



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YUMURTACI TAVUKLARDA *GALLIBACTERIUM ANATIS*
TEŞHİSİ**

Vet. Hek. Sibel YAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER

BURDUR-2018

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YUMURTACI TAVUKLARDA *GALLIBACTERIUM ANATIS*
TEŞHİSİ**

Vet. Hek. Sibel YAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0468-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR- 2018

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Sibel YAMAN tarafından **Dr. Öğretim üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER** yönetiminde hazırlanan **Yumurtacı Tavuklarda *Gallibacterium anatis* Teşhisi** başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 10/12/2018


Prof. Dr. Hülya
TÜRÜTOĞLU

Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner
Fakültesi
Başkan


Prof. Dr. Barış
SAREYYÜPOĞLU

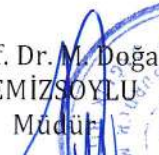
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Dr. Öğr. Üyesi Özlem
ŞAHAN YAPICIER

Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner
Fakültesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **21/12/2018** Tarih ve **42.** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. M. Doğa
TEMİZSOYLU
Müdür

**Sağlık Bilimleri
Enstitüsü**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER'e, eğitimim süresince katkılarından dolayı başta Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU olmak üzere Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK, Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU, Araş. Gör. Ezgi ŞABABOĞLU'na, eşim Vet. Hek. Ertuğrul YAMAN ve tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.



ETİK BEYAN

“Yumurtacı Tavuklarda *Gallibacterium anatis* Teşhisi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğretim Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sibel YAMAN

Tarih: 04.12.2018

İmza:



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	xi
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Etiyoloji	5
2.3. Epidemiyoloji	10
2.4. Patogenez ve Virülens Faktörleri	11
2.5. Klinik Bulgular	14
2.6. Nekropsi Bulguları	15
2.7. Teşhis	15
2.8. Sağaltım	16
2.9. Koruma ve Kontrol	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Bakteri Suşları	19
3.1.2. Tavuk Örnekleri	19
3.1.3. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri	21
3.1.4. Biyokimyasal Testler	23
3.1.5. Moleküler Tanıda Kullanılan Cihazlar	25
3.1.6. Primerler	25
3.1.7. Moleküler Tanıda Kullanılan Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar	25
3.2. Yöntem	29
3.2.1. <i>G. anatis</i> 'in İzolasyon ve İdentifikasyonu	29
3.2.2. <i>G. anatis</i> 'in Moleküler Tanısı	30
3.2.2.1. Bakteri kolonisinden DNA ekstraksiyonu	31
3.2.2.2. Doku ve organ örneklerinden DNA ekstraksiyonu	32
3.2.2.3. PZR	33
3.2.2.4. Elektroforez	34
3.2.2.5. Görüntüleme	34
4. BULGULAR	35
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	35
4.2. PZR Bulguları	38

5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	53



ŞEKİLLER

Şekil 2.1. <i>G. anatis</i> 'in kanlı agarda β -hemolizli kolonileri	6
Şakıl 4.1. Kanlı agarda β - hemolitik <i>G. anatis</i> kolonisinin görüntüsü	36
Şekil 4.2. Karbonhidrat fermentasyon test sonuçları	36
Şekil 4.3. Pozitif kontrol suşlarının PZR görüntüsü	38
Şekil 4.4. İzole ve identifiye edilen <i>G. anatis</i> suşlarının PZR görüntüsü	38
Şekil 4.5. İzole ve identifiye edilen <i>G. anatis</i> suşlarının PZR görüntüsü	38
Şekil 4.6. Organ örneklerinden izole edilen DNA'lar ile yapılan PZR sonucu	39



TABLÖLAR

Tablo 2.1. <i>Gallibacterium</i> türlerinin fenotipik özellikleri	7
Tablo 3.1. Tavuk örneklerinin toplandığı kümesler	20
Tablo 3.2. <i>G. anatis</i> teşhisi PZR aşamasında kullanılan primerler	27
Tablo 3.3. <i>G. anatis</i> 'in izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler	30
Tablo 4.1. İzolasyon ve identifikasyon sonuçlarının organlara göre dağılımı	36
Tablo 4.2. <i>Gallibacterium</i> spp.'nin biyokimyasal test sonuçları	37
Tablo 4.3. Direkt dokudan izole DNA'lar ile yapılan PZR sonuçlarının organlara göre dağılımı	39

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
APEC	Avian patojenik <i>Escherichia coli</i>
BHI	Brain heart infusion broth
Bp	Base pair
C	Cytosin
ddH₂O	Bidistile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfatlar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FISH	Fluorescent 16S rRNA in situ hybridization
flf	Fimbriyal gen
G	Guanin
<i>G. anatis</i>	<i>Gallibacterium anatis</i>
GDa	Giga dalton
g	Gram
GtxA	<i>Gallibacterium</i> toksin A
H₂O₂	Hidrojen peroksit
LAMP	Loop mediated isothermal amplification
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
mg	Miligram
MgCl	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Millimolar
Na₂HPO₄	Disodyumfosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaClO₂	Sodyum klorit
°C	Santrigrat derece
ONPG	<i>o</i> -Nitrofenil β-D-galaktopiranozid
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
pH	Hidrojenin gücü
pmol	Pikomol
Primer F	Primer forward
Primer R	Primer reverse
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNase	Ribonükleaz
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RV	Reverse vaccinology
sn	Saniye
SPF	Spesifik patojen free
T_a	Bağlanma sıcaklığı
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE Buffer	Tris-borik asit-EDTA

Tm
TÜİK
Yumbir
β-hemolitik
μl
∞

Uzama süresi
Türkiye istatistik kurumu
Yumurta üreticileri merkez birliği
Beta hemolitik
Mikrolitre
Sonsuz



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Yüksek Lisans Tezi

Yumurtacı Tavuklarda *Gallibacterium Anatis* Teşhisi

**Veteriner Hekim
Sibel YAMAN
Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER**

BURDUR-2018

ÖZET

Pasteurellaceae ailesinin bir üyesi olan *Gallibacterium anatis*, yumurta veriminde düşüşe, hayvan refahında azalmaya ve mortalitenin artmasına sebep olmaktadır. Bu çalışmada, yumurtacı tavuklarda ekonomik kayıplara sebep olan *G. anatis*'in, konvansiyonel ve moleküler teknikler kullanılarak teşhisinin yapılması amaçlandı. Bu çalışmada solunum sistemi enfeksiyonu ile birlikte yumurta veriminde düşüş gözlenen yumurtacı tavuk işletmelerindeki toplam 200 adet ölü tavuğa ait doku ve organ (kalp, karaciğer, akciğer, dalak, trake) *G. anatis* yönünden incelendi. *G. anatis* teşhisi koloni morfolojisi, şeker fermentasyon testleri ve hemolitik özelliklerini temel alan konvansiyonel ve 16S rRNA- 23S rRNA spesifik primerleri kullanılarak uygulanan moleküler yöntemler ile gerçekleştirildi. İncelenen örneklerden 20 (%10) *G. anatis* izole ve identifiye edildi. İzolatlar konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulandı. Direkt doku ve organlara yapılan PZR sonucunda örneklerin 11 (%2,2)'inde pozitiflik elde edildi. Sonuç olarak, Türkiye'de *G. anatis* varlığı ilk kez bu çalışma ile ortaya konuldu. Kanatlı hayvanlarda solunum yolu enfeksiyonu ile seyreden yumurta verim kayıplarında *G. anatis*'in rolünün olabileceği ve bu durumun kanatlı klinisyenlerine ve mikrobiyologlara yol gösterici olabileceği düşünüldü.

Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma

Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0468-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Gallibacterium anatis*, İzolasyon ve İdentifikasyon, PZR, Yumurtacı tavuk



**BURDUR MEHMET AKIF ERSOY UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE**

Master of Science Thesis

Diagnosis of *Gallibacterium anatis* in layers

**Veterinarian
Sibel YAMAN**

Department of Veterinary Microbiology

**Supervisor
Assist. Prof. Özlem ŞAHAN YAPICI**

BURDUR-2018

ABSTRACT

Gallibacterium anatis, a member of the *Pasteurellaceae* family, leads to decrease in egg-production and animal welfare and increase in mortality. In this study, it was aimed to diagnose *G. anatis* which caused economic losses in laying hens by using conventional and molecular techniques. In this study, *G. anatis* was examined from a total of 200 dead chicken tissues (heart, liver, lung, spleen and trachea) in laying hen farms that observed a decrease in egg production with respiratory system infection. Conventional methods based on colony morphology, sugar fermentation tests and hemolytic properties and molecular conformation using 16S rRNA-23S rRNA specific primers were performed to identify of *G. anatis*. *G. anatis* was isolated in 20 (10%) of examined samples and isolates were confirmed by conventional PCR. Total of 11 (2.2%) positivity was obtained as isolates were result of polymerase chain reaction (PCR) performed on the direct tissues and organs. As a result, the presence of *G. anatis* was detected for the first time in Turkey by this study. It was thought that *G. anatis* may have a role in egg production losses due to respiratory tract infection in poultry and this situation may be a guide for poultry clinicians and microbiologists.

This research was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Coordination Unit with 0468-YL-17 project number.

Keywords: *Gallibacterium anatis*, Isolation and Identification, Layers, PCR



1. GİRİŞ

Yumurta tüketiminin ilk kaydı M.Ö. 1400 yılına dayanmaktadır. Yumurta tüketiminde öncelikli tercih tavuk yumurtası olmuştur (Spitzer, 2015). Yüksek protein kaynağı olması nedeniyle et tüketimine alternatif bir besin kaynağı olan yumurtanın tüketimdeki artış, yumurtacılık sektöründe sürekli olarak ilerlemeye yol açmıştır (Anonim, 2017).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin verilerine göre, Türkiye'de 2017 yılı itibarıyla kayıtlı 121.556.027 adet yumurtacı tavuk bulunmaktadır (TÜİK, 2018). Afyonkarahisar 16.730.730 adet ile en çok yumurtacı tavuk bulunan il olup, 2. sırada 11.995.381 yumurta tavuğu varlığı ile Konya yer almaktadır (Yumbir, 2018).

Bir tavuk yılda ortalama 259 yumurta üretmektedir (Spitzer, 2015). Gelişmiş ırklar yılda 300 yumurta üretebilirler (Anonim, 2017). Türkiye'de 2017 yılı verilerine göre yumurta üretimi 20.264.000 adettir. Kişi başı ortalama 214 adet yumurta düşmektedir. Ayrıca üretilen bu yumurtaların 5.997.000 adedi ihraç edilmektedir. Türkiye 2015 yılında dünyada en çok yumurta üreten ilk 20 ülke arasında 9. sırada yer almıştır (Yumbir, 2018).

Yumurta üretimi hayvanın cinsine ve mevsime bağlı olarak değişmekle birlikte 18-22 haftalık yaşta başlamaktadır. Bu haftaları takip eden 6-8 hafta boyunca yumurta verimi artmaya devam eder ve birinci yıldan sonra yumurta verimi her geçen yıl düzenli olarak azalmaya başlar (Anonim, 2017). Verimin pik yaptığı dönemden bir yıl sonra hayvanlar üretimden çıkarılabilmektedirler (Serpen, 2015).

Yumurta bakterilerin üremesi için uygun bir ortamdır ve özellikle bakteriler tavuk yumurtasının kabuk ve zar kısmına kolonize olur. Yumurta kontaminasyonu genellikle horizontal olarak ve yumurtanın dış yüzeyinin bakterilerle teması sonucu oluşmaktadır (Spitzer, 2015). Vertikal bulaşma daha çok yumurtacı tavuklarda görülür (Aydın, 1984). Vertikal bulaşmada infeksiyöz ajan öncelikli olarak yumurtalıklara oradan da diğer organlara kolonize olmaktadır. Yumurtalıklarda kolonize olan bakteriler henüz gelişmekte olan ve kabuğu şekillenmeyen yumurtayı infekte edebilmektedir (Spitzer, 2015). Bu şekilde oviduktan ayrılan yumurta

bakteriyel kirlenmeye maruz kalabilmektedir (Serpen, 2015). Yumurtanın membran ve albümini de henüz gelişmediğinden bakteri rahatlıkla yumurta sarısına geçerek çoğalmaya devam edebilir (Spitzer, 2015).

Tavukçuluk endüstrisi için en büyük sağlık tehditlerinin bazıları yumurta üretiminde de belirli etkilere sahiptir. Bu tehditler içinde infeksiyöz hastalıklar kanatlı hayvanlarda üreme sistemini etkileyerek direkt ve hayvanın genel sağlık durumunu olumsuz etkileyerek indirekt şekilde yumurta verimini ve yumurta kalitesini düşürmektedirler. Solunum sistemi infeksiyonları öncelikli olarak hava keselerini etkilemekte, bunun sonucu olarak da ovidukt ve ovaryumlar infekte olabilmektedirler. Ayrıca bazı hastalıklar aşağıdan yukarı doğru bir seyir izleyerek organ ve dokuları infekte etmektedir (Clauer, 2009). Yalancı veba, kuş gribi, infeksiyöz bronşit gibi viral hastalıklar ya da *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Pasteurella multocida*'dan ileri gelen bakteriyel hastalıklar solunum sistemi patojeni olmalarının yanı sıra yumurta veriminde ve / veya yumurtanın kendisinde anormalliklere neden olarak yumurta endüstrisi üzerinde büyük ekonomik kayıplara yol açabilmektedir (Srinivasan ve ark., 2013).

