viral diarrhea 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, 151-159.
- Furian, T.Q., Borges, K.A., Laviniki, V., Rocha, S.L., de Almeida, C.N., do Nascimento, V.P., Salle, C.T.P. and Moraes, H.L. (2016). Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 210-216.

- Gagea, M.I., Bateman, K.G., van Dreumel, T., McEwen, B.J., Carman, S., Archambault, M., Shanahan, R.A. and Caswell, J.L. (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. and Galdiero, E. (2000). Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells *in vitro* by protein H and LPS of *Pasteurella multocida*. *Immunobiology*, 202, 226-238.
- Garrido, M.E., Bosch, M., Medina, R., Bigas, A., Llagostera, M., Perez De Rozas, A.M., Badiola, I. and Barbe, J. (2003). Fur independent regulation of the *Pasteurella multocida hbpA* gene encoding a haemin-binding protein. *Microbiology*, 149, 2273-2281.
- Gatto, N.T., Dabo, S.M., Hancock, R.E., and Confer, A.W. (2002). Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA-equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A:3 (Omp28). *Veterinary Microbiology*, 87, 221-235.
- Gharibi, D., Haji, H., Mohammad, R., Ghorbanpoor, M. and Barzegar, S. (2017). Virulence gene profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle and buffalo. *Veterinarski Arhiv*, 87, 677-690.
- Giguère, S. (2013). Macrolides, Azalides, and Ketolides. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd. pp.: 211-231
- Glorioso, J.C., Jones, G.W., Rush, H.G., Pentler, L.J., Darif, C.A. and Coward, J.E. (1982). Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infection and Immunity*, 35, 1103-1109.
- Gresham, C.N., Confer, A.W., Bush, L.J. and Rummage, J.A. (1984). Serum and colostrum antibody to *Pasteurella* species in dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 2227-2230.
- Griffin, D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13(3), 367-377.
- Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Wieler, L.H., Froyman, R., Friederichs, S. and Filios, S. (2007). Comparative quantification of the *in vitro* activity of veterinary fluoroquinolones. *Veterinary Microbiology*, 124(1), 73-81.
- Gülaydın, Ö. (2018). Distribution of virulence gene in *Pasteurella multocida* phenotypes and genotypes isolated from bovine respiratory tract. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı.
- Güler, L., Gündüz, K. ve Sarışahin, A.S. (2013). Capsular typing and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from different hosts. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 843-849.
- Hallstrom, T., Trajkovska, E., Forsgren, A. and Riesbeck, K. (2006). *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin. *The Journal of Immunology*, 177, 430-436.
- Haritani, M., Narita, M., Murata, H., Hashimoto, K. and Takizawa, T. (1989). Immunoperoxidase evaluation of pneumonic lesions induced by *Pasteurella multocida* in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 2162-2167.
- Harmon, B.G., Glisson, J.R., Latimer, K.S., Steffens, W.L. and Nunnally, J.C. (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, J.D. and Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*, 265, 1-10.

