

T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

131787

**SİĞİR AKCİĞERLERİNDEN BAKTERİ
İZOLASYONLARI VE İZOLE
PASTÖRELLA'LARIN POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE
SAPTANMASI**

131787

DOKTORA TEZİ

**AYŞE KILIÇ
ELAZIĞ- 2003**

ONAY SAYFASI
Prof. Dr. Halil OÇAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Adile MUZ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adile MUZ

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üveleri

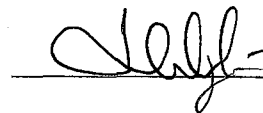
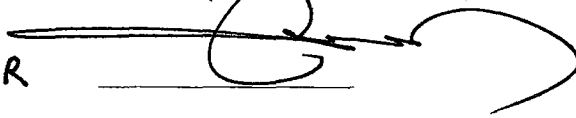
Prof. Dr. Adile MUZ

Prof. Dr. K. Serdar DİKER

Prof. Dr. Yusuf BOLAT

Doç. Dr. H. Basri GÜLCÜ

Doç. Dr. Burhan ÇETİNKAYA



TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun seçiminde ve tüm aşamalarında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam sayın Prof. Dr. Adile MUZ'a saygı ve şükranlarımı sunarım. Bununla birlikte, özellikle moleküler biyoloji çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve bana destek olan hocalarım sayın Doç. Dr. Burhan Çetinkaya ve sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan Basri Ertaş'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca çeşitli konularda yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalındaki Araştırma Görevlileri Dr. Hasan Öngör, Arş.Gör.Murat Karahan, Arş.Gör.Gökben Özbey ve Arş.Gör.M.Nuri Açık'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmam boyunca bana manen destek olan eşim ve çocuklarım ile tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmaya TÜBİTAK (VHAG 1601 no'lu projeye)'m verdiği destekten ötürü teşekkür ederim. Ayrıca, Vet. Fak. Dekanı sayın Prof. Dr. Nazir Dumanlı'ya, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü sayın Prof. Dr. Halis Öcal'a ve katkılarından dolayı FÜNAF'a teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
4.1. Numunelerin Toplanması.....	31
4.2. Referans Suşlar.....	31
4.3. Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	31
4.3.1. İzolasyon Besiyerleri.....	32
4.3.1.1. Blood Agar Base.....	32
4.3.2. İdentifikasyon Besi Yerleri.....	32
4.3.2.1. Mac Conkey Agar.....	32
4.3.2.2. Eosin Methylen Blue Agar.....	32
4.3.2.3. Oksidasyon-Fermentasyon Besiyeri.....	33
4.3.2.4. İndol Test Ortamı.....	33
4.3.2.5. Nitrat Test Ortamı.....	33
4.3.2.6. MR/VP(Clark-Lubs) Besiyeri.....	34
4.3.2.7. Ayıraçlar.....	34
4.3.2.7.1. İndol Ayıracı.....	34
4.3.2.7.2. Kovacs Ayıracı.....	34
4.3.2.7.3. Metil Kırmızısı Ayıracı.....	34
4.3.2.7.4. Nitrat Ayıraçları.....	34
4.3.2.8. Solüsyonlar.....	35
4.3.2.8.1. Karbonhidrat Solüsyonları.....	35
4.4. Biyokimyasal Özelliklerin İncelenmesi.....	35
4.4.1. Oksidaz Testi.....	35
4.4.2. Katalaz testi.....	35
4.4.3. İndol Testi.....	35
4.4.4. TSİ (Tri Sugar Iron) Besiyerinde H ₂ S.....	36