Gallibacterium anatis, uzun yıllar *Actinobacillus salpingitidis*, kanatlıların *Pasteurella haemolytica* benzeri bakterisi veya *Pasteurella anatis* olarak tanımlanmıştır. Son yıllarda broyler, damızlık ve yumurtacı tavuk sürülerinde ölümlere yol açtığı saptanmış ve bu durum *G. anatis* infeksiyonlarına olan ilgiyi arttırmıştır (Alispahic ve ark., 2011; Bisgaard ve ark., 2009; Bojesen, 2003; Bojesen ve ark., 2003; Chaveza ve ark., 2017; Johnson ve ark., 2013; Paudel ve ark., 2014; Sing ve ark., 2016). *G. anatis*'in oluşturduğu infeksiyonların temelinde yumurta veriminde düşme (ooforitis, folikül dejenerasyonu, salpingitis ile bağlantılı) ve solunum sistemi bozuklukları görülmektedir (Bager ve ark., 2013; Bojesen ve ark., 2003; Bojesen ve ark., 2008; Sing, 2016).

G. anatis başta tavuk olmak üzere hindi, kaz, ördek, sülün, keklik, muhabbet kuşu, tavus kuşu, kafes kuşları, yabani kuşlar, sığır, domuz ve evcil memeliler gibi birçok hayvan türünde izole edilmiştir (Bager ve ark., 2013; Bisgaard ve ark., 2009; Bojesen, 2003; Bojesen ve ark., 2003; Jones ve ark., 2013; Neubauer ve ark., 2009;

Paudel ve ark., 2014; Persson ve Bojesen, 2015; Rzewuska ve ark., 2007; Sing, 2016; Sing ve ark., 2016). İnsanlarda ise özellikle bağışıklığı baskılanmış olanlarda ölüme kadar götürebilen bakteriyemi tablosu oluşturduğu bildirilmiştir (Aubin ve ark., 2013). Etkenin insanlara bulaşma yolları kesin olarak belirlenmemesine rağmen, insanlardan izole edilen *G. anatis*'in kontamine gıda kaynaklı olabileceğini bildirilmiştir (Aubin ve ark., 2013; Persson ve Bojesen, 2015).

Tavuklarda *G. anatis* enfeksiyonu henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, üst solunum yollarının yanı sıra alt genital sistem florasında da bulunduğu bildirilmiştir (Bojesen ve ark., 2004; Jones ve ark., 2013; Lawal ve ark., 2018; Persson ve Bojesen, 2015; Rzewuska ve ark., 2007). Paudel ve ark. (2013), sağlıklı tavuklar üzerinde yapmış oldukları çalışmada hayvanları deneysel olarak *G. anatis* enfeksiyonuna maruz bırakmışlar ve etkenin yoğun olarak koanal kleft, trake ve yumurtalıklara kolonize olduğunu tespit edilmişlerdir.

G. anatis primer veya sekonder enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Sing, 2016). Tavuklarda yaşanan solunum sistemi problemlerinde *E. coli* ile beraber seyretmesinin yanısıra, son zamanlarda hastalığın birincil nedeni olarak da karşımıza çıkmaktadır (Mushin ve ark., 1979; Persson ve Bojesen, 2015).

Bu tez çalışmasında, son yıllarda dünyanın birçok ülkesinde kanatlı hayvanlarda solunum sistemi enfeksiyonu ile beraber seyrederek yumurta veriminde kayıplara sebep olan *G. anatis*'in, yumurtacı tavuklara ait organ ve doku örneklerinden konvansiyonel ve moleküler teknikler kullanarak teşhisi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Gallibacterium, ilk kez 1950 yılında Kjos-Hansen tarafından herhangi bir klinik belirti göstermeyen ancak akut peritonitis ve salpingitis tablosu saptanan tavuk ve horozların kloakasından izole edildiği için “hemolitik bir kloaka bakterisi” olarak tanımlanmıştır. *Gallibacterium* kelimesinin karşılığı 'tavuk bakterisi' dir (Persson ve Bojesen, 2015; Sing ve ark., 2016). *Gallibacterium* cinsini tanımlamak ve yeni bir taksonomik sınıfın varlığını ortaya koymak için ilk çalışmalar Bisgaard (1982) tarafından yapılmıştır. Daha sonraki çalışmalar ise sadece *Gallibacterium* cinsinin fenotipik karakterleri üzerine dayandırılmış olsa da bu özellikler bakteriye ait bugünkü bilgi birikiminin temelini oluşturmaktadır (Bojesen, 2003).

G. anatis uzun yıllar *Actinobacillus salpingitidis*, kanatlı kolerası benzeri hastalık tablosu oluşturduğu için kanatlı *Pasteurella haemolytica* benzeri bakteri ve *Pasteurella anatis* (Bisgaard Takson I) olarak isimlendirilmiştir (Bojesen 2003; Bojesen ve ark., 2003). *G. anatis* son zamanlarda *Pasteurellaceae* Pohl 1981 (Piechulla ve ark., 1985) ailesinin yeni bir cinsi olan *Gallibacterium*'a taşınmıştır (Alispahic ve ark., 2011; Alispahic ve ark., 2012; Bojesen ve ark., 2003; Bojesen ve ark., 2004; Jones ve ark., 2013; Neubauer ve ark., 2009; Paudel ve ark., 2013; Persson ve Bojesen, 2015).

Christensen ve ark. (2003), *Pasteurellaceae* ailesine ait olan *Gallibacterium* cinsini 16S rRNA gen sekans sonuçlarına dayanarak yeniden sınıflandırmıştır (Alispahic, 2011; Christensen ve ark., 2003; Persson ve Bojesen, 2015; Rzewuska ve ark., 2007). Günümüzde bu sınıflandırmada *Gallibacterium* cinsine ait *Gallibacterium anatis* biovar Haemolytica, *G. anatis* biovar Anatis, *G. melopsittaci*, *G. trehalosifermentans*, *G. salpingitidis* ve *G. genomospecies* 1, 2 türleri bulunmaktadır (Alispahic, 2011; Alispahic ve ark., 2011; Alispahic ve ark., 2012; Christensen ve ark., 2003; Montes-Garcia ve ark., 2015; Paudel ve ark., 2013; Persson ve Bojesen, 2015). Daha sonra Bisgaard ve ark. (2009) bu türlere *G.*

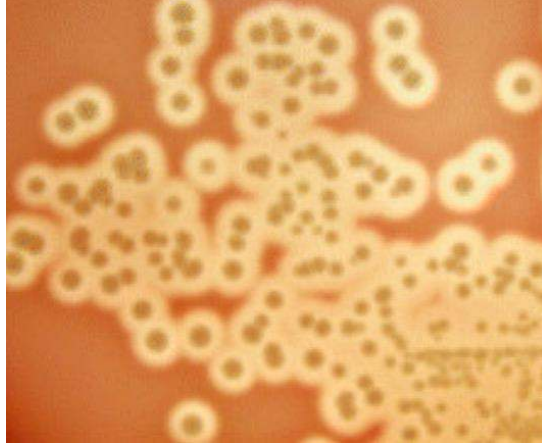
genomospecies 3 ve *G.* grup V'i dahil etmiştir (Bisgaard ve ark., 2009).

2.2. Etiyoloji

G. anatis, Proteobacteria şubesi içerisinde Gammaproteobacteria sınıfında, Pasteurallales takımının *Pasteurallaceae* ailesine ait olan *Gallibacterium* cinsi içinde yer almaktadır (El-Adawy ve ark., 2018; Sing ve ark., 2016). *G. anatis* %39,9-42,6 G+C içeriğine ve 1,6-2,1 GDa genom büyüklüğüne sahiptir (Mutters ve ark., 1985; Piechulla ve ark., 1985). *Gallibacterium* cinsi içerisinde yer alan türlerin fenotipik özellikleri tablo 2.1.'de verilmiştir.

G. anatis, Gram negatif, hareketsiz, kapsüllü, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, kemo-organotrofik ve fermentatif çomak şekilli bir bakteridir (Bisgaard ve ark., 2009; Bojesen ve ark., 2011; Christensen ve ark., 2003; Mbuthia ve ark., 2001; Paudel ve ark., 2014; Sing ve ark., 2016). *G. anatis*, kanlı agarda 37°C'de 24-48 saatte ürer ve β -hemolitik, grimsi, yarı saydam, pürüzsüz, parlak, koloniler oluşturur (Alispahic, 2011; Bisgaard ve ark., 2009; Bojesen, 2003; Paudel ve ark. 2014). *G. anatis* kanlı agarda hemoliz yapma özelliğine göre iki biovara ayrılmaktadır; hemolitik biovarı *Haemolytica*; hemolitik olmayan biovarı ise *Anatis* olarak isimlendirilmiştir (Bojesen ve ark., 2007). *G. anatis* β -hemolitik özelliği şekil 2.1'de gösterilmiştir.

G. anatis'in taze kültürleri MacConkey agarda pembe renkli koloniler oluşturmaya rağmen, koloni oluşumundan 48 saat sonra eskiyen veya tekrar pasajlanan koloniler 4-5mm çapında, yassı ve gri renk alabilir (El-Adawy ve ark., 2018; Neubauer ve ark., 2009).



Şekil 2.1. *G. anatis*'in kanlı agarda β -hemolizli kolonileri (Persson ve Bojesen, 2015)

G. anatis'in katalazı pozitif, oksidaz özelliği ise değişkenlik göstermektedir (Christensen ve ark., 2003). Üreaz testi negatiftir (Bojesen, 2003; Christensen ve ark., 2003). Bunlara ek olarak fosfataz testi pozitif, ornitin dekarboksilaz, triptofanaz, sitrat, hidrojen sülfür ve Voges-Proskauer testleri negatiftir. *G. anatis*, mannoz, D-glikoz, D-mannitol, sakkaroz ve trehalozu asidik ürün oluşturarak fermente eder, ancak gaz oluşturmaz. Maltoz, L-arabinoz ve D-sorbitol gibi karbonhidratları fermente edemez (Christensen ve ark., 2003). ONPG testi ise pozitif sonuç vermektedir (Bisgaard ve ark., 2009).

Tablo 2.1. *Gallibacterium* türlerinin fenotipik özellikleri

Özellikler	<i>Gallibacterium anatis</i>	<i>Gallibacterium genomospecies 3</i>	<i>Gallibacterium melopsittaci</i> sp. now.	<i>Gallibacterium trehalosifermentans</i> sp. now.	<i>Gallibacterium salpingitidis</i> sp. now.	<i>Gallibacterium group V</i>
Katalaz	+	D	D	D	+	+
Oksidaz	+	D	D	D	+	+
Üreaz	-	D	-	-	D	+
İndol	-	D	-	-	-	-
MacConkey agarda üreme	D	D	D	-	-	-
Gliserol	+	D	+	D	+	+
Musik asit	-	D	D	-	+	+

Tablo 2.1. *Gallibacterium* türlerinin fenotipik özellikleri (devamı)

D-arabitol	-	D	-	-	+	+
Ksilitol	-	-	-	-	Zayıf Pozitif	
D-riboz	+	D	+	+		
D-ksiloz	+	+	D	+		
Dulcitol	-	D	D	D	+	-
Laktoz	D	D	+	-	+	+
ONPG (β-Galaktosidaz)	+	+	+	-	+	+
Melibioz	-	-	+	+	D	+

Tablo 2.1. *Gallibacterium* türlerinin fenotipik özellikleri (devamı)

Alfa	-	-	+	+	D	+
galaktosidaz						
ONPX (β - ksilosidaz)	-	D	+	D	+	-
D-arabinoz	D	D	D	D	+	+
L-arabinoz	+	D	D	-	+	-
D-sorbitol	D	D	D	+	D	+
L-fruktoz	D	D	D	+	+	+
Trehaloz	D	-	-	+	-	-
Dekstrin	D	-	-	-	-	-
Raffinoz	+	D	+	+	+	+

D: değişken, +: pozitif, -: negatif sonuçları ifade eder (Bisgaard ve ark., 2009; Sing ve ark., 2016).

2.3. Epidemiyoloji

G. anatis, İsviçre, Danimarka, Almanya, Afrika ülkeleri, Nijerya ve Norveç gibi birçok ülkede, tavuk ve hindi başta olmak üzere ördek, kaz, güvercin, sığır ve koyundan izole edilmiştir (Addo ve Mohan, 1985; Bisgaard, 1977; Bojesen, 2003; Bojesen ve ark., 2003; Lawal ve ark., 2018; Neubauer ve ark., 2009; Sing ve ark., 2016). Son yıllarda Tayvan, Avusturalya, İngiltere, Suriye, Çek Cumhuriyeti, ABD, Kolombiya, İran, Meksika ve Hindistan'da da bildirimi yapılmıştır (Ataei ve ark., 2017; Bojesen, 2003; Bojesen ve ark., 2007; Chaveza ve ark., 2017; Jones ve ark., 2013; Sing ve ark., 2016).