- Harper, M., Boyce, J.D., Cox, A.D., St Michael, F., Wilkie, I.W., Blackall, P.J. and Adler, B. (2007). *Pasteurella multocida* expresses two lipopolysaccharide glycoforms simultaneously, but only a single form is required for virulence: identification of two acceptor-specific heptosyl I transferases. *Infection and Immunity*, 75, 3885-3893.
- Heusipp, G., Falker, S. and Schmidt, M.A. (2007). DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 1-7.
- Hirose, K., Kobayashi, H., Ito, N., Kawasaki, Y., Zako, M., Kotani, K., Ogawa, H. and 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.
- Hodgins, D.C. and Shewen, P.E. (2004). *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. infections. In: Coetzer, J.A.W. and Tustin, R.C., editors. 2nd edition, *Infectious Disease of Livestock*, 3. Cape Town (South Africa), Oxford University Press; pp.: 1672-1676.
- Hotchkiss, E.J., Hodgson, J.C., Schmitt-van de Leemput, E., Dagleish, M.P. and Zadoks, R.N. (2011). Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in dairy and beef calves. *Veterinary Microbiology*, 151(3), 329-335.
- Hsuan, S.L., Liao, C.M., Huang, C., Winton, J.R., Chen, Z.W., Lee, W.C., Liao, J.W., Chen, T.H., Chiou, C.J., Yeh, K.S. and Chien, M.S. (2009). Efficacy of a novel *Pasteurella multocida* vaccine against progressive atrophic rhinitis of swine. *Vaccine*, 27(22), 2923-2929.
- Hunt Gerardo, S., Citron, D.M., Claros, M.C., Fernandez, H.T. and Goldstein, E.J. (2001). *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and alphaglucosidase activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2558-2564.
- Ifeanyi, F.I. ve Bailie, W.E. (1992). Passive protection of mice with antiserum to neuraminidase from *Pasteurella multocida* serotype A:3. *Veterinary Research Communications*, 16, 97-105.
- Inatsuka, C.S., Julio, S.M. and Cotter, P.A. (2005). *Bordetella filamentous* hemagglutinin plays a critical role in immuno modulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 18578-18583.
- Ishiguro, K., Kitajima, T., Kubota, S., Amimoto, K., Oda, K., Fukuyama, S. and Shimizu, Y. (2005). Experimental infection of calves with *Pasteurella multocida* serovar A:3 isolated in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67, 817-819.
- Iwashita, N., Nomura, R., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Matayoshi, S., Kadota, T., Shirahata, S., Ohzeki, L., Arai, N., Yasuda, J., Yasuda, H., Inaba, H., Matsumoto-Nakano, M., Nakano, K. and Asai, F. (2019). Identification and molecular characterization of *Porphyromonas gulae* *fimA* types among cat isolates. *Veterinary Microbiology*, 229, 100-109.
- Jacques, M., Belanger, M., Diarra, M.S., Dargis, M. and Malouin, F. (1994). Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and *in vivo*. *Microbiology*, 140, 263-270.
- Jamali, H., Rezagholipour, M., Fallah, S., Dadrasnia, A., Chelliah, S., Velappan, R.D., Wei, K.S.C. and Ismail, S. (2014). Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Pasteurella multocida* isolated from bovine respiratory infection. *The Veterinary Journal*, 202(2), 381-383.
- Jing, W. and DeAngelis, P.L. (2003). Analysis of the two active sites of the hyaluronan synthase and the chondroitin synthase of *Pasteurella multocida*. *Glycobiology*, 13(10), 661-671.

- Jolley, K.A., Bray, J.E. and Maiden, M.C.J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124.
- Kachlany, S.C., Planet, P.J., DeSalle, R., Fine, D.H. and Figurski, D.H. (2001). Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plaque to pond scum. *Trends in Microbiology*, 9, 429-437.
- Kadel, W.L., Chengappa, M.M. and Herren, C.E. (1985). Field trial evaluation of a *Pasteurella* vaccine in preconditioned and nonpreconditioned lightweight calves. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 1944-1948.
- Kadlec, K., Brenner, M.G., Sweeney, M.T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., Watts, J.L. and Schwarz, S. (2011). Molecular basis of macrolide, triamilide, and lincosamide resistance in *Pasteurella multocida* from Bovine Respiratory Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 2475-2477.
- Kandimalla, K., Awati, B., Putty, K., Ram, V.K.S., Yella, N.R., Patil, N.A., Bhoyar, R., Choudapur, M.K., Karate, A., Lunavat, G., Akkaldevi, J. and Ganji, V. (2022). Evaluation of biofilm formation capacity of *Pasteurella multocida* and its relationship with antibiotic resistance. *Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology*, 18(5), 5.
- Katoch, S., Sharma, M., Patil, R. D., Kumar, S. and Verma, S. (2014). *In vitro* and *in vivo* pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different *ompA*. *Veterinary Research Communications*, 38(3), 183-191.
- Katsuda, K., Hoshinoo, K., Ueno, Y., Kohmoto, M. and Mikami, O. (2013). Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. *Veterinary Microbiology*, 167(3), 737-741.
- Kehrenberg, C., Catry, B., Haesebrouck, F., de Kruif, A. and Schwarz, S. (2005). tet(L)-mediated tetracycline resistance in bovine *Mannheimia* and *Pasteurella* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 403-406.
- Khamesipour, F., Momtaz, H. and Azhdary M.M. (2014). Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Frontiers in Microbiology*, 5, 536.
- Kong, L.C., Gao, D., Gao, Y.H., Liu, S.M. and Ma, H.X. (2014). Fluoroquinolone resistance mechanism of clinical isolates and selected mutants of *Pasteurella multocida* from Bovine Respiratory Disease in China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(12), 1655-1657.
- Kroll, J.S., Langford, P.R., Wilks, K.E. and Keil, A.D. (1995). Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: Phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiology*, 141, 2271-2279.
- Kumar, A.A., Shivachandra, S.B., Biswas, A., Singh, V.P. and Srivastava, S.K. (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.P., Agrawal, R.K. and 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(4), 573-578.
- Lee, J., Kim, Y.B. and Kwon, M. (2007). Outer membrane protein H for protectiimmunity against *Pasteurella multocida*. *Journal of Microbiology*, 45, 179-184.