4.4.5. Metil-Kırmızısı Testi.....	36
4.4.6. Voges-Proskauer Testi.....	36
4.4.7. Nitrat Testi.....	36
4.4.8. Üreaz Testi.....	36
4.4.9. Glukoza Etki.....	37
4.4.10. Mac Conkey Agarda Üreme.....	37
4.4.11. Oksidasyon-Fermentasyon Testi.....	37
4.5. Kapsül Boyama.....	38
4.6. Deneme Hayvanları.....	38
4.7. Fare İnokülasyon Testi.....	38
4.8. DNA İzolasyonu.....	39
4.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	40
4.10. Elektroforez.....	41
4.11. İstatistiksel Analiz.....	42
5. BULGULAR.....	44
5.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	44
5.2. PZR Bulguları.....	47
5.3. Fare İnokülasyon Test Bulguları.....	49
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
7. KAYNAKLAR.....	59
8. ÖZGEÇMİŞ.....	73

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Sığır Akciğerlerinden Tek veya Miks Enfeksiyon Halinde İzole Edilen Mikroorganizmalar.....	45
Tablo 2. İzole Edilen <i>P. multocida</i> ve <i>M. haemolytica</i> Suşlarının Biyokimyasal Özellikleri.....	46
Tablo 3. <i>Pasteurella</i> 'ların PZR ile İdentifikasyonunda Kullanılan Primerler.....	43



ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** *P. haemolytica* serotip 1'in sığırlardaki epidemiyolojisi ve patogenezi
.....30
- Şekil 2.** Pnömonili sığır akciğerlerinden izole edilen *P. multocida* ve *M. haemolytica*'dan elde edilen DNA'ların PZR'de analizi sonucu oluşan sırasıyla, 221bp ve 327bp uzunluğundaki bantları gösteren ethidium bromide ile boyanmış %1,5'lük bir agaroz jeldeki görünümü.....48

1.ÖZET

Bu çalışmada Elazığ mezbahasında kesilen toplam 8222 sığır akciğeri makroskopik olarak incelendi ve bu akciğerlerin 500 (%6.1)'inde pnömoni saptandı. Bu akciğer örneklerinden kültür yöntemi ile bakteriyel etkenler izole ve identifiye edildi ve bu etkenlerin içerisinde *Pasteurella*'ların DNA'sı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırıldı. Ayrıca şüpheli *Pasteurella multocida* suşlarına fare inokulasyon testi de yapıldı. 500 akciğer örneğinin %7 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agarda 24-48 saatlik kültürü sonucunda, 36 (%7.2) *Staphylococcus aureus*, 30 (%6) *Pasteurella multocida*, 30 (%6) *Corynebacterium spp*, 29 (%5.8) *Maya*, 19 (%3.8) *Streptococcus spp*, 18 (%3.6) *Staphylococcus epidermidis*, 13 (%2.6) *Escherichia coli*, 11 (%2.2) *Bacillus spp*, 10 (%2) *Pseudomonas spp*, 9 (%1.8) *Mannheimia haemolytica*, 8 (%1.6) *Actinobacillus spp*, 6 (%1.2) *Klebsiella spp*, 1 (%0.2) *Moraxella spp*, 1 (%0.2) *Proteus spp* ve 90 (%18) miks olmak üzere toplam 311 (%62.2) bakteri izole ve identifiye edildi ve 189 (%37.8) örnekte herhangi bir bakteriyel etken üremedi.

Pasteurella multocida suşlarının 24(%80)'ünde fare inokulasyon testi ile pozitif sonuç alındı. Kültür ile pozitif *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşlarının tümünün PZR ile de pozitif olduğu bulundu. Bununla birlikte, *toxA* geninin sekansından hazırlanan primerlerin kullanılması ile yapılan PZR ile toksijenik *P. multocida* suşlarının varlığı araştırıldı. Bütün örneklerin toksijenik *P. multocida* suşları yönünden negatif olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışma, *Pasteurella*'ların bakteriyolojik yöntemler yanısıra son yıllarda geliştirilmiş önemli moleküler biyoloji metotlarından biri

olan ve kültürden daha sensitif, spesifik ve çabuk olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile identifiye edilebileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Pnömoni, Sığır, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).