G. anatis tavuklar başta olmak üzere birçok kanatlı türünde üst solunum yollarının (burun boşluğu, trake) ve alt genital sistemin (oviduk, ovaryum, testis) mikroflorasında bulunmaktadır (Bager ve ark., 2013; Bojesen, 2003; Bojesen ve ark., 2004; Gomez ve ark., 2005; Kristensen ve ark., 2012; Mbuthia ve ark., 2001; Paudel ve ark., 2013). Duyarlı hayvanın strese maruz kalması, bağışıklık sisteminin zayıflaması, mevsimsel (soğuk stresi) ve hormonal sistem değişikliklerine adapte olamamasına bağlı olarak *G. anatis* infeksiyonuna yakalandığı bilinmektedir (Bojesen, 2003; Sing ve ark., 2016).

G. anatis'in asıl konakçısı tavuk olmasına rağmen hindi, kaz, ördek, sülün, keklik, muhabbet kuşu, tavus kuşu, kafes kuşları, papağan, yabani kuşlar, sığır ve domuz gibi birçok hayvan türünden izole edilmiştir (Bager ve ark., 2013; Bisgaard ve ark., 2009; Bojesen, 2003; Bojesen ve ark., 2003; Jones ve ark., 2013; Neubauer ve ark., 2009; Paudel ve ark., 2014; Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016; Sing ve ark., 2016). Etken primer etken olarak septisemiye yol açabildiği gibi, özellikle tavuklarda *E. coli* ile beraber seyrederek solunum sistemi infeksiyonlarına sekonder olarak eşlik edebilmektedir (Mushin ve ark., 1979; Sing, 2016).

G. anatis duyarlı hayvanlar dışında özellikle bağışıklığı baskılanmış insanlarda da infeksiyon oluşturmakta ve ölüme kadar götürebilen ağır bakteriyemi tablosu meydana getirmektedir (Aubin ve ark., 2013). Etkenin insanlara bulaşma yolları kesin

olarak bildirilmemesine rağmen, Aubin ve ark. (2013) tarafından insandan izole edilen *G. anatis*'in kontamine gıda kaynaklı olabileceğini bildirilmiştir.

Kanatlı hayvanlarda *G. anatis*'in bulaşmasında horizontal yol ön plana çıkmaktadır (Bisgaard, 1977; Sing, 2016). *Pasteurellaceae* familyasında vertikal bulaşma yaygın olmamasına rağmen, Paudel ve ark. (2014) deneysel bir çalışmada etkeni 4 günlük bir civcivin sarı kesesinden izole ederek, trans-ovaryan bulaşmaya dikkat çekmiştir (Paudel ve ark., 2014; Sing, 2016). Enfeksiyonun çiftleşme yoluyla bulaşmasında infekte horozların semenleri etkili olmaktadır (Mushin ve ark., 1979; Sing, 2016; Sing ve ark., 2016). Bu şekilde üreme organlarına etkenin bulaşmasında aşağıdan yukarı doğru (kloaka, vajina, uterus, istmus, magnum, infundibulum, ovarium folikülleri) bir yol izlemesi muhtemeldir (Bisgaard ve ark., 2009).

Epidemiyolojik araştırmalarda en tartışmalı konu, hayvanların yaşı ile hastalığa yakalanma oranı arasında bir ilişki olup olmadığıdır (Bojesen ve ark., 2003). Ancak hayvanların etkene duyarlılığında yaş faktörünün rolü henüz bilinmemektedir (Bojesen, 2003). Bojesen ve ark. (2003), yapmış oldukları bir çalışmada; 18-64 haftalık yaştaki hayvanlarda yaştan, hastalanma oranıyla ilgili olup olmadığı ve hasta hayvanların enfeksiyonu tamamen atlatıp atlatamadığını incelemiş ve kullandıkları yaş aralığının *Gallibacterium* prevalansı üzerinde etkisi olmadığını bildirmişlerdir (Bojesen ve ark., 2003). Paudel ve ark. (2013), 3-4 haftalık yaş aralığındaki spesifik patojen free (SPF) horozları *G. anatis* ile infekte ederek testislerdeki kolonizasyonu incelemişler ve kullanılan yaş aralığının testislerde meydana gelen lezyonlarla ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir. Gerlach (1977) deneysel olarak yapmış olduğu bir çalışmada, tavuklardan izole ettiği *G. anatis* suşunu birkaç günlük civcivlere intraperitoneal olarak uygulamış ve 48 saat sonra mortalite oranının % 85-90'a ulaştığını bildirmiştir.

2.4. Patogenez ve Virülens Faktörleri

G. anatis sağlıklı tavukların üst solunum (burun boşluğu, trake) ve alt genital sistem mikrobiyotasının bir parçasıdır. Oportunistik bir patojen olarak salpingitis, peritonitis, perikarditis, hepatitis ve enteritis tablolarına sebep olmaktadır.

(Christensen ve ark., 2003; Bager ve ark., 2013; Bojesen, 2003; Gomez ve ark., 2005).

G. anatis'in konakçı mukozal membranlarına kolonize olarak hastalık oluşturma yeteneğinin en önemli unsurunu aderens ve invazyon gibi virülens mekanizmaları oluşturmaktadır (Zhang ve ark., 2017). Patogenezin kaçınılmaz basamağı, etkenin duyarlı konakçı hücrelerine adere olduktan sonra çoğalması ve hızlı bir şekilde virülens faktörlerini özellikle invazin ve sitotoksinleri kodlayan genleri eksprese ederek klinik tablonun oluşmasını sağlamaktadır (Chang ve ark., 1993a, 1993b, 1995). *G. anatis*'in trake, orofarengeal ve ovidukt epitelinde kolonizasyonu ve invazyonunu sağlayan en önemli virülens faktörleri arasında konakçı immun yanıtını baskılayan IgG yıkıcı proteaz, RTX toksini ve hemaglütinini sayılabilir (Lucio ve ark., 2012; Vaca ve ark., 2011; Zang ve ark., 2017). Diğer taraftan *G. anatis*'in cam ve plastik gibi inert yüzeylere bağlanarak, biyofilm oluşturduğu ve glikoprotein benzeri hemaglütinin ürettiği bildirilmiş, ancak bu faktörlerin kolonizasyon ve infeksiyondaki rolü ile ilgili bilgiler netleşmemiştir (Bisgaard ve ark., 2009; Kudirkiene ve ark., 2014; Ramirez-Apolinar ve ark., 2012; Vaca ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2014).

G. anatis'in 1-2 mikron uzunluğunda olan fimbriyası ile konakçı hücrelerine tutunarak istila ettiği bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2013; Kudirkiene ve ark., 2014; Montes-Garcia ve ark., 2015; Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016). *G. anatis*'te F-17 benzeri fimbriya kümeleri tanımlanmış ve bu tür fimbriyaların avian patojenik *E. coli* (APEC) başta olmak üzere *E. coli*'nin diğer patojen suşlarında da bulunduğu bildirilmiştir (Bager ve ark., 2013; Kudirkiene ve ark., 2014; Persson ve Bojesen, 2015; Sing ve ark., 2016). F17-benzeri fimbriyaların bir şaperon, bir usher proteini, bir adezin ve *flfD*, *flfC*, *flfG* ve *flfA* olarak adlandırılan ve yapısal alt birimde bulunan dört gen kümesi tarafından kodlandığı ve şaperon ile usher proteininin fimbriyaların gövdesini oluşturan yapısal alt birim proteininin katlanmasını ve birleşmesini kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür (Bager ve ark., 2013; Kudirkiene ve ark., 2014; Persson ve Bojesen, 2015). *G. anatis* için tanımlanmış olan fimbriyaların tam olarak rolü, hedef hücreleri ve işlevi henüz netleşmemiştir (Bager ve ark., 2013; Kudirkiene ve ark., 2014; Persson ve Bojesen, 2015). Fimbriyalar yalnızca virülens faktörü olarak değil, hastalıktan korunmada geliştirilen aşı çalışmalarında da kullanıldıkları için büyük öneme sahiptirler (Kudirkiene ve ark., 2014; Sorour ve ark., 2015).

Ekstrasellüler polisakkaritten oluşan kapsülün Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde virülens faktörü olarak kabul edilmesine rağmen, *G. anatis*'in sahip olduğu kapsülün işlevi henüz bilinmemektedir (Johnson ve ark., 2013; Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016). *G. anatis* üzerinde ince bir kapsülün varlığı Kjos-Hansen (1950) tarafından transmisyon elektron mikroskobu ile doğrulanmış, fakat eskimiş kültürlerde kapsülün tespit edilemediği bildirilmiştir (Bisgaard, 1977).

Metalloproteazlar kolonizasyon, besin alımı, bağışıklık sisteminin baskılanması ve sistemik dolaşımda bakteriyel invazyon dahil olmak üzere virülenste birçok önemli görevi olan proteaz sınıfıdır (Persson ve Bojesen, 2015). *G. anatis* için birkaç hücre dışı çinko içeren metalloproteaz enzimi tanımlanmıştır (Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016; Sing ve ark., 2016). Etkenin patogeneğinde metalloproteazların rolü bilinmemekle birlikte proteolitik kabiliyetinden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016).

G. anatis biovar *Haemolytica*'nın tanımlanmasındaki en önemli özellik kanlı agar üzerinde oluşturduğu β -hemolitik alanlardır (Persson ve Bojesen, 2015). *Gallibacterium* toksin A (GtxA)'nın eritrositleri parçalayarak hemolizli alanların oluşumundan sorumlu olduğu ve aynı zamanda bağışıklıkta önemli rolü olan RTX benzeri bir toksin olduğu bildirilmiştir (Persson ve Bojesen, 2015). Bu toksinin *G. anatis* için en iyi tanımlanmış virülens faktörü olmasına rağmen, patogeneindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Alispahic, 2011; Johnson ve ark., 2013; Kudirkiene ve ark., 2014; Persson ve Bojesen, 2015; Sing ve ark., 2016).

RTX toksinleri *Pasteurellaceae* ailesinin birçok üyesinde bulunan ve Gram negatif bakterilerde salgılanan bir ekzoproteindir (Sing ve ark., 2016). RTX toksini *G. anatis*'in hemolitik ve lökotosik özelliklerinden sorumlu tutulmaktadır (Alispahic ve ark., 2011; Kristensen ve ark., 2011; Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016; Sorour ve ark., 2015). RTX toksinleri, transkripsiyon düzeninde sırasıyla *rtxC*, *rtxA*, *rtxB* ve *rtxD* genlerini içeren bir operon tarafından kodlanmaktadır (Johnson ve ark., 2013; Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016; Sing ve ark., 2016). RTX familyasına ait olan MARTX geni (multifunctional autoproteolysis RTX) ise bazı yüksek molekül ağırlıklı toksinlerin aktin proteinine bağlanmasını sağlamaktadır (Persson ve Bojesen, 2015;

Sing ve ark., 2016). Aktinin bağışıklık hücresinin tanınması, bağışıklık hücresinden sinyal moleküllerinin üretilerek serbest bırakılması ve fagositozu sağlanması gibi önemli fizyolojik özellikleri bildirilmiştir (Persson ve Bojesen, 2015).

G. anatis'in cam ve plastik gibi yüzeylere bağlanabilmesi biyofilm oluşumundaki ilk adım olarak kabul edilmektedir (Sing ve ark., 2016; Vaca ve ark., 2011). *G. anatis* için biyofilm oluşumu, kronik infeksiyonlarda etkenin üst solunum yolu ve genital sistemde tutunmasını sağladığı gibi antimikrobiyallere karşı artan dirençle de ilişkilendirilmiştir (Bager ve ark., 2013; Johnson ve ark., 2013; Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016).

Zepeda ve ark. (2009), *Gallibacterium* cinsine ait 7 farklı referans suşunun hemagglütinasyon aktivitesine sahip olduğunu ilk kez bildirmiştir (Persson ve Bojesen, 2015; Sing ve ark., 2016). Hemagglütinasyon aktivitesinin rolü ve önemi henüz tam olarak açıklanmamış olmasına rağmen, patojenite de önemli olabileceği belirtilmiştir (Persson ve Bojesen, 2015; Zepeda ve ark., 2009).

2.5. Klinik Bulgular

Tavuklarda *G. anatis*'in oluşturduğu infeksiyonunun klinik bulguları patognomonik değildir. *G. anatis* infeksiyonunda akut sepsisemi belirtisi görülen yalancı veba, kuş gribi ve tavuk kolerasına benzer belirtiler görülür ve bu durum tanı da karışıklığa yol açabilir (Addo ve Mohan, 1985; Bisgaard ve ark., 2009; Bojesen ve Shivaprasad, 2006; Bojesen ve ark., 2011; El-Adawy ve ark., 2018; Johnson ve ark., 2013; Persson ve Bojesen, 2015; Sing, 2016). Klinik belirtilerin şiddeti, hastalığın süresi ve ölüm oranı hayvanların bağışıklık sistemine, kümeslerdeki bakım ve beslenme şartlarına, alınan biyogüvenlik önlemlerine göre değişiklik gösterebilmektedir (Sing ve ark., 2016). Bununla beraber yüksek patojeniteye sahip *G. anatis* suşlarının mortalite oranını % 85-90'a kadar çıkarabileceği bildirilmiştir (Bojesen, 2003).