- Lee, K.E., Jeoung, H.Y., Lee, J.Y., Lee, M.H., Choi, H.W., Chang, K.S., Oh, Y.H. and An, D.J. (2012). Phenotypic characterization and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* isolated from Korean Pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(5), 567-573.
- Lillie, L.E. (1974). The bovine respiratory disease complex. *Canadian Veterinary Journal*, 15, 233-242.
- Liu, B. and Pop, M. (2009). ARDB—Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Research*, 37, D443-D447.
- Liu, Q., Hu, Y., Li, P. and Kong, Q. (2019). Identification of fur in *Pasteurella multocida* and the potential of its mutant as an attenuated live vaccine. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 5.
- Lo, M., Boyce, J.D., Wilkie, I.W. and Adler, B. (2004). Characterization of two lipoproteins in *Pasteurella multocida*. *Microbes and Infection*, 6, 58-67.
- Lopez, A. (2007). Respiratory system. In: McGarvin MD and Zachary JF (eds) *Pathological Basis of Veterinary Disease*, St. Louis, MO: Mosby Elsevier, pp.: 522-523.
- Lu, Y.S., Aguila, H.N., Lai, W.C. and Pakes, S.P. (1991). Antibodies to outer membrane proteins but not to lipopolysaccharide inhibit pulmonary proliferation of *Pasteurella multocida* in mice. *Infection and Immunity*, 59, 1470-1475.
- Luo, Y., Zeng, Q., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Cheng, I.H. and Wang, C. (1999). Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine*, 17, 821-831.
- Maheswaran, S.K., Thumbikat, P. and Dileepan, T. (2002). Current knowledge on pathogenesis of lung injury caused by *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in the bovine. In *XXII World Buiatrics Congress, Hannover, Germany*, pp.: 160-167.
- Mathy, N.L., Mathy, J.P., Lee, R.P., Walker, J., Lofthouse, S. and Meeusen, E.N. (2002). Pathological and immunological changes after challenge infection with *Pasteurella multocida* in naive and immunized calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85, 179-188.
- Matsuoka, T., Gale, C., Ose, E.E. and Berkman, R.N. (1966). Calfhood immunization against an experimental *Parainfluenza* and *Pasteurella* challenge. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 30, 228-232.
- May, B.J., Zhang, Q., Li, L.L., Paustian, M.L., Whittam, T.S. and Kapur, V. (2001). Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3460-3465.
- Michael, G.B., Kadlec, K., Sweeney, M.T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., Murray, R.W., Watts, J.L. and Schwarz, S. (2012). ICEPmu1, an integrative conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: Analysis of the regions that comprise 12 antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(1), 84-90.
- Michael, G.B., Bossé, J.T. and Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Pasteurellaceae* of veterinary origin. *Microbiology Spectrum*, 6(3), 6.3.02.
- Mizan, S., Henk, A., Stallings, A., Maier, M. and Lee, M.D. (2000). Cloning and characterization of sialidases with 2–6 and 2–3 sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology*, 182, 6874-6883.
- Moğulkoç, M.N. (2020). Bazı sığır pnömoni etkenlerinin tespiti, karakterizasyonu ve PFGE yöntemi ile genotiplendirilmesi, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı.

- Morehouse, J. (2018). Select antimicrobial resistance trends in Kentucky's bovine population and antibiogram development. *Medicine*, 47.
- Mosier, D.A. (1997). Bacterial pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13, 483-493.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W. and Mannheim, W. (1985). Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposal of new species, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *International Journal of Systemic Bacteriology*, 35, 309-312.
- Nazik, H., Ongen, B., Erturan, Z. ve Salcioglu, M. (2007). Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60, 82-86.
- Nefedchenko, A., Glotova, T., Glotov, A., Ternovoy, V. and Sementsova, A.O. (2017). Prevalence of different OmpH-types among *Pasteurella multocida* isolated from the lungs of calves with respiratory problems. *Microbial Pathogenesis*, 104, 184-189.
- Nefedchenko, A., Glotov, A., Glotova, T., Terentyeva, T. and Koshchayev, A. (2019). Allele-specific PCR for typing ompH-types of *Pasteurella multocida* and searching for new approaches to studying of pathogenicity of bacterial isolates. *Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R. and de la Garza, M. (1999). Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current Microbiology*, 38, 64-67.
- Nikunen, S., Hartel, H., Orro, T., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivela, S.L., Sankari, S., Aho, P., Pyrala, S., Saloniemi, H. and Soveri, T. (2007). Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30, 143-151.
- Ogunnariwo, J.A., Alcantara, J. and Schryvers, A.B. (1991). Evidence for non siderophoremediated acquisition of transferrin bound iron by *Pasteurella multocida*. *Microbial Pathogenesis*, 11, 47-56.
- Ogunnariwo, J.A. and Schryvers, A.B. (2001). Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology*, 183, 890-896.
- Ok, M., İder, M. ve Hadimli, H.H. (2019). Buzağların solunum sistemi enfeksiyonunun tedavisinde tilmikosin'in klinik etkinliğinin değerlendirilmesi. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 35(2), 2.
- Okay, S. (2011). *Pasteurella multocida* A:3'e ait PLPE ve OMPH'den Oluşan Rekombinant Aşıların Geliştirilmesi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Doğal ve Uygulamalı Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara pp.: 121.
- Olive, D.M. and Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1661-1669.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G. and Read, R.R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86-92.
- Özbey, G., Kilic, A., B Ertas, H. ve Muz, A. (2004). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* and *Manheimia haemolytica* strains isolated from cattle, sheep and goats. *Veterinární Medicina*, 49(3), 65-69.
- Özdemir, Ü., Ali, T. ve Nicholas, R. (2019). Detection and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* and other respiratory disease pathogens from pneumonic lung samples in a Calf Rearing Unit. *Madridge Journal of Veterinary Medicine & Research*,