2.ABSTRACT

In this study, lungs of 8222 cattle slaughtered at an abattoir in Elaziğ were examined macroscopically and pneumonia was detected, in 500(6.1%) lungs. These samples were inoculated on to blood agar supplemented with 7% sheep blood for isolation of bacterial agents. A Polymerase Chain Reaction (PCR) based upon the use of species-specific primers was carried out on DNA samples extracted from *Pasteurella spp.* suspicious isolates. In addition, mouse inoculation test was carried out on *Pasteurella multocida* suspected isolates. A total of 311 (62.2 %) bacterial agents were isolated from the lung samples and were identified as 7.2 % *Staphylococcus aureus*, 6 % *Pasteurella multocida*, 6 % *Corynebacterium spp.*, 5.8 % *Yeast*, 3.8 % *Streptococcus spp.*, 3.6 % *Staphylococcus epidermidis*, 2.6 % *Escherichia coli*, 2.2 % *Bacillus spp.*, 2 % *Pseudomonas spp.*, 1.8 % *Mannheimia haemolytica*, 1.6 % *Actinobacillus spp.*, 1.2 % *Klebsiella spp.*, 0.2 % *Moraxella spp.*, 0.2 % *Proteus spp.* and 18 % mix bacteria in cattle.

Twenty four (80 %) of *Pasteurella multocida* isolates were positive in the mouse inoculation test in cattle. All *P. multocida* and *M. haemolytica* strains that were positive by culture were also found to be positive by the PCR. However, toxigenic *Pasteurella multocida* were not detected in any isolates by PCR using primers derived from *toxA* gene.

In conclusion, this study showed that PCR which is reported to be more sensitive and specific than culture may be used in the identification of *Pasteurella spp.* as an alternative to conventional tests

Key Words: Pneumonia, Cattle, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, Polymerase Chain Reaction (PCR).



3.GİRİŞ

Dünyada ve Türkiye’de, nüfus artışına paralel olarak artan hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında sığır eti ve ürünleri ilk sırayı almaktadır. İnsan beslenmesindeki yeri ve önemi tartışmasız olan kırmızı etin en ekonomik olarak elde edildiği hayvan ise "besi danası" olarak adlandırılan, 6-24 aylık genç sığırlardır. Tüm Dünyada ve Türkiye’de sığır besiciliği gerek kapalı ve gerekse açık ortamlarda yaygın olarak yapılmaktadır (166).

Sığırların solunum yolu hastalıklarında önemli bir yere sahip olan Pnömonik Pastörelloz, nadiren *Pasteurella multocida* (*P.multocida*) çoğunlukla *Pasteurella haemolytica* (*P.haemolytica*) ile ilişkili olup, bronkopnömoni, toksemi, eksudatif pnömoni ile karakterizedir (173). Sığır pnömonik pastörellozu ilk kez 1915’de Amerika’da ve 1925’de İngiltere’de tanımlanmıştır (74). Pnömonilere bağlı ekonomik kayıplar, gelişmiş ülkelerde de büyük sorunlardan birini oluşturmaktadır. Sığırların solunum sistemi hastalıklarının, et ve süt sığırcılığında, özellikle Amerika, Kanada, İngiltere ve Avrupa başta olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde halen büyük kayıplara neden olduğu bilinmektedir (66, 173). Pnömonik pastörelloz’un Kuzey Amerika’da sığır endüstrisini yılda en az 640 milyon doların üzerinde bir kayba uğrattığı (26, 86) ve kayıpların stres faktörlerinin ve/veya viruslar ve bakterilerin etkisi ile daha da arttığı ortaya konmuştur (56, 169). Yine A.B.D.’de pnömonik pastörelloz yüzünden ekonomik kayıplar sığırların diğer bütün hastalıklarının sebep olduğu toplam kayıplardan daha yüksektir (86). Oluşan kayıplar ölüm, tedavi masrafı ve hastalığa maruz kalan hayvanların ileriki dönemlerde düşük performansına neden olmaktadır.

Enfeksiyon yetersiz beslenmeye bağlı olarak Mart ve Eylöl aylarında artış göstermektedir (96).