G. anatis infeksiyonu broyler tavuklarda solunum güçlüğü, burun akıntısı gibi solunum sistemi bulgusu ile birlikte yüksek mortalite ile seyrederken (Bisgaard, 1977;

Kristensen ve ark., 2011; Kudirkiene ve ark., 2014), yumurtacı tavuklarda yumurta veriminde düşmeye yol açtığı ifade edilmiştir (Christensen ve ark., 2003; Jones ve ark., 2013; Mbuthia ve ark., 2001; Mushin ve ark., 1979; Paudel ve ark., 2014). Horozlarda ise semen kalitesinde, sperm yoğunluğunda, motilitede önemli ölçüde azalmaların meydana geldiği rapor edilmiştir (Mushin ve ark., 1979; Paudel ve ark., 2014).

2.6. Nekropsi Bulguları

Nekropside yumurtalıklarda atrofi ve kanama, ooforitis, foliküllerde dejenerasyon gibi genital sistemde ciddi lezyonların görüldüğü bildirilmiştir (Mushin ve ark., 1980; Paudel ve ark., 2014). Enfeksiyona duyarlı hayvanlarda sepsis tablosuna ek olarak akciğerde ödem ve hiperemi, hava kesesinde yangı, hidroperikardium, perikarditis, karaciğerde hemoraji, nekroz ve perihepatitis, trake, kalp ve böbrekte kanamalar, karaciğer, böbrek ve dalakta hipertrofiye eşlik eden seroz zarlarda serohemorajik eksudat birikimi, peritonitis ve asites görülebileceği açıklanmıştır (Addo ve Mohan, 1985; Bojesen, 2003; Johnson ve ark., 2013; Jones ve ark., 2013; Neubauer ve ark., 2009; Paudel ve ark., 2014).

2.7. Teşhis

Tavuklarda *G. anatis* enfeksiyonunun klinik belirtilerinin patognomik olmaması; yalancı veba, kuş gribi ve kolera ile benzer semptomlar oluşturması teşhiste karışıklığa sebep olmaktadır (Bisgaard ve ark., 2009; Bojesen, 2003; Bojesen ve ark., 2003; Bojesen ve ark., 2011; El-Adawy ve ark., 2018; Johnson ve ark., 2013).

G. anatis teşhisi hem fenotipik hem de genotipik yöntemler kullanılarak yapılmaktadır (Bojesen ve ark., 2011). *Gallibacterium* cinsine ait türler (*G. genomospecies* 1 ve 2) arasında heterojenite olduğu için fenotipik karakterizasyona bağlı olarak yapılan tanı yöntemlerinin zor ve zaman alıcı olduğu belirtilmiştir (Alispahic ve ark., 2011; El-Adawy ve ark., 2018; Sing, 2016). Ancak günümüzde fenotipik karakterizasyonunun 16S rRNA-23S rRNA sekansı ile desteklenmiş olması tanı için önem arz etmektedir (Alispahic ve ark., 2011; Bojesen, 2003).

G. anatis'in tanısı ve tiplendirmesi için PZR (Polymerase chain reaction), Real-time PZR, MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), FISH (Fluorescent 16S rRNA in situ hybridization), LAMP (Loop mediated isothermal amplification), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) gibi birçok genotipik yöntem kullanılmıştır (Alispahic, 2011; Bojesen ve ark., 2003; Bojesen ve Shivaprasad, 2006; Çetinkaya ve Ayhan, 2012; Paudel ve ark., 2013; Sing ve ark., 2016; Stepien-Pysniak ve ark., 2018; ; Yılmaz ve ark., 2014). Bu yöntemler içerisinde daha çok PZR'nın kullanıldığı (Wang ve ark., 2016), özellikle 16S rRNA-23S rRNA sekansları kullanılarak moleküler teşhisin spesifik olarak yapılabileceği bildirilmiştir (Bojesen, 2003; Chaveza ve ark., 2017; Sorour ve ark., 2015).

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)'in, *Gallibacterium* cinsinin tüm genomunun karakterizasyonunu ortaya koyarak alt soylarının tanımlanmasında yardımcı bir moleküler tekniktir. Bu teknik ile izolatlar arasındaki benzerlik veya farklılıkların ortaya konulabileceği ve salgın durumlarında kullanılacak en güvenilir yöntemlerden biri olacağı ileri sürülmüştür (Bojesen ve ark., 2003; Bojesen ve Shivaprasad, 2006).

2.8. Sağaltım

G. anatis infeksiyonunda yaşanan yumurta verim kayıpları, mortalite ve ciddi tedavi masrafları ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Bager ve ark., 2013; Sing, 2016). *G. anatis*'in tedavisinde etkili antibiyotik tedavisine ihtiyaç duyulmaktadır (Bojesen ve ark., 2011). Günümüzde antibiyotik duyarlılığı ile ilgili sınırlı bilgilere sahip olunan *G. anatis*'in teşhis edildiği sürülerde kanatlı kolerasında uygulanan antimikrobiyal temelli tedavi yöntemleri denenmiş, fakat etkisiz bulunmuştur (Jones ve ark., 2013; Lawal ve ark., 2018). Bu durumun son yıllarda *Pasteurellaceae* ailesinde artan antimikrobiyal direnç ile de açıklanabileceği bildirilmiştir (Bojesen ve ark., 2011; El-Adawy ve ark., 2018; Sing, 2016). Tavuk orijinli *Gallibacterium* izolatlarının novobiosin, tilosin, klindamisin, spektinomisin, tetrasiklin ve penisilinlere

karşı direnç geliştirdiği açıklanmıştır (Gautier, 2005; Jones ve ark., 2013; Matthes ve Hanschke, 1977). Ayrıca son yıllarda β -laktam, aminoglikozid, fenikol ve sulfanamidlere karşı *G. anatis* izolatlarında değişken oranlarda direnç profilleri elde edilmiştir (Jones ve ark., 2013; Sing ve ark., 2016; El-Adawy ve ark., 2018; Lawal ve ark., 2018).

2.9. Koruma ve Kontrol

Hastalık etkenlerini kanatlı işletmelerinden uzak tutabilmek için yapılan her türlü uygulama işletme biyogüvenliği çatısında incelenmektedir ve son 10-15 yıldır kanatlı işletmelerinde biyogüvenliğe verilen önem sürekli olarak artmaktadır (Bojesen ve ark., 2003). Biyogüvenlik hastalıkların çıkışını ve yayılışını engelleyerek, sağlıklı sürüler yetiştirtirmeyi amaçlar ve bu doğrultuda öncelikli hedef, civcivlerin infekte olmayan, hastalık taşımayan, sağlıklı sürülerden alınarak hijyenik şartlara uygun ve biyogüvenlik önlemleri alınmış işletmelerde yetiştirilmelerini sağlamaktır (Akan, 2015; Aydın, 1984; Sungur ve Çöven, 2009). *G. anatis*'in vertikal yolla bulaşma olasılığı nedeniyle anaç sürülerin bulunduğu kümeslerde biyogüvenlik önlemlerine daha fazla önem verilmesi gerektiği belirtilmiştir (Paudel ve ark., 2014). Özellikle biyogüvenlik seviyesi düşük olan kümeslerde *G. anatis* pozitifliğinin yüksek olduğu da yapılan bildirimler arasındadır (Bojesen ve ark. 2003). Bu nedenle *G. anatis* ile mücadelenin en etkili yolunun işletmelerde alınacak biyogüvenlik önlemleri olduğu bildirilmiştir (Persson ve Bojesen, 2015; Sing ve ark., 2016).

Biyogüvenlik uygulamalarının yanı sıra *G. anatis* infeksiyonlarından korumada tercih edilecek aşılarda *flfA* ve *GtxA-N* gibi iki önemli virülens faktörünün bulunması gerektiği ileri sürülmüştür (Pedersen, 2015). Ancak son yıllarda yeni ve potansiyel olarak geniş ölçüde koruyucu immünojenlerin tanımlanması için pan-genomik RV (reverse vaccinology) yaklaşımının da tercih edildiği bildirilmiştir (Bager ve ark., 2014; Hatfaludi ve ark., 2012; Medini ve ark., 2005; Rappuoli, 2001). Pan-genomik aşı geliştirme çalışmaları 1990'lı yılların ortalarından itibaren sürdürülmekte ve binlerce farklı organizmaya ait genom projelerinden elde edilen biyoinformatik sonuçların aşı teknolojisine entegre edilmesiyle ortaya çıktığı bilinmektedir (Özcengiz, 2012). Bu yaklaşım genomdaki belirli dizi motiflerinden yola çıkarak, hücre zarı

proteinleri veya konak yapılarını tanıyan ve onlarla etkileşim içinde olan proteinleri içermektedir (Özcengiz, 2012). *G. anatis* infeksiyonların korunmasında da bu amaçla immünizasyon özelliği olan 71 protein tanımlanmış, ancak kanatlı endüstrisinde henüz uygulama alanı bulamamıştır (Aarestrup, 2005; Bager ve ark., 2014).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Bakteri Suşları

Çalışmada kullanılan *G. anatis* F149T (hemolitik olmayan suş, ATCC 43329) ve 12656-12 suşu (hemolitik suş) Prof. Anders Miki Bojesen'den (Kopenhag Üniversitesi Veteriner Hastalıkları Biyoloji Bölümü) temin edildi.

3.1.2. Tavuk Örnekleri

Çalışmada solunum sistemi infeksiyon bulguları ile birlikte yumurta veriminde düşüş gözlenen yumurtacı tavuk işletmelerindeki 12-85 haftalık yaş aralığında ölü 200 adet tavuk toplandı. Örnekler Afyonkarahisar (153 adet), Gaziantep (4 adet) ve Kütahya (43 adet) illerinde bulunan toplam 31 yumurtacı tavuk işletmesinden Ağustos 2017- Ocak 2018 ayları arasında toplandı. Çalışmada ölü tavukların trake (200 adet), kalp (200 adet), karaciğer (200 adet), akciğer (200 adet), ve dalak (200 adet) örnekleri kullanıldı. Örneklerin temin edildiği kümese ait [kümes kapasitesi, ilk hafta mortalite (%), son üç gün ölüm değeri, son hafta mortalite (%), canlı ağırlık, v.b.] bilgiler kayıt altına alındı. Tez kapsamında alınan materyallerin kümes bilgileri tablo 3.1'de verildi. Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın (MAKÜ- HADYEK/ 2017-314) onayı ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Tavuk örneklerinin toplandığı kümesler

Kümes No	Kümesin Bulunduğu İl	Hayvanırkı	Hayvanın Yaşı	Örneklenen Hayvan Sayısı
1	Kütahya	Lohmann white	180 günlük	5
2	Afyonkarahisar	Lohmann white	76 haftalık	3
3	Afyonkarahisar	Lohmann white	64-66 haftalık	2
4	Afyonkarahisar	Lohmann white	64-66 haftalık	3
5	Afyonkarahisar	Lohmann white	16 haftalık	3
6	Afyonkarahisar	Süpernick	130 günlük	19
7	Afyonkarahisar	Lohmann white	60 haftalık	17
8	Afyonkarahisar	Lohmann white	65 haftalık	4
9	Afyonkarahisar	Lohmann white	55 haftalık	4
10	Afyonkarahisar	Lohmann white	85 haftalık	12
11	Afyonkarahisar	Lohmann white	12 haftalık	16
12	Afyonkarahisar	Lohmann white	52 haftalık	2
13	Afyonkarahisar	Lohmann white	60 haftalık	6
14	Afyonkarahisar	Lohmann white	85 haftalık	11
15	Afyonkarahisar	Lohmann white	60 haftalık	6
16	Kütahya	Lohmann white	48-50 haftalık	6
17	Kütahya	Lohmann white	36 haftalık	4
18	Kütahya	Lohmann white	70 haftalık	5
19	Afyonkarahisar	Atak-S	32 haftalık	2
20	Kütahya	Lohmann white	68 haftalık	4
21	Kütahya	Süpernick	75 haftalık	14

Tablo 3.1. Tavuk örneklerinin toplandığı kümesler (devamı)

22	Afyonkarahisar	Süpernick	140 günlük	5
23	Afyonkarahisar	Lohmann white	65 haftalık	9
24	Afyonkarahisar	Lohmann white	75 haftalık	7
25	Afyonkarahisar	Lohmann white	35 haftalık	5
26	Afyonkarahisar	Lohmann white	66 haftalık	4
27	Afyonkarahisar	Lohmann white	75 haftalık	3
28	Gaziantep	Lohmann white	57 haftalık	4
29	Afyonkarahisar	Lohmann white	30 haftalık	6
30	Afyonkarahisar	Nick chick white	120 günlük	5
31	Afyonkarahisar	Lohmann white	36 haftalık	4
TOPLAM				200

3.1.3. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri

Kanlı Agar

Lab-lemco tozu.....	10 g
Nötralize pepton.....	10 g
NaClO ₂ (Sodyum klorit)	5 g
Agar.....	15 g
Distile su.....	1000 ml