1(1), 8-12.

- Öztürk, D. ve Çorlu, M. (2006). Pnömonili koyun akciğerlerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 22(1-2), 59-63.
- Panciera, R.J., Corstvet, R.E., Confer, A.W. and Gresham, C.N. (1984). Bovine pneumonic pasteurellosis: effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 2538-2542.
- Paustian, M.L., May, B.J. and Kapur, V. (2002). Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*, 184, 3734-3739.
- Peng, Z., Wang, X., Zhou, R., Chen, H., Wilson, B.A. and Wu, B. (2019). *Pasteurella multocida*: Genotypes and genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(4), e00014-e00019.
- Peng, Z., Liu, J., Liang, W., Wang, F., Wang, L., Wang, X., Hua, L., Chen, H., Wilson, B.A., Wang, J. and Wu, B. (2021). Development of an online tool for *Pasteurella multocida* genotyping and genotypes of *Pasteurella multocida* from different hosts. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 771157.
- Petruzzi, B., Briggs, R.E., Swords, W.E., De Castro, C., Molinaro, A. and Inzana, T.J. (2017). Capsular polysaccharide interferes with biofilm formation by *Pasteurella multocida* serogroup A. *mBio*, 8(6), e01843-e01847.
- Petruzzi, B., Dickerman, A., Lahmers, K., Scarratt, W.K. and Inzana, T.J. (2020). Polymicrobial biofilm interaction between *Histophilus somni* and *Pasteurella multocida*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1561.
- Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L. and 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(5), 932-944.
- Potgieter, L.N.D. (2004). Bovine viral diarrhea and mucosal disease. In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. 2nd edition, *Infectious Disease of Livestock*, 2. Cape Town (South Africa): Oxford University Press. pp.: 946-969.
- Prado, M.E., Dabo, S.M. and Confer, A.W. (2005). Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3 in cattle: molecular characterization of the immunodominant heme acquisition system receptor (HasR) protein. *Veterinary Microbiology*, 105, 269-280.
- Prado, M.E., Prado, T.M., Payton, M. and Confer, A.W. (2006). Maternally and naturally acquired antibodies to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111, 301-307.
- Prajapati, A., Chanda, M.M., Yogisharadhya, R., Parveen, A., Ummer, J., Dhayalan, A., Mohanty, N.N. and Shivachandra, S.B. (2020). Comparative genetic diversity analysis based on virulence and repetitive genes profiling of circulating *Pasteurella multocida* isolates from animal hosts. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104564.
- Prajapati, A., Yogisharadhya, R., Mohanty, N.N., Mendem, S.K., Nizamuddin, A., Chanda, M.M. and Shivachandra, S.B. (2022). Comparative genome analysis of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 strains causing haemorrhagic septicaemia (HS) in bovines. *Gene*, 826, 146452.
- Prasadara, N. (2002). Identification of *Escherichia coli* membrane protein A receptor on human brain micro vascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 70, 4556-4563.
- Pratt, J., Cooley, J.D., Purdy, C.W., and Straus, D.C. (2000). Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. *Current Microbiology*, 40, 306-309.