Hastalığın ortaya çıkışında taşıma, süten kesme, kalabalık, yetersiz beslenme ve ani iklim değişiklikleri gibi stres faktörleri ile birden fazla mikroorganizma [viruslar (İnfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR), Bovine Viral Diarrhea virus (BVD), Parainfluenza-3 (PI-3), Respiratory Syncytial virus (RSV), mantar, çeşitli bakteriler (*Pasteurella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.*, *Mycoplasma spp.* vb.] ve parazit türleri rol oynadığından etiyolojik olarak kompleks bir yapıya sahip olduğu kabul edilmektedir (49, 68, 77, 116, 132, 173).

Deneysel olarak, viruslar ve *Pasteurella* türleri birlikte veya virus olmaksızın *Pasteurella* türleri özellikle *P. haemolytica* ile birçok yoldan pnömonik pastörellozun oluşturulmasına ve doğal olarak hasta hayvanların pnömonili akciğerlerinden yaygın olarak *Pasteurella* türlerinin izole edilmesine (89, 112) rağmen, hastalığın oluşmasında konakçı, çevre ve patojenlerin ne derecede etkili oldukları henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir (68).

Pasteurella grubu mikroorganizmalar evcil ve yabani hayvanlarda üst solunum ve sindirim sisteminin bir fırsatçı patojenidirler (109). *Pasteurella*'lar İnsanlarda (72) ve hayvanlarda (139) primer ya da sekonder etiyolojik etkendirler.

Pastörelloz'e neden olan mikroorganizmalar adlarını Louis Pasteur'den almışlardır (12, 23, 144). *Pasteurella* cinsi içinde ilk tespit edilen tür *P. multocida* olup, etkeni ilk olarak 1883 yılında Burril ve ark. "Kolera" hastalığına yakalanmış kümes hayvanlarının kanından izole etmişler ve *Micrococcus gallicidus* olarak isimlendirmişlerdir. Daha sonra bu etkene Trevisan (1887) *Pasteurella cholerae-*

gallinarum, Lehmann ve Neumann (1899) *Bacterium multocidum* ve Rosenbusch ve Marchant (1939) *Pasteurella multocida* adını vermişlerdir (28, 104, 145, 163).

Shipping fever'a sebep olan etken 1885'de Theodore Kitt tarafından *Bacterium bipolare multocidum* olarak isimlendirilmiştir. 1896'da Flugge *Bacillus bovisseptica*'yı yeniden isimlendirerek hemorajik septiseminin nedeni olarak bilinen (*P.multocida*)'yı ya da sığır fibrinöz pnömonisinin nedeni olarak bilinen (*Pasteurella bovisseptica*)'yı tekrar ayrı gruplar içerisine ayırmıştır (86).

Jones (1921) *Pasteurella* grubuna ait olan fakat hemolitik aktivitesi farklı olan bir mikroorganizmayı tanımlamıştır (93). Newson ve Cross (1932) bu mikroorganizmayı *P.haemolytica* olarak isimlendirmişlerdir (125). *P. haemolytica*'nın tekrar klasifikasyonu sorusu 1960'lı yıllarda artmıştır. Mraz (1969) *P.haemolytica*'nın *Actinobacillus haemolyticus* olarak tekrar isimlendirilmesi gerektiğini teklif etmiştir (121). Sneath ve Johnson (1973) *Haemophilus*, *Actinobacillus* ve *Pasteurella* suşlarının numerikal taksonomik çalışmasında *Pasteurella* ile *Actinobacillus* suşları arasında %75'lik bir benzerlik indeksi saptamışlardır (152). DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına dayanılarak 1985'de *P. haemolytica* *Pasteurella* cinsinden hariç tutulmuştur (122). Mutters ve ark. 1985'de DNA benzerliği (homolog)'ne dayalı geniş bir çalışma yaparak *P.multocida*'yı 3 alt tür adı altında (*P.multocida subsp.multocida*, *P.multocida subsp.septica* ve *P.multocida subsp.gallicida*) sınıflandırmıştır (123). Angen ve ark. (1999) fenotipik ve genotipik karakterlerinin geniş nicel değerlendirmesine dayanarak trehaloz negatif *P. haemolytica* kompleksini tekrar sınıflandırarak *Pasteurellacea* familyasında en az beş türü içeren yeni bir cins *Mannheimia*'yı teklif etmişlerdir (9, 10).