Koyun kanı.....%5-10

Tüm içerik distile suda karıştırılarak, besiyeri pH 25°C'de $7,0 \pm 0,2$ 'e ayarlandı. 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildikten sonra 50°C'ye soğutulan besiyerine %5-10 koyun kanı eklendi. Besiyeri 90 mm çapındaki steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

MacConkey Agar

Pepton.....20 g
Laktoz.....10 g
Safr tuzları.....5 g
NaClO₂ (Sodyum klorit)5 g
Nötral red.....0,075 ml
Agar.....12 g
Distile su.....1000 ml

Tüm içerik distile suda karıştırılarak, besiyeri pH 25°C'de $7,0 \pm 0,2$ 'e ayarlandı. 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildikten sonra 50°C'ye soğutulan besiyeri 90 mm çapındaki steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Brain Heart Infusion Sıvı Besiyeri

Beyin infüzyon.....12,5 g
Sığır kalp infüzyon.....5 g
Proteaz pepton.....10 g
Glikoz.....2 g
NaClO₂ (Sodyum klorit)5 g
Na₂HPO₄ (disodyumfosfat)2,5 g

Distile su.....1000 ml

Tüm içerik distile suda karıştırılarak, besiyeri pH 25°C’de $7,0 \pm 0,2$ ’e ayarlandı. otoklavda steril edildikten sonra 50°C’ye soğutulan besiyeri 90 mm çapındaki steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

3.1.4. Biyokimyasal Testler

Karbonhidrat Fermentasyon Test Besiyeri

Triptoz veya Proteoz Pepton.....10 g
NaCl (Sodyum klorür)5 g
Distile su.....1000 ml
Brom Kreozol Moru.....2.5 ml
Karbonhidrat.....%1

Tüm içerik distile suda karıştırıldı. Besiyerinin pH'sı 7.4 ± 0.2 ’e ayarlandıktan sonra 121°C’de 15 dk otoklavda steril edildi. %1 karbonhidrat içeren steril besiyeri 4-5 ml miktarda tüplere taksim edildi.

Üreli Besiyeri

Üre.....20 g
Monopotasyum fosfat.....9,1 g
Disodyum fosfat.....9,5 g
Maya ekstratı.....0,1 g
Fenol kırmızısı.....0,01 g
Distile su.....1000 ml

Tüm içerik distile suda karıştırıldı. 121°C’de 15 dk otoklavda steril edildi ve besiyeri 4-5 ml miktarda tüplere taksim edildi.

Katalaz Test Ayıracı

H₂O₂.....300 ml
Distile su.....1000 ml

Stok % 30'luk H₂O₂ (1 ml) üzerine 9 ml distile su ilave edilerek %3'lük kullanım ayıracı hazırlandı.

Oksidaz Test Ayıracı

Tetrametilfenilendiamin.....5 g
Distile su.....1000 ml

Tüm içerik karıştırılarak ayıraç hazırlandı.

İndol Test Ayıracı (Kovaks')

4-Dimetilaminobenzadehid.....5 g
Hidroklorik asit.....25 ml
2-Metilbütan-2-ol.....75 ml

Tüm içerik karıştırılarak ayıraç hazırlandı.

ONPG (*o*-Nitrofenil β -D-galaktopiranozid) Diski

Fosfat tamponlu *o*-Nitrofenil β -D-galaktopiranozid emdirilmiş ticari disk (OXOID, İngiltere) kullanıldı.

3.1.5. Moleküler Tanıda Kullanılan Cihazlar

Elektroforez Jel Ünitesi

Nükleik asitlerin agaroz jel üzerinde elektrik akımı yardımıyla ayrışmasını sağlamak için kullanıldı (SERVA, BM100, İngiltere).

Elektroforez Güç Kaynağı

Elektroforez jel ünitesinin ihtiyacı olan enerjiyi sağlamak için kullanıldı (Teko, İtalya).

Etüv

İzolasyon ve identifikasyon sürecinde bakterilerin inkübasyonu için gerekli ortamı sağlamak için kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

Görüntüleme Cihazı

Jelde yürütülen DNA fragmentlerinin görüntülenmesi için kullanıldı (EDAS 290, Kodak, ABD).

Fotoğraf Makinesi

Görüntüleme cihazı ile görüntülenen ürünlerin bilgisayara aktarılması için kullanıldı. (Digital Graphic Printer, Kodak, ABD)

Jel Elektroforez Ünitesinin Tarakları

Jel üzerinde 1-2mm kalınlıkta, 7µl hacim alan, 16 adet kuyucuk açan 2 adet tarak (Scie-plas, HU10, İngiltere)

Manyetik Karıştırıcı

Besiyerlerinin sterilizasyon öncesi berrak ve iyi karışmış bir solüsyon haline gelmesi için karıştırıcı (Isolab, Almanya) kullanıldı.

Mikrodalga Fırın

Agarozun TBE tamponu içerisinde eritilmesi için gerekli istenen sürede ısı sağlayan mikrodalga fırın (Beko, Türkiye) kullanıldı.

Otoklav

Besiyerlerinin, cam malzemelerin ve ayıraçların basınçlı buhar sterilizasyonu için otoklav (HIRAYAMA, Japonya) kullanıldı.

Pipetler

0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl'lik (Thermo Scientific, İngiltere) pipetler kullanıldı.

PZR Cihazı

Genomik DNA'nın istenen bölgesinin çoğaltılması için PZR cihazı (Nyx Teknik, A6-00150, ABD) kullanıldı.

Santrifüj

Merkez kaç kuvveti sayesinde süspansiyon halindeki katı maddelerin bulunduğu sıvıdan ayrılması için kullanıldı (Hermle Labortechnik, Almanya).

Tartım Cihazı

Besiyeri ve agaroz hazırlanırken tartım yapmak için hassas tartım cihazı (Sartorius, Almanya) kullanıldı.

Termal Blok

Genomik DNA ekstraksiyonu sırasında uygun ısı ve sürenin sağlanması için termal blok (TDB-120, Letonya) kullanıldı

Vorteks

Koleksiyon tüplerinin içerdiği süspansiyonu karıştırmak için (MS1 Minishaker IKA, ABD) kullanıldı.

3.1.6. Primerler

Tablo 3.2. *G. anatis* teşhisi için PZR aşamasında kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizilimi	PZR ürünü
1133F	5'-TATTCTTTGTTACCARCGG-3'	790bp/1080bp
114 R	5'-GGTTTCCCCATTCGG-3'	

3.1.7. Moleküler Tanıda Kullanılan Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar

Agaroz

Elektroforez ünitesinde DNA fragmentlerinin yürütülmesi için lineer bir polimer olan agaroz kullanıldı (Sigma-Aldrich Low EEO, 9012-36-6, ABD).

dNTP

Polimerizasyon reaksiyonu için gerekli enerji ve nükleotid kaynağını oluşturması için kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

Elektroforez Tamponu

DNA'nın elektroforetik hareketliliği için 10x TBE Buffer kullanıldı (Tris-borik asit-EDTA, BU-120, Jena Bioscience, Almanya).

Genomik DNA Ekstraksiyonu için kullanılan kit

Bakteri kolonisi, doku ve organlardan genomik DNA ekstraksiyonu için hazır ticari kit kullanıldı (Thermo Scientific GeneJet Genomik DNA Purification kit, K0721, Litvanya).

Marker

Elektroforez aşamasında kalıp DNA'nın ölçümünü yapmak için 100 bp'lik marker kullanıldı (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, ABD).

MgCl₂

Polimerizasyon reaksiyonu için ortamın direnci, pH'sı ve enzimatik reaksiyonları düzenlemesi için kullanıldı (Thermo Scientific, ABD)

Taq DNA Polimeraz

Optimal polimerizasyon reaksiyon için yüksek ısıya dayanıklı bir enzim kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

10X Taq Buffer

Polimerizasyon reaksiyon enziminin çalışması için gerekli stabil pH şartlarını sağlaması için kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

Yükleme Solüsyonu

DNA örneği ile karıştırılarak (6x Loading Dye, NM0410 Thermo Scientific, ABD) jelde yürütme sağlamak için kullanıldı.

Safe Dye

Jel elektroforez aşamasında jel ile karıştırılarak DNA'nın görüntülenmesi için kullanıldı (Jena Bioscience, Almanya).

3.2. Yöntem

3.2.1. *G. anatis*'in İzolasyon ve İdentifikasyonu

Yumurtacı tavuklardan alınmış doku ve organ örneklerinin %5 koyun kanlı ve MacConkey agara ekimi yapılarak, 37°C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda β -hemolitik, parlak ve S tipli koloniler Gram boyama yöntemiyle boyanarak mikroskopik olarak incelendi. Gram negatif çomak şeklinde görülen bakterilerin identifikasyonu biyokimyasal testler ile yapıldı (Bager ve ark., 2013; Bojesen ve Shivaprasad, 2006). *G. anatis* izolasyon ve identifikasyonu için tablo 3.3'deki biyokimyasal testler kullanıldı.

Tablo 3.3. *G. anatis*'in izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler

Biyokimyasal testler	Reaksiyon
Katalaz	+
Oksidaz	+
Üreaz	-
İndol	-
MacConkey agarda üreme	D
Sükroz	+
Arabinoz	-
Laktoz	D
Dekstrin	D
Sorbitol	D
Trehaloz	D
Maltoz	+
Fruktoz	D
Mannitol	+
ONPG (β - Galaktosidaz)	+

D: değişken, +: pozitif, -: negatif

3.2.2. *G. anatis*'in Moleküler Tanısı

G. anatis olarak tanımlanan izolatlar ile doku ve organlardan (akciğer, trake, karaciğer, kalp ve dalak) DNA ekstraksiyonu, total genomik DNA ekstraksiyonu ticari kiti (GeneJet Genomik DNA Purification kit, Thermo Scientific, K0721, Lithuania)

kullanılarak ve kit talimatlarına uygun şekilde aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı. Ekstraksiyon sonunda elde edilen DNA örnekleri amplifikasyon aşamasına kadar -20°C’de saklandı. DNA ekstraksiyonunun ardından çalışmada yer alan primerler ile konvansiyonel PZR uygulandı.

3.2.2.1. Bakteri kolonisinden DNA ekstraksiyonu

1. 2×10^9 bakteri hücresi olacak şekilde 1-2 adet bakteri kolonisi 200 µl steril distile su içerisine konularak 5000xg 10 dk santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası elde edilen pelet, 180 µl digestion solüsyonu ile süspanse edildi. Daha sonra 20 µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi. Lizis için 56°C’de 30 dk inkübe edildi.
3. 20 µl RNase A eklendi ve vortekslenerek 10 dk oda ısısında bekletildi.
4. 200 µl lizis solüsyonu eklendi. Homojen bir karışım elde etmek için 15 saniye vorteks yapıldı.
5. 400 µl %50’lik etanol eklendi ve vortekslendi.
6. Hazırlanan lizat, spin column tüpüne aktarıldı. 6000 g 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak, 2 ml’lik yeni bir koleksiyon tüpü takıldı.
7. 500 µl wash buffer I solüsyonundan eklendi 8000 g 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak, yeni bir koleksiyon tüpü takıldı.
8. 500 µl wash buffer II solüsyonundan eklendi 12000 g 3 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak, spin column 1,5 ml’lik ependorfa takıldı.
9. 200 µl elution buffer eklendi ve 2 dk oda ısısında inkübasyonu takiben 8000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
10. Spin column atıldı ve 1,5 ml’lik ependorf içerisinde saf DNA elde edildi.

3.2.2.2. Doku ve organ örneklerinden DNA ekstraksiyonu

1. Her biri 20 mg olacak şekilde akciğer, trake, karaciğer, kalp ve dalak örneklerin her biri küçük parçalara ayrıldı ve 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine konuldu. Üzerine 180 µl digestion solüsyonu eklenerek süspanse edildi. Süspanسیون üzerine 20 µl Proteinaz K eklenerek vortekslendi.

2. Doku süspanسیونu 56°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Üzerine 20 µl RNase A eklendi ve vorteklenerek 10 dk oda ısısında bekletildi.

3. 200 µl lizis solüsyonu eklendi ve 15 saniye vortekslendi.

4. 400 µl %50'lik etanol eklendi ve vortekslendi.

5. Hazırlanan lizat, spin column tüpüne aktarıldı. 6000 g 1 dk santrifüj edildi. Alttaki koleksiyon tüpü atılarak, 2 ml'lik yeni bir koleksiyon tüpü takıldı.

6. 500 µl wash buffer I solüsyonundan eklendi ve 8000 g 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni koleksiyon tüpü takıldı.

7. 500 µl wash buffer II solüsyonundan eklendi ve 12000 g'de 3 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak, spin column 1,5 ml'lik ependorf takıldı.

8. 200 µl elution buffer eklendi ve 2 dk oda ısısında inkübasyonu takiben 8000 g 1 dk santrifüj edildi.