- Prescott, J.F. (2013). Beta-lactam Antibiotics. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd. pp.: 153-173
- Pruimboom, I.M., Rimler, R.B., Ackermann, M.R. and Brogden, K.A. (1996). Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. *Avian Diseases*, 40, 887-893.
- Pruimboom, I.M., Rimler, R.B. and Ackermann, M.R. (1999). Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. *Infection and Immunity*, 67, 1292-1296.
- Pullinger, G.D., Bevir, T. and Lax, A.J. (2004). The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Molecular Microbiology*, 51(1), 255-269.
- Purdy, C.W., Raleigh, R.H., Collins, J.K., Watts, J.L. and Straus, D.C. (1997). Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. *Current Microbiology*, 34, 244-249.
- Raetz, C.R. and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700.
- Rajagopal, R., Nair, G.K., Mini, M., Joseph, L., Saseendranath, M.R. and John, K. (2013). Biofilm formation of *Pasteurella multocida* on bentonite clay. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(2), 120-125.
- Register, K.B., Sacco, R.E., and Brockmeier, S.L. (2007). Immune response in mice and swine to DNA vaccines derived from the *Pasteurella multocida* toxin gene. *Vaccine*, 25, 6118-6128.
- Rhoades, K.R. and Rimler, R.B. (1989). Fowl Cholera. London: Academic Press.
- Rice, J.A., Carrasco-Medina, L. and Hodgins, D.C. 2008 *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health and Research Reviews*, 8, 117-128.
- Rimler, R.B. and Rhoades, K.R. (1989). *Pasteurella multocida*. In: Adlam C and Rutter JM (eds) *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. London: Academic Press, pp.: 37-73.
- Riviere, J.E. and Papich, M.G. (2018). Tetracycline Antibiotics. In: *Veterinary pharmacology and therapeutics*. John Wiley & Sons. pp.: 858-876
- Roehrig, S.C., Tran, H.Q., Spehr, V., Gunkel, N., Selzer, P.M. and Ullrich, H.J. (2007). The response of *Mannheimia haemolytica* to iron limitation: implications for the acquisition of iron in the bovine lung. *Veterinary Microbiology*, 121, 316-329.
- Ross, R.F. (2006). *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Animal Health Research Reviews*, 7(1-2), 13-29.
- Ryu, H.I. and Kim, C.J. (2000). Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. *Journal of Veterinary Science*, 1, 87-95.
- Sachdeva, G., Kumar, K., Jain, P. and Ramachandran, S. (2005). SPAAN: a soft ware program for prediction of adhesins and adhesin like proteins using neural networks. *Bioinformatics*, 21, 483-491.
- Saha, O., Islam, M.R., Rahman, M.S., Hoque, M.N., Hossain, M.A. and Sultana, M. (2021). First report from Bangladesh on genetic diversity of multidrug-resistant *Pasteurella multocida* type B:2 in fowl cholera. *Veterinary World*, 2527-2542.
- Sakmanoğlu, A., Uslu, A., Sayin, Z., Karyeyen, Y., Sanioğlu G.G., İlban, A., Padron-Perez, B., Tekindal, M.A. ve Erganiş, O. (2021). Investigation of the nontypical *Pasteurella multocida* strains obtained from multiple sources, regions, and times: An unexpected increase was detected. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 45(5), 814-

- Sarang, L.N., Thomas, P., Gupta, S.K., Priyadarshini, A., Kumar, S., Nagaleekar, V. K., Kumar, A. and Singh, V.P. (2015). Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 38, 33-39.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. and Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519-542.
- Schweizer, M. and Henning, U. (1997). Action of a major outer cell envelope membrane protein in conjugation of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 129, 1651-1652.
- Scorneaux, B. and Shryock, T.R. (1999). Intracellular accumulation, subcellular distribution, and efflux of tilmicosin in bovine mammary, blood, and lung cells. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1202-1212.
- Seo, J., Pyo, H., Lee, S., Lee, J. and Kim, T. (2009). Expression of 4 truncated fragments of *Pasteurella multocida* toxin and their immunogenicity. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73(3), 184-189.
- Shewen, P.E., and Conlon, J.A.R. (1993). *Pasteurella*. In: Gyles CL and Thoen CO (eds) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Ames, IA: Iowa State University Press, pp.: 216-225.
- Shirzad-Aski, H. and Tabatabaei, M. (2016). Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates obtained from poultry, ruminant, cats and dogs using RAPD and REP-PCR analysis. *Molecular Biology Research Communications*, 5(3), 123-132.
- Siju, J., Kumar, A.A., Shivachandra, S.B., Chaudhuri, P., Srivastava, S.K. and Singh, V.P. (2007). Cloning and characterization of type 4 fimbrial gene (ptfA) of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 (strain P52). *Veterinary Research Communications*, 31, 397-404.
- Singer, R.S., Case, J.T., Carpenter, T.E., Walker, R.L. and Hirsh, D.C. (1998). Assessment of spatial and temporal clustering of ampicillin and tetracycline-resistant strains of *Pasteurella multocida* and *P. haemolytica* isolated from cattle in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212, 1001-1005.
- Smith, A.B., Renter, D.G., Cernicchiaro, N., Shi, X., Nickell, J.S., Keil, D.J. and Nagaraja, T.G. (2017). A randomized trial to assess the effect of fluoroquinolone metaphylaxis on the fecal prevalence and quinolone susceptibilities of *Salmonella* and *Campylobacter* in Feedlot Cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(10), 600-607.
- Smith, E., Miller, E., Aguayo, J.M., Figueroa, C.F., Nezworski, J., Studniski, M., Wileman, B. and Johnson, T. (2021). Genomic diversity and molecular epidemiology of *Pasteurella multocida*. *PLOS ONE*, 16(4), e0249138.
- Songer, J.G. and Post, K.W. (2005). The genera *Mannheimia* and *Pasteurella*. In: Duncan L, editor. *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. pp.: 181-190.
- St Michael, F., Vinogradov, E., Li, J. and Cox, A.D. (2005). Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* genome strain Pm70 and identification of the putative lipopolysaccharide glycosyltransferases. *Glycobiology*, 15, 323-333.
- Stanford, K., Zaheer, R., Klima, C., McAllister, T., Peters, D., Niu, Y.D. and Ralston, B. (2020). Antimicrobial resistance in members of the bacterial Bovine Respiratory Disease Complex isolated from lung tissue of cattle mortalities managed with or without the use of antimicrobials. *Microorganisms*, 8(2), 288.