Pasteurella cinsi içinde, *P. multocida* dünyada yaygın dağılımı ile önemli bir hayvan ve fırsatçı insan patojenidir (91). *P. multocida* birçok hayvan türlerinin nazofarinksinde kommensal olarak bulunan Gram negatif basil (kokobasil) şeklinde bir mikroorganizmadır. Genelde, *P. multocida* hayvan patojeni olarak sekonder enfeksiyonlarda önemli rol oynar (101). *P. multocida*'nın memeliler, kuşlar ve insanların başlıca solunum sistemlerini içine alan geniş bir konakçıya sahip olduğu bildirilmiştir (22). *P. multocida*, sığırlarda ve buffalo'da hemorajik septisemiye, domuzlarda atrofik rhinitis ve pnömoniye, kümes hayvanlarında tavuk kolerasına, koyunlarda nadir de olsa pnömoniye, laboratuvar hayvanlarında çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır (90, 99). İnsanlarda *P. multocida*'nın sebep olduğu hastalıkların nadir olmadığı belirtilmiş ve *P. multocida*'nın zoonotik bir organizma olduğu düşünülmüştür (22,101).

Epidemiyolojik amaçlı çalışmalarda, *P. multocida*'nın farklı alttür isimleri ile ayrımı yapılmıştır. *P. multocida subsp. multocida*, dulcitol negatif, sorbitol pozitif izolatları içine alır, *P. multocida subsp. septica*, dulcitol-negatif, sorbitol negatif izolatları, *P. multocida subsp. gallicida* ise dulcitol pozitif izolatları içine alır. Bir kısım araştırmacılar ise çeşitli *Pastörella* türlerini, özellikle patojenitesindeki farklılıklara göre ekolojik olarak farklı bölümlere ayırmışlardır (73).

Mannheimia (M.) haemolytica suşları çoğunlukla sağlıklı hayvanların nazofarenksinin mukoz membranlarında yaşamalarına rağmen (60,76) koyunlarda ve keçilerde pnömoni, septisemi ve mastitisin ve sığırlarda pnömoninin gelişmesinde önemli bir etiyolojik faktör olarak kabul edilmektedir (8,68). *M. haemolytica*'nın bazen insan enfeksiyonları ile ilişkili olduğu ve sığırların

pnömonik pastörelloz (Shipping fever)'un başlıca sebebi olduğu belirtilmiştir (86).

Pnömonilerin ortaya çıkışında en önemli etiyolojik grubu enfeksiyöz etkenler oluşturmaktadır. Sığır pnömonilerinin etiyolojilerini açıklığa kavuşturmak amacıyla eskiden beri pek çok araştırma yapılagelmiştir. Araştırmaların ortak noktası, sığır yetiştiriciliğinde en önemli problem ve ekonomik kayıp sebebi olan pnömonilerin kompleks bir etiyolojiye sahip olduğu ve ayrıca predispoze stres faktörlerinin rol oynadığıdır. Dawson ve ark.(1966), 20 buzağı üzerinde yaptıkları virolojik ve bakteriyolojik yoklamalarda virus izolasyonu yapamamakla birlikte serolojik olarak PI-3 virusunun varlığını göstermiş ve ayrıca mikoplazma ve *Pastörella* türlerini birlikte izole etmişlerdir (51).

Pnömonilerin etiyolojilerine yönelik olarak yapılan çalışmalarda virusların ve bakterilerin ayrı ayrı veya birbirleriyle sinerjik olarak değişik tipte pnömonilere neden olabilecekleri bildirilmiştir (29, 81, 84, 146, 147, 149). İlk defa 1970 yılında İsviçre'de Paccaud ve Jacquier tarafından izole edildiği bildirilen Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV)'un da sığır pnömonilerinde önemli bir etiyolojik sebep olduğu defalarca gösterilmiştir (32, 40, 57, 148). Macaristan'da *M.haemolytica