9. Spin column atıldı ve 1,5 ml'lik ependorf içerisinde saf DNA elde edildi.

3.2.2.3 PZR

PZR karışımı her bir örnek için 25 µl'lik final hacim olacak şekilde; primer, MgCl₂, dNTP, hedef DNA miktarları ve Ta ısı derecesi ve buna göre değişen PCR ddH₂O (bidistile su) miktarları ile aşağıdaki gibi hazırlandı.

Steril ddH ₂ O.....	14,8 µl
x10 PCR Buffer.....	2,5 µl
MgCl ₂ (25Mm)	3 µl
dNTP (10 Mm)	0,5 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl
Primer R (10 pmol)	1 µl
Taq Polimeraz.....	0,2 µl
DNA (25 ng\µL)	2 µl

PZR karışımı 23 µl'lik hacime tamamlanarak hazırlandı. PZR karışımından tüplere 23'er µl dağıtıldı ve her tüpe 2 µl örnek DNA'sı eklenerek toplam reaksiyon hacmi 25 µl'ye tamamlandı. Bu karışıma göre hazırlanan örnekler çoğaltma için önceden programlanan PZR cihazına yerleştirildi. PZR amplifikasyonları için Carattoli ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Örneklerin hazırlanması sırasındaki hata ve kontaminasyonları belirlemek için pozitif ve negatif kontrol kullanıldı. Aşağıda verilen amplifikasyon koşulları uygulandı.

94 °C	03.00 dk	
94 °C	01.00 dk (Denatürasyon Aşaması)	} 30 siklus
54 °C	01.00 dk (Bağlanma Aşaması)	
72 °C	01.00 dk (Uzama Aşaması)	
72 °C	07.00 dk	
+4	∞	

3.2.2.4. Elektroforez: Amplikasyon sonrasında oluşan ürünlerin değerlendirilmesi için %1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel hazırlanırken tampon solüsyon olarak

0,5 TBE tamponu kullanıldı. Agaroz, 50 ml TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra, 5 µl Safe Dye ilave edilerek, yatay jel elektroforez tablasına döküldü. Dökülen agaroz üzerine elektroforez targaı takılarak jelin katılaşması için 20 dakika beklenildi. Bu süre sonunda taraklar jele zarar vermeden çıkartıldı. Jel elektroforez tablası elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, elektroforez tankın içerisine TBE tampon solüsyonu jelin 1 mm üstüne gelecek kadar ilave edildi. Jeldeki birinci göze 5 µl DNA Marker konuldu. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 7µl alınarak, 2µl 6X loading dye ile karıştıırıldı. Bu karışımın hepsi jele yüklendi. DNA örnekleri 90 voltta 45 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu (Sambrook ve ark., 1989).

3.2.2.5. Görüntüleme: Elektroforez sonrası agaroz jel UV ışınları altında görüntüleme cihazında DNA'lar görüntülenerek fotoğraflandı. Hedef DNA'lara ait fotoğraflar bilgisayara aktarıldı.

4. BULGULAR

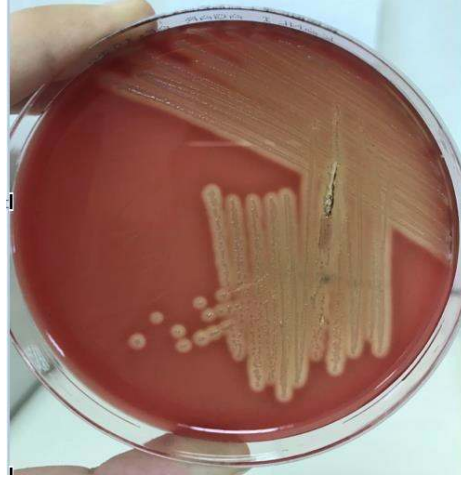
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Bu çalışmada incelenen toplam 200 adet tavuktan alınan doku ve organ materyalinden (trake, kalp, karaciğer, akciğer ve dalak) 20 (%10) adet β -hemolitik, parlak ve S tipli *Gallibacterium* spp. kolonisi izole edildi. İzole edilen bakterinin kanlı agar görünümü şekil 4.1'de verildi.

Materyallerin alındığı illere göre Afyonkarahisar'da 8 (%25,80) kümeden izolasyon yapılırken, Gaziantep ve Kütahya'da bulunan kümeslerden izolasyon yapılamadı. *Gallibacterium* spp. 10 (%5) adet akciğer, 1 (%0,5) adet kalp, 2 (%1) adet karaciğer ve 7 (%3,5) adet trakeden izole edildi, incelenen dalak örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 4.1).

Toplam 20 adet *Gallibacterium* spp. izolatının tümü katalaz pozitif iken, oksidaz testinde 9 (%45) izolat pozitif sonuç verdi. Karbonhidrat fermentasyon testleri (sükroz, arabinoz, laktoz, dekstrin, sorbitol, trehaloz, mannitol, maltoz ve fruktoz) uygulanan şüpheli kolonilerin tümünün sükrozu fermente ettiği belirlendi. İzole edilen 20 *Gallibacterium* spp.'nin 17 (%85)'si maltozu, 3 (%15)'ü laktozu, 11(%55)'i arabinozu, 10 (%50)'u fruktozu, 9 (%45)'u mannitol, dekstrin ve sorbitolu, 4 (%20)'ü trehalozu fermente etti (Şekil 4.2). Tüm izolatlara uygulanan üre ve indol testlerinde 10 (%50) adet izolatının negatif olduğu saptandı. ONPG testinde ise 12 (%60) adet izolat pozitif sonuç verdi (Tablo 4.2). Biyokimyasal test sonuçlarına göre toplam 20 izolatın *G. anatis* olduğu belirlendi. Çalışmada 200 adet tavuk örneğinde *G. anatis* izolasyonu sırasında 10 (%5) *E. coli* izole edildi. *E. coli*'lerin 6 (%60)'sı akciğer, 3 (%30)'ü trake ve 1 (%10)'inin kalpten izole edildiği belirlendi.

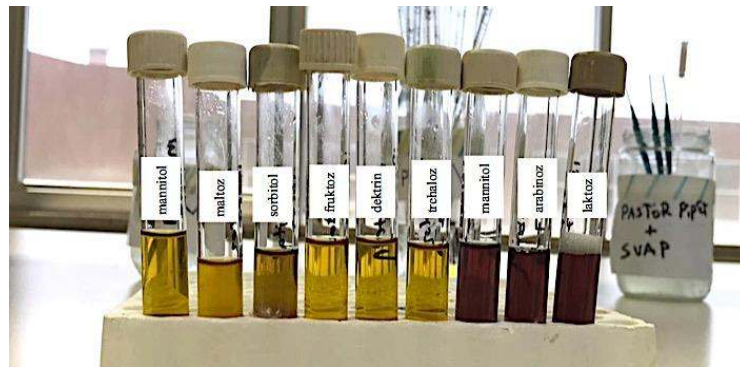
Örneklerin temin edildiği kümes sahiplerinden alınan bilgilere göre kümes kapasitelerinin 10.000-45.000 arasında olduğu ve tavukların canlı ağırlıkları 1,5-1,6 kg arasında değiştiği öğrenildi. Hayvanların ilk hafta mortalitesi %0,4-%1, son hafta mortalitesi %0,4-%0,7 ve son üç günlük ölüm değerlerinin 9-20 tavuk olduğu tespit edildi. Kümeslerde bulunan altlık kalitesinin iyi, fan ve pencere aracılığı ile yapılan havalandırmanın bazı kümeslerde kötü olduğu belirlendi.



Şekil 4.1. Kanlı agarda β - hemolitik *G. anatis* kolonisinin görüntüsü

Tablo 4.1. İzolasyon ve identifikasyon sonuçlarının organlara göre dağılımı

Kümes No	Akciğer	Dalak	Kalp	Karaciğer	Trake
6	6 (%3)	-	1(%0,5)	1(%0,5)	1(%0,5)
7	1 (%0,33)	-	-	-	1(%0,5)
10	-	-	-	-	2(%1)
11	-	-	-	-	1(%0,5)
14	-	-	-	1(%0,5)	1(%0,5)
23	2(%1)	-	-	-	-
24	1(%0,5)	-	-	-	-
31	-	-	-	-	1(%0,5)
Toplam	10(%5)	-	1(%0,5)	2(%1)	7(%3,5)



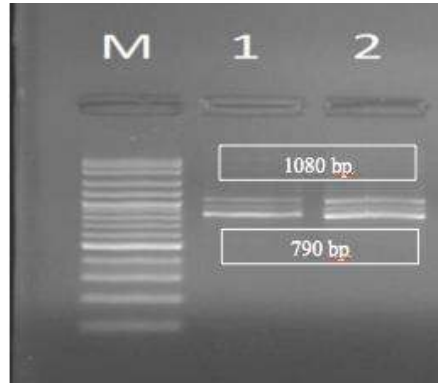
Şekil 4.2. Karbonhidrat fermentasyon test sonuçları

Tablo 4.2. *Gallibacterium* spp.'nin biyokimyasal test sonuçları

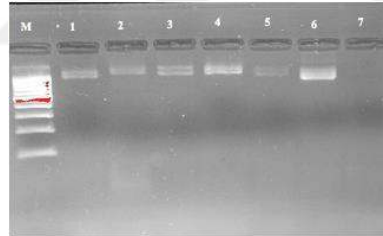
İzolat no	Katalaz	Oksidaz	MacConkey agarda üreme	Sükroz	Arabinoz	Laktoz	Dekstrin	Sorbitol	Trehaloz	Maltoz	Fruktoz	Mannitol	Üre	İndol	ONPG
1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
5	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
6	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
8	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
10	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
11	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
12	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
13	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
14	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
15	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
16	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
17	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
18	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
19	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
20	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-

4.2. PZR Bulguları

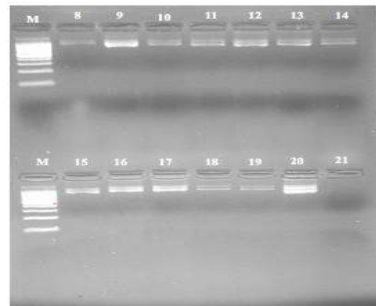
Yumurtacı tavuk işletmelerinden izole edilen 20 *G. anatis* izolatu ile pozitif kontrol suşlarının 16S-23S rRNA bölgesinin amplifikasyonu sonucunda tüm izolatlarda 790-1080 bp'lık spesifik bantlar gözlemlendi (Şekil 4.3, 4.4, 4.5).



Şekil 4.3. Pozitif kontrol suşlarının PZR görüntüsü. [(M=100bp marker; 1= pozitif kontrol suşu (F149T); 2= pozitif kontrol suşu (12656-12 suşu)]



Şekil 4.4. İzole ve identifiye edilen *G. anatis* suşlarının PZR görüntüsü. (M=100bp marker; 1-5=pozitif izolatlar; 6=pozitif kontrol; 7=negatif kontrol)

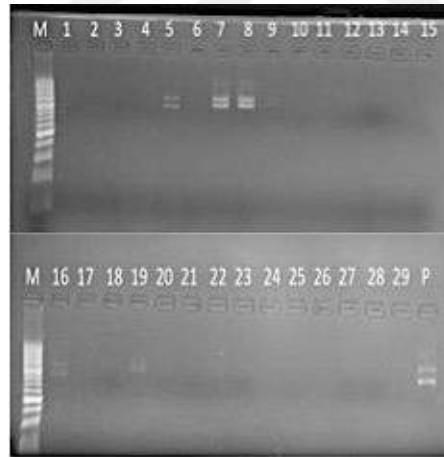


Şekil 4.5. İzole ve identifiye edilen *G. anatis* suşlarının PZR görüntüsü. (M=100bp marker; 8-19= pozitif; 20= pozitif kontrol; 21= negatif kontrol)

200 tavuktan alınan akciğer, trake, karaciğer, kalp ve dalak örneklerinden ekstrakte edilen DNA örnekleriyle yapılan PZR sonucunda 11 (%2,2) *G. anatis* tespit edildi, sonuçlar tablo 4.3 ve şekil 4.6'da verildi. *G. anatis* tespit edilen 5(%2,5) akciğer, 4(%2) trake ve 2(%1) karaciğer örneklerinin hepsinden aynı zamanda *G. anatis* izole ve identifiye edildi.

Tablo 4.3. Direk dokudan izole edilen DNA'lar ile yapılan PZR sonuçlarının organlara göre dağılımı

Kümes No	Akciğer	Dalak	Kalp	Karaciğer	Trake
6	2 (%1)	-	-	1(%0,5)	1(%0,5)
7	1 (%0,5)	-	-	-	1(%0,5)
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	1(%0,5)
14	-	-	-	1(%0,5)	1(%0,5)
23	2(%1)	-	-	-	-
24	1(%0,5)	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-
Toplam	5(%2,5)	-	-	2(%1)	4(%2)



Şekil 4.6. Organ örneklerinden izole edilen DNA'lar ile yapılan PZR sonucu. (M=100bp marker; 5 (trake), 7 (akciğer), 8 (akciğer), 9 (trake), 16 (trake) ve 19 (karaciğer), 29 =negatif kontrol; P =pozitif kontrol)

5. TARTIŞMA

G. anatis son yıllarda dünyanın birçok ülkesinde broyler ve yumurtacı tavuklarda salpingitis ve peritonitis tablolarından izole edilen ve yumurta veriminin düşmesine sebep olarak ekonomik kayıplara yol açan infeksiyöz bir ajandır (Bojesen ve ark., 2003; Elbestawy ve ark., 2018).