- Step, D.L., Confer, A., Kirkpatrick, J., Richards, J. and Fulton, R.W. (2005). Respiratory tract infections in dairy calves from birth to breeding age: detection by laboratory isolations and seroconversions. *Bovine Practitioners*, 39, 44-53.
- Strateva, T., and Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133-1148.
- Sutherland, AD., Davies, R.C. and Murray, J. (1993). An experimental anti idiotypic vaccine mimicking lipopolysaccharide gives protection against *Pasteurella multocida* type A infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 7, 105-110.
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A.L., Fang, T., Doncheva, N.T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L.J. and von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51, D638-D646.
- Tabatabai, L.B. and Zehr, E.S. (2004). Identification of five outer membrane associated proteins among cross protective factor proteins of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 72, 1195-1198.
- Tam, C.K., Hackett, J. and Morris, C. (2004). *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi C* carries an inactive shufflon. *Infection and Immunity*, 72, 22-28.
- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q. and Chen, H. (2009). Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 951-958.
- Taylor, J.D., Fulton, R.W., Dabo, S.M., Lehenbauer, T.W. and Confer, A.W. (2010). Comparison of genotypic and phenotypic characterization methods for *Pasteurella multocida* isolates from fatal cases of Bovine Respiratory Disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(3), 366-375.
- Tegtmeier, C., Uttenthal, A., Friis, N.F., Jensen, N.E. and Jensen, H.E. (1999). Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, 46, 693-700.
- Timsit, E., Hallewell, J., Booker, C., Tison, N., Amat, S. and Alexander, T.W. (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, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M. and Dawkins, H.J. (1998). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 1096-1100.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J. and Adler, B. (2001). Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 924-929.
- Ujvári, B., Makrai, L. and Magyar, T. (2018). Characterisation of a multiresistant *Pasteurella multocida* strain isolated from cattle. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(1), 12-19.
- Ujvári, B., Makrai, L. and Magyar, T. (2019). Virulence gene profiling and *ompA* sequence analysis of *Pasteurella multocida* and their correlation with host species. *Veterinary Microbiology*, 233, 190-195.
- van Vuuren, M. (2004). Parainfluenza type 3 infections. In: Coetzer, J.A.W. and Tustin, R.C., editors. 2nd edition, *Infectious Disease of Livestock*, 2. Cape Town (South Africa): Oxford University Press., pp.: 673-676.