G. anatis birçok Avrupa, Afrika, Asya ülkelerinde görüldüğü gibi, Çin, Hindistan, Japonya ve Kuzey-Güney Amerika'da da bildirilmiştir (Singh et al., 2016). *G. anatis* infeksiyonu bugüne kadar ülkemizde bildirilmemiştir. İlk kez bu çalışma ile yumurtacı tavuklarda %10 oranında saptanmıştır. *G. anatis*'in bugüne kadar saptanmamasına, infeksiyonun tavuk kolerası başta olmak üzere birçok solunum sistemi infeksiyonuna benzer bulgular göstermesi ve bakterinin taksonomideki yerinin 2003 yılına kadar tam olarak belirlenmemiş olmasının neden olduğu düşünüldü.

Gallibacterium cinsine ait türler (*G. genomospecies* 1 ve 2) arasında heterojenite olduğu için fenotipik karakterizasyonunun zor ve zaman alıcı olduğu bildirilmiştir (Alispahic ve ark., 2011; El-Adawy ve ark., 2018; Sing, 2016). Bu çalışmada da solunum sistemi infeksiyon bulguları ile birlikte yumurta veriminde düşüş gözlenen yumurtacı tavuklardan alınan doku ve organlarda *G. anatis* varlığı araştırıldı ve teşhis için özellikle hemoliz ve karbonhidrat fermentasyonunu temel alan konvansiyonel (Christensen ve ark., 2003) ve 16S-23S rRNA sekansının tespitine dayanan moleküler yöntemler tercih edildi (Bojesen ve ark., 2007). Çalışmada incelenen 200 tavuktan alınan akciğer, dalak, kalp, karaciğer ve trake örneklerinden %10 oranında *G. anatis* izole ve identifiye edildi. İzolasyon oranı materyal bazında değerlendirildiğinde akciğerde %5, trakede ise %3,5 oranında özellikle solunum sistemi organlarında tespit edildi ve bu durumun diğer çalışmalarla uyum gösterdiği belirlendi (Bisgaard, 1977; Bojesen ve ark., 2003; Mushin ve ark., 1979). Bojesen ve ark. (2003), infekte sürülerde yapmış olduğu çalışmada trake ve kloakal sıvı örnekleri toplamış ve *G. anatis*'i yüksek oranda trakeden izole etmiştir. Elbestawy ve ark. (2018), ooforitis, trakeitis, salpingitis ve peritonitis tespit ettikleri yumurtacı tavuklardan aldıkları trake, ovaryum ve ovidukt sıvılarından 6 (%19,6) adet *G. anatis* izole ve identifiye etmiştir. Huangfu ve ark. (2012) Çin'de yaptıkları çalışmada trake, ovaryum ve ovidukt örnekleri toplamış ve 33 (%18,2) adet *G. anatis*

saptamışlardır. Meksika’da yapılan bir başka çalışmada ise yumurtacı kümeslerden toplanan 600 örneğin %30’unda trakeden, %30’unda ise yumurta foliküllerinden *G. anatis* izole ve identifiye edildiği bildirilmiştir (Chaveza ve ark., 2017). İran’da salpingitis bulgusu olan yumurtacı tavuklarda *G. anatis* tespit edilmiştir (Ataei ve ark., 2017). Meksika ve İran’da ülkemizde olduğu gibi ilk kez *G. anatis* bildirimi yapılmıştır (Ataei ve ark., 2017; Chaveza ve ark., 2017). Afyonkarahisar, Gaziantep ve Kütahya olmak üzere üç farklı ilde bulunan 31 adet kümesten yalnızca Afyonkarahisar’da 8 (%25,80) kümeste pozitiflik saptandı. Çalışmada izolasyonun Afyonkarahisar’daki örneklerden yapılmasında; diğer illere oranla yumurtacı tavuk popülasyonunun özellikle bu ilde yoğunlaşmasının ve ayrıca örnekleme özellikle bu ilden yapılmasının neden olabileceği düşünüldü (Yumbir, 2018).

Moleküler teşhis yöntemleri spesifik, duyarlı, güvenilir, hızlı ve kolay olmaları nedeniyle son yıllarda tanı ve tiplendirme amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Ataei ve ark., 2017; Bojesen ve ark., 2007) Bu çalışmada da izole ve identifiye edilen *G. anatis*’in doğrulanmasının yanı sıra izolasyonda negatif olarak belirlenen organ ve doku örneklerinin incelenmesi için birçok araştırmacı gibi (Bojesen ve ark., 2010; Bisgaard ve ark., 2009; Christensen ve ark., 2003) PZR tercih edildi. *G. anatis*’in moleküler doğrulanması için literatürde daha önce de kullanılmış ve *G. anatis*-spesifik olduğu bilinen 16S rRNA-23S rRNA primerleri kullanıldı (Bojesen ve ark., 2007). Bu primerler tanıda karışıklılığa sebep olan *Pasteurellaceae* ailesinde bulunan diğer türler ile ayırımında özellikle tercih edilmektedir (Christensen ve ark., 2003). Yapılan konvansiyonel PZR sonucunda 20 (%10) *G. anatis* izolatu 790bp ve 1080bp’de bant vererek doğrulanmış oldu. Direkt organ ve doku materyaline yapılan PZR sonucunda ise 11(%2,2) *G. anatis* spesifik bant elde edildi. *G. anatis* olduğu PZR ile tespit edilen 5 (%2,5) akciğer, 2 (%1) kalp ve 4 (%2) trake örneğinden aynı zamanda etkenin de izole edilmiş olması benzer çalışma yapan araştırmacıların sonuçları ile paralellik gösterdi (Ataei ve ark., 2017; Chavez ve ark., 2017; Elbestawy ve ark., 2018; Sorour ve ark., 2015).

Kümes sahiplerinden alınan bilgilere göre *G. anatis* izole ve identifiye edilen kümelerde havalandırma problemi yaşanması özellikle hayvanlar üzerinde ciddi stres faktörü olarak değerlendirildi. *G. anatis*’in solunum yollarının normal mikroflorasında bulunması, ancak hayvanların maruz kaldığı stres, bağışıklık sisteminin zayıflaması,

kümeslerdeki bakım ve beslenme şartlarının olumsuz yönde değişiklik göstermesi ile etkenin fırsatçı rolü üstlendiği ve hayvanlarda solunum sistemi infeksiyonlarının gelişmesine sebep olduğu açıklanmıştır (Bojesen ve ark., 2003). Bu da çalışmada da izolasyonların öncelikle akciğer (%5) ve trake (%7,5)'den yapılmış olması bu sonucu desteklemektedir.

G. anatis'in hayvanlarda hem primer hem de sekonder infeksiyon etkeni olabileceği, özellikle *G. anatis* infeksiyonlarına *E. coli*'nin eşlik ettiği ve özellikle salpingitis ve peritonitis tablolarında bu iki etkeni birbirinden ayırmanın kolay olmadığı ileri sürülmüştür (Bisgaard, 1977; Gerklach, 1977; Mirle ve ark., 1991). Bu çalışmada 200 adet tavuk örneğinde *G. anatis* izolasyonu sırasında 10 (%5) *E. coli* izole edildi. *E. coli*'ler daha önceki çalışmaları da destekleyecek şekilde 6(%60)'sı akciğer, 3(%30)'ü trakeden olmak üzere solunum sistemi organlarında tespit edildi (Carlson ve Whenham, 1968; Gross, 1961; Neubauer ve ark., 2009).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *G. anatis* yumurtacı tavuklarda hem konvansiyonel hem de moleküler teşhis yöntemleri kullanılarak saptandı.

1. Solunum sistemi problemi yaşayan kanatlı sürülerinde *G. anatis*'in yetiştiricilik açısından önemli bir problem olduğu,

2. *G. anatis*'in laboratuvar teşhisi yapılırken etkenin heterojenitesinden dolayı fenotipik identifikasyon metotlarının mutlaka moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiği,

3. *G. anatis* infeksiyonlarının işletmelerdeki yönetsel hatalar öncelikli olmak üzere birçok stres faktörüne bağlı olarak gelişmesi nedeni ile yatkınlık oluşturacak problemlerin ortadan kaldırılmasının gerekli olduğu,

4. Yumurtacı tavuklarda verim kayıpları oluştuğunda *G. anatis*'in de primer hastalık etkeni olabileceği konusunda hem kanatlı klinisyenleri hem de mikrobiyologların bilgilendirilmesinin uygun olacağı,

5. Türkiye'de *G. anatis* kaynaklı yaşanan kayıpların azaltılması ve tavukçuluk sektöründe verimliliğin artırılması için; diğer *Gallibacterium* türlerin de ortaya konulmasına, infeksiyonun farklı yaş ve yetiştirme tiplerinde de araştırılmasına, gelecekte yapılacak aşılar için etkenin özelliklerinin ortaya konulmasına ve halk sağlığı açısından da bulaşma kaynakların belirlenmesine yönelik ilave çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

Aarestrup FM (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, **96**, 271-281.

Addo PB, Mohan K (1985). Atypical *Pasteurella haemolytica* type A from poultry. *Avian Dis.*, **29**, 214-217.

Akan M (2015). Önemli kanatlı hastalıklarının kontrolü: temel ilkeler ve koruma kontrol. *Mektup Ankara*, **13**, 38-42 .

Alispahic M (2011). *Characterization of selected members of the genera Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter and Gallibacterium by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), with applications in clinical diagnostics.* MSc Thesis, Wien University, Viyana.

Alispahic M, Christensen H, Hess C, Razzazi-Fazeli E, Bisgaard M, Hess M (2011). Identification of *Gallibacterium* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry evaluated by multilocus sequence analysis. *Int J Med Microbiol.*, **301**, 513– 522.

Alispahic M, Christensen H, Hess C, Razzazi-Fazeli E, Bisgaard M, Hess M (2012). MALDI-TOF mass spectrometry confirms clonal lineages of *Gallibacterium anatis* between chicken flocks. *Vet Microbiol.*, **160**, 269–273.

Anonim (2017). Chicken egg (layer) industry. <http://www.poultryhub.org/production/industrystructure> (Erişim tarihi: 03.05.2017).

Anonim (2017). Egg drop syndrome (or EDS). <http://www.poultryhub.org/health/disease/types> (Erişim tarihi: 12.04.2017).

Ataei S, Bojesen AM, Amininajafi F, Ranjbar MM, Banani M, Afkhamnia M, Abtin A, Goodarzi H (2017). First report of *Gallibacterium* isolation from layer chickens in Iran. *Arch Razi Inst.*, **72**, 123-128.

Aubin GG, Haloun A, Treilhaus M, Reynaud A, Corvec S (2013). *Gallibacterium anatis* bacteremia in a human. *J Clin Microbiol.*, **51**, 3897-3899.

Aydın N (1984). Bölge tavukçuluğunu etkileyen hastalık sorunları ve alınması gereken hijyenik önlemler. *Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Derg.*, Özel sayı, 77-90.

Bager RJ, Kudirkiene E, da Piedade I, Seemann T, Nielsen TK, Pors SE, Mattsson AH, Boyce JD, Adler B, Bojesen AM (2014). In silico prediction of *Gallibacterium anatis* pan-immunogens. *Vet Res.*, **45**, 80.

Bager RJ, Nesta B, Pors S.E, Soriani M, Serino L, Boyce JD, Adler B, Bojesen AM (2013). The fimbrial protein *flfA* from *Gallibacterium anatis* is a virulence factor and vaccine candidate. *Infect Immun.*, **81**, 1964- 1973.

Bisgaard M (1977). Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis characterisation of 213 strains. *Avian Pathol.*, **6**, 285-292.

Bisgaard M, Korczak BM, Busse HJ, Kuhnert P, Bojesen AM (2009). Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **59**, 735-744.

Bojesen AM (2003). *Gallibacterium infection in chickens*. PhD Thesis. Department of Veterinary Microbiology the Royal Veterinary and Agricultural University, Danimarka.

Bojesen AM, Christensen JP, Nielsen OL, Olsen JE, Bisgaard M (2003). Detection of *Gallibacterium* spp. in chickens by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization. *J Clin Microbiol.*, **41**, 5167-5172.

Bojesen AM, Nielsen OL, Christensen JP, Bisgaard M (2004). *In vivo* studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathol.*, **33**, 145-152.

Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M (2003). Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathol.*, **32**, 503-510.

Bojesen AM, Shivaprasad HL (2006). Genetic diversity of *Gallibacterium* isolates from California turkey. *Avian Pathol.*, **36**, 227-230.

Bojesen AM, Torpdahl M, Christensen H, Olsen JE, Bisgaard M (2003). Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. *J. Clin Microbiol.*, **41**, 2737–2740.

Bojesen AM, Vazquez ME, Bager RJ, Ifrah D, Gonzalez C (2011). Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol.*, **148**, 105-110.

Bojesen AM, Vazquez ME, Robles F, Gonzalez C, Soriano EV, Olsen JE, Christensen H (2007). Specific identification of *Gallibacterium* by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. *Vet Microbiol.*, **123**, 262–268.

Carattoli A, Bertini A, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**, 219–228.

Carlson HC, Whenham GR (1968). Coliform bacteria in chicken broiler house dust and their possible relationship to coli-septicemia. *Avian Dis.*, **12**, 297-302.

Chang YF, Ma DP, Shi J, Chengappa MM (1993a). Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. *Infect Immun.*, **61**, 2089–2095.

Chang YF, Ma DP, Wang Y, Chin N, Chengappa MM, Shin SJ, Yoon HJ (1995). Sequence analysis of leukotoxin secretion determinants from a *Pasteurella haemolytica*-like organism. *DNA Seq.*, **5**, 291–297.

Chang YF, Shi J, Ma DP, Shin SJ, Lein DH (1993b). Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin-III gene cluster. *DNA Cell Biol.*, **12**, 351–362.

Chaveza RFO, Barrios RMM, Chaveza JFH, Mascarenoa JR, Escalantea JGAI, Yanesb MA (2017). First report of biovar 6 in birds immunized against *Gallibacterium anatis* in poultry farms located in Sonora, Mexico. *Veterinaria México*, **4**, 1-8.

Christensen H, Bisgaard M, Bojesen AM, Mutters R, Olsen JE (2003). Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of 31. additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **53**, 275-287.

Clauer PJ (2009). Why have my hens stopped laying? *Poultry Extension Specialist, Animal and Poultry Sciences*. <http://www.pubs.ext.vt.edu/content/> (Erişim tarihi: 29.04.2017).

Çetinkaya E, Ayhan K (2012). Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Fen Müh. Derg.*, **2**, 53-62.

El-Adawy H, Bocklisch H, Neubauer H, Hafez HM, Hotzel H (2018). Identification, differentiation and antibiotic susceptibility of *Gallibacterium* isolates from diseased poultry. *Irish Vet J.*, **71**, 1-10.

Özcengiz E, Özcengiz G (2012). Aşı araştırma ve geliştirme alanında yeni yaklaşımlar. *Toplum ve Hekim*, **27**, 41-52.

Gautier AL, Dubois D, Escande F, Avril JL, Trieu-Cuot P, Gaillot O (2005). Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. *J Clin Microbiol.*, **43**, 2307-2314.

Gerlach H (1977). Significance of *Pasteurella haemolytica* in poultry. *Prakt Tierartz.*, **58**, 324-328.

Gomez EG, Vaca S, Mendez AP, Caballero JI, Marquez VP, Tenorio VR, Abascal EN (2005). *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avian Pathol.*, **34**, 426-429.

Gross WB (1961). The development of “air sac disease”. *Avian Dis.*, **5**, 431-436.

Hatfaludi T, Al-Hasani K, Gong L, Boyce JD, Ford M, Wilkie IW, Quinsey N, Dunstone MA, Hoke DE, Adler B (2012). Screening of 71 *P. multocida* proteins for protective efficacy in a fowl cholera infection model and characterization of the protective antigen PlpE. *PLoS One.*, **7**, 1-11.

Huangfu H, Zhao J, Yang X, Chen L, Chang H, Wang X, Li Q, Yao H, Wang C. (2012). Development and preliminary application of a quantitative PCR assay for detecting gtxA-containing *Gallibacterium* species in chickens. *Avian Dis.*, **56**, 315-320.

Johnson TJ, Danzeisen JL, Trampel D, Nolan LK, Seemann T, Bager RJ, Bojesen AM (2013). Genome analysis and phylogenetic relatedness of *Gallibacterium anatis* strains from poultry. *PloS One*, **8**, 1-12.

Jones KH, Thornton JK, Zhang Y, Mauel MJ (2013). A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and *Pasteurella multocida* isolates from chickens in Mississippi. *Poult Sci.*, **92**, 3166–3171.

Kristensen BM, Frees D, Bojesen AM (2011). Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. *Vet Microbiol.*, **153**, 116-123.

Kristensen BM, Sinha S, Boyce JD, Bojesen AM, Mell JC, Redfieldb RJ (2012). Natural transformation of *Gallibacterium anatis*. *Appl Environ Microbiol.*, **78**, 4914-4922.

Kudirkiene E, Bager RJ, Johnson TJ, Bojesen AM (2014). Chaperone-usher fimbriae in a diverse selection of *Gallibacterium* genomes. <http://www.biomedcentral.com/> (Erişim tarihi: 12.12.2017).

Lawal JR, Ndahi JJ, Dauda J, Gazali YA, Gadzama JJ, Aliyu AU (2018). Survey of *Gallibacterium anatis* and its antimicrobial susceptibility pattern in village chickens (*gallus gallus domesticus*) in maiduguri, North-astern Nigeria. *Int J Vet Anim Med.*, **1**, 1-7.

Lucio MLS, Vaca S, Vazquez C, Zenteno E, Rea I, Perez-Marquez VM, Negrete-Abascal E (2012). Adhesion of *Gallibacterium anatis* to chicken oropharyngeal epithelial cells and the identification of putative fimbriae. *Advances in Microbiology.*, **2**, 505-510.

Matthes S, Hanschke J (1977). Experimental studies on bacteria transmission via chicken egg. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*, **90**, 200-203.

Mbuthia PG, Christensen H, Boye M, Peterson KMD, Bisgaard M, Nyaga PN, Olsen JE (2001). Specific detection of *Pasteurella multocida* in chickens with fowl cholera and in pig lung tissues using fluorescent rRNA in situ hybridization. *J Clin Microbiol.*, **39**, 2627–2633.

Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R (2005). The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev.*, **15**, 589-594.

Montes-Garcia J.F, Vaca S, Vazquez-Cruz C, Soriano-Vargas E, Aguilar-Romero F, Blackall P.J, Negrete-Abascal E (2015). Identification of a hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. *Curr Microbiol.*, **72**, 450–456

Mushin R, Weisman Y, Singer N (1979). *Pasteurella haemolytica* found in the respiratory tract of fowl. *Avian Dis.*, **24**, 162-168.

Neubauer C, Souza-Pilz MD, Bojesen AM, Bisgaard M, Hess M (2009). Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. *Avian Pathol.*, **38**, 1-7.

Paudel S, Alispahic M, Liebhart D, Hess M, Hess C (2013). Assessing pathogenicity of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model: the respiratory

and reproductive tracts of chickens are targets for bacterial colonization. *Avian Pathol.*, DOI: 10.1080/03079457.2013.843160.

Paudel S, Liebhart D, Aurich C, Hess M, Hess (2014). Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 2. Epididymitis and decreased semen quality are the predominant effects in specific pathogen free cockerels. *Avian Pathol.*, **43**, 529–534.

Paudel S, Liebhart D, Hess M, Hess C (2014). Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 1. Folliculitis and drop in egg production are the predominant effects in specific pathogen free layers. *Avian Pathol.*, **43**, 443–449.

Pedersen IJ, Pors SE, Bager Skjerning RJ, Nielsen SS, Bojesen AM (2015). Immunogenic and protective efficacy of recombinant protein GtxA-N against *Gallibacterium anatis* challenge in chickens. *Avian Pathol.*, **44**, 386-391.

Persson G, Bojesen AM (2015). Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Veterinary Research.*, DOI: 10.1186/s13567-015-0206-z.

Piechulla K, Bisgaard M, Gerlach H, Mannheim W (1985). Taxonomy of some recently described avian *Pasteurella actinobacillus* like organisms as indicated by deoxyribonucleic acid relatedness. *Avian Pathol.*, **14**, 281-311.

Ramirez-Apolinar S, Guerra-Infante FM, Haro-Cruz M, Salgado-Miranda C, Madrid-Morales E, Kristensen BM, Bojesen AM, Negrete-Abascal E, Soriano-Vargas E (2012). Characterization of a *Gallibacterium* genomospecies 2 hemagglutinin. *J. Anim. Vet. Adv.*, **11**, 556–560.

Rappuoli R (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine.*, **19**, 2688-2691.

Rzewuska M, Karpinska E, Szeleszczuk P, Binek M (2007). Isolation of *Gallibacterium* spp. from peacocks with respiratory tract infections. *Medycyna Wet.*, **63**, 1431-1433.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Serpen A (2015). *Yumurtanın bilinmeyen sırrı ve gerçekleri*. <http://www.gencdiyetisyenler.com/wpcontent/uploads>. (Erişim tarihi: 12.04.2017).

Sing SV (2016). *Studies on Growth Kinetics of Gallibacterium anatis in Presence of Deuterium Oxide (D2O, Heavy Water)*. Thesis of Master Degree. Submitted to the Deemed University Icar-Indian Veterinary Research Institute Izatnagar, India.

Singh S.V, Singh B.R, Sinha D.K, Vinodh K, Prasanna V.A, BhardwajM, Dubey S (2016). *Gallibacterium anatis*: An emerging pathogen of poultry birds and domiciled birds. *J Veterinar Sci Techno.*, **7**, 1-7.

Sorour HK, Al Atfeehy NM, Shalaby AG (2015). *Gallibacterium anatis* infection in chickens and ducks. *Assiut Vet. Med. J.*, **61**, 147.

Spitzer H (2015). An analysis of bacterial contamination of chicken eggs and antimicrobial resistance. <http://digitalcommons.csbsju.edu> (Erişim tarihi: 28.04.2017).

Srinivasan P, Balasubramaniam GA, Murthy TRGK, Balachandran P (2013). Bacteriological and pathological studies off egg peritonitis in commercial layer chicken in Namakkal area. *Asian Pac J Trop Biomed.*, **3**, 988-994.

Stepien-Pysniak D, Kosikowska U, Hauschild T, Burzynski A, Wilczynski J, Kolinska A, Nowaczek A, Marek A (2018). A loop-mediated isothermal amplification procedure targeting the *sodA* gene for rapid and specific identification of *Gallibacterium anatis*. *Poult Sci.*, **97**, 1141-1147.

Sungur H, Çöven F (2009). *Kanatlı işletmelerinde biyogüvenlik ve hastalıklardan korunma*. Yumbir http://www.yum-bir.org/UserFiles/File/Biyogüvenlik_Kitap.pdf. (Erişim tarihi: 6.04.2017).

TÜİK (2018). Hayvancılık istatistikleri. <http://biruni.tuik.gov.tr/medas/kn> (Erişim tarihi: 6.11.2018).

Vaca S, Monroy E, Rojas L, Vazquez C, Sanchez P, Soriano-Vargas E, Bojesen AM, Negrete Abascal E (2011). Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surfaces. *J. Anim. Vet. Adv.*, **10**, 1688-1693.

Wang C, Robles F, Ramirez S, Riber AB, Bojesen AM (2016). Culture-independent identification and quantification of *Gallibacterium anatis* (*G. anatis*) by real-time quantitative PCR. *Avian Pathol.*, **45**, 538-544.

Yılmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktaş H (2014). Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları. *TAF Prev Med Bull.*, **13**, 421-426.

Yum-bir (2017). 2017 sektör verileri. <http://www.yumbir.org/userfiles/file/yumurta-veriler2017> (Erişim tarihi: 6.11.2018).

Zepeda A, Ramírez S, Vega V, Morales V, Talavera M, Salgado-Miranda C, Simon-Martinez J, Bojesen AM, Soriano-Vargas E (2009). Hemagglutinating activity of *Gallibacterium* strains. *Avian Dis.*, **53**, 115-118

Zhang XP, Guo ZD, Chen L, Zhao J, Wang XW, Chang HT, Liu HY, Yao HX, Wang CQ (2014). Influence of different culture conditions on the formation of *Gallibacterium anatis* biofilm. *China J Vet Sci.*, **34**, 1083-1088.

Zhang XP, Lu CJ, Li YT, Yang X, Wang XW, Chang HT, Liu HY, Chen L, Zhao J, Wang CQ, Chang YF (2017). *In vitro* adherence and invasion of primary chicken oviduct epithelial cells by *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol.*, **203**, 136-142.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Sibel YAMAN

Doğum Yeri ve Yılı : RİZE-1992

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Uyruğu : T.C.

Telefon No : 05349379939

Elektronik Posta : sibelcomm@hotmail.com

İletişim Adresi : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, 15030, Burdur-
Türkiye



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise: Rize Anadolu Öğretmen Lisesi, 2010, Rize

Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimlik Bölümü, 2016

Yüksek Lisans:

Yayınları (SCI ve diğer makaleler):

1. Yaman S, Şahan Yapıcıer Ö (2017): Yumurta verimini etkileyen bakteriyel ve viral Hastalıklar, *Mektup Ankara*,15(4): 3-10.

2. Şahan Yapıcıer Ö, Saatçi M, Yaman S, Sav O (2018): Effects of energized oxygen in drinking water to laying hens feces microorganism count, International Poultry Science of WPSA Turkish Branch, 9-12 May, Niğde, 275-280.

3. Yaman S, Şahan Yapıcıer Ö (2018): Diagnosis of *Gallibacterium anatis* from layer chickens in Turkey, 2nd International Congress of Veterinary Microbiology (XIII. National Congress of Veterinary Microbiology), 16-19 October, Antalya, 173.