- Vasfi Marandi, M. and Mittal, K.R. (1997). Role of outer membrane protein H (OmpH) and OmpA specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 65, 4502-4508.
- Verma, S., Sharma, M., Katoch, S., Verma, L., Kumar, S., Dogra, V., Chahota, R., Dhar, P. and Singh, G. (2013). Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Veterinary Research Communications*, 37(1), 83-89.
- Versalovic, J., Thearith, K. and Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19 (24), 6823-6831.
- Virtala, A.M., Mechor, G.D., Grohn, Y.T., Erb, H.N. and Dubovi, E.J. (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.
- Virtala, A.M.K., Grohn, Y.T., Mechor, G.D., Erb, H.N. and Dubovi, E.J. (2000). Association of seroconversion with isolation of agents in transtracheal wash fluids collected from pneumonic calves less than three months of age. *Bovine Practitioners*, 34, 77-80.
- Wang, C. and Glisson, J.R. (1994). Identification of common antigens of serotype 1 and serotype 3 *Pasteurella multocida* in poultry expressed *in vivo*. *Avian Diseases*, 38, 334-340.
- Ward, C.K., Lumbley, S.R., Latimer, J.L., Cope, L.D. and Hansen, E.J. (1998). *Haemophilus ducreyi* secretes a filamentous hemagglutinin like protein. *Journal of Bacteriology*, 180, 6013-6022.
- Watt, J.M., Swiatlo, E., Wade, M.M. and Champlin, F.R. (2003). Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiology Letters*, 225, 9-14.
- Welsh, R.D., Dye, L.B., Payton, M.E. and Confer, A.W. (2004). Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994-2002. *Journal of Veterinary Diagnostics Investigation*, 16, 426-431.
- White, D.J., Jolley, W.L., Purdy, C.W., and Straus, D.C. (1995). Extracellular neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A:3 strain associated with bovine pneumonia. *Infection and Immunity*, 63, 1703-1709.
- Wildman, B.K., Perrett, T., Abutarbush, S.M., Guichon, P.T., Pittman, T.J., Booker, C.W., Schunicht, O.C., Fenton, R.K. and Jim, G.K. (2008). A comparison of 2 vaccination programs in feedlot calves at ultra high risk of developing undifferentiated fever/bovine respiratory disease. *Canadian Veterinary Journal*, 49, 463-472.
- Wilson, M.A., Rimler, R.B. and Hoffman, L.J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1518-1524.
- Wu, J.R., Shien, J.H., Shieh, H.K., Chen, C.F. and Chang, P.C. (2007). Protective immunity conferred by recombinant *Pasteurella multocida* lipoprotein E (PlpE). *Vaccine*, 25, 4140-4148.
- Xiao, X., Lan, W., Wang, Y., Jiang, L., Jiang, Y. and Wang, Z. (2018). Comparative pharmacokinetics of danofloxacin in healthy and *Pasteurella multocida* infected ducks. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41, 912-918.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., Endoh, Y.S. and Kojima, A. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(7), 555-560.

ÖZ GEÇMİŞ

Volkan Enes ERGÜDEN, Çorum Öğretmen Mukadder Akaydın Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2016 yılında mezun oldu. 2019 yılında OMÜ LEE Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı'nda doktora programına başladı. Aynı yıl YÖK 100/2000 programı kapsamında "Aşı" konusunda burs almaya başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir (YDS: 81,25). "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası" ve "Sığırlarda Rektovajinal Yöntemle Suni Tohumlama" sertifikalarına sahiptir. Temel ilgi alanları, Uzak Doğu kültürleri, programlama dilleri ve istatistik.

06.04.2023

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-2215-2868

Yayınlar:

1. Sezener MG, Findik A, Ergüden VE, Gülhan T, Çiftci A, Boynukara B. (2022). Colistin Resistance Profiles and Genotypes of *Escherichia coli* Isolates from Dogs and Cats. *Acta Scientiae Veterinariae*. 50: 1894. DOI: 10.22456/1679-9216.126741
2. Ozcan, U, Sezener MG, Sayilkan BU, Kulluk E, Akman A, Cetiner H, Erguden VE, Yaman S, Gumusova S, Ciftci A, Meral Y, Dalgın D. (2022). Therapeutic potential of cristobalite in the treatment of calf diarrhea. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 25(No 3): 437-46. DOI: 10.24425/pjvs.2022.142028
3. Özcan Ü, Sezener MG, Sayilkan BU, Ergüden VE, Küllük E, Yaman Ş. (2020). A New Aspect in Neonatal Calf Diarrhea: Presence of *Escherichia coli* CS31A at Unexpected Ratio. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 27(1): 133-134. DOI: 10.9775/kvfd.2020.25280
4. Sezener MG, Ergüden VE, Findik A, Akgöz S, Gülhan T, Ciocan- Moţco OA, Çiftci A. (2022). Investigation of the antibiotic resistances, biofilm formation, and genotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkey and Romania. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*. 33 (2) , 1-6 . DOI: 10.35864/evmd.1166225
5. Ergüden, V. E. & Çiftci, A. (2022). An Innovative Approach in The Field of Health: Nanoparticles/Nanomedicine. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 7 (3) , 304-313. DOI: 10.35229/jaes.1136335
6. Gülhan T, Sezener MG, Akgöz S, Ergüden V, Findik A, Çiftci A. (2020). Anadolu Mandası Dışkılarından İzole Edilen Termofilik Campylobacter Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 5 (1) , 86-92. DOI: 10.35229/jaes.688263
7. Gülhan T, Tütüncü M, Güzel M, Sezener MG, Çiftci A, Kılıçoğlu Y, Ergüden VE, Akgöz S, Boynukara B. (2019). "Serological Investigation of Q Fever in

Anatolian Buffaloes". *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(3):338-343. DOI: 10.35229/jaes.579953

8. Sezener MG, Fındık A, Ergüden VE, Akgöz S, Gülhan T, Çiftci A. (2019). Mastitis İzolatı *Staphylococcus aureus* Suşlarında Antibiyotik Dirençliliğinin ve Bazı Virülens Genlerinin Araştırılması. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2):182-187. DOI: 10.35229/jaes.571977

9. Şahin İ, Sezener MG, Ergüden VE, Yaman Ş, Çiftci A. (2021). The Characterisation of *Dichelobacter nodosus* Isolates from Footrot Cases of Sheep. *6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences (ICVAS)*, Bildiri/Poster, Online; 207.

10. Şahin İ, Sezener MG, Ergüden VE, Yaman Ş, Çiftci A. (2021). The Isolation of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* from Footrot in Samsun Province. *6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences (ICVAS)*, Bildiri/Poster, Online; 208.

11. Sözüöz G, Sezener MG, Ergüden VE, Yaman Ş, Çiftci A. (2021). The isolation of *Lactobacillus acidophilus* and *Enterococcus faecium* from Faeces of Healthy Dogs and Determination of Their Probiotic Properties. *6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences (ICVAS)*, Bildiri/Poster, Online; 205-206.

12. Gülhan T, Sezener MG, Ergüden VE, Fındık A, Çiftci A. (2021). Development of ELISA Kit for Serological Diagnosis of Q Fever in Anatolian Buffaloes. *International Veterinary Sciences Congress*, Özet Bildiri/Sözlü Sunum; 101-102. (Yayın No:7207608)

13. Sezener MG, Fındık A, Ergüden VE, Akgöz S, Gülhan T, Çiftci A. (2019). The Determination of Antibiotic Resistances and Some Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. *VIII. National & II. International Congress Of Turkish Society Of Veterinary Gynaecology*, Sözlü Bildiri, Antalya; 327-328.

14. Sezener MG, Özcan Ü, Akgöz S, Ergüden VE, Güzel M, Gülhan T. (2019). A Case Report Of Infectious Keratoconjunctivitis In Chios Sheep Farm. *1st International Congress of Multidisciplinary Studies & Research*, Tam Metin Bildiri, Şanlıurfa; 92-96.

15. Sezener MG, Ergüden VE, Fındık A, Akgöz S, Gülhan T, Moçco OA, Çiftci A. (2019). Determination Of The Antibiotypical And Genotypical Relationships Between *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Turkey And Romania. *1st International Congress of Multidisciplinary Studies & Research*, Tam Metin Bildiri, Şanlıurfa; 176-182.

16. Yalçın B, Sezener MG, Ergüden VE, Akal E, Fındık A. (2019). The Determination of Bacterial Loads of Preputial Washing Fluid in Stallion. *1. International Equine Medicine & Training Congress*, Tam Metin Bildiri, Samsun; 62-64.

17. Koç A, Sezener MG, Taşdemir M, Yaman Ş, Çil B, Ergüden VE, Gürlü H, Fındık A. (2019). Determination of Biofilm Production and Antibiotic Resistance Profiles of *Staphylococcus* spp. from Mastitic Buffalo Milks. *International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress*, Sözlü Sunum, İstanbul; 80-81.

18. Ergüden VE, Yaman Ş, Kirez K, Sezener MG. (2022). İnek Mastitis Kökenli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotip ve Genotip Yönlere Değerlendirmesi. *XV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Bildiri/Poster, Şanlıurfa; 28.10.2022.

19. Ergüden VE, Yaman Ş, Cengiz S, Çiftci A. (2022). Sığır Solunum Sistemi Hastalığı Kökenli *Pasteurella multocida* İzolatlarının Genotipik Karakterizasyonu. *XV.*

Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Bildiri/Poster, Şanlıurfa; 28.10.2022.

20. Sezener MG, Fındık A, Ergüden VE, Yaman Ş, Gülhan T. (2020). Kedi ve Köpek Orijinli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* Suşlarının Ampc Üretimi ve Protein Profillerinin Belirlenmesi. *14. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Sözlü Bildiri, Konya; 85-87.

21. Louge CM, (2023). Klostridyal Enfeksiyonlar. Savaşan S, Ergüden VE. (Çev.). Çiftçi A (Ed.), *Kanatlı Hayvan Hastalıkları* (943-970) içinde. Medipress. (Orijinal eserin yayın tarihi 2013, 13. Baskı).

Sonuçlandırılmış Projeler:

- 1.** PYO.VET.1904.21.028. Siğir Solunum Sistemi Hastalığı Kökenli *Pasteurella multocida* İzolatlarının Aşı Suşu Olma Potansiyeli Yönünden Karakterizasyonu

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar:

- 1.** YÖK 100/2000 Doktora Bursu “AŞİ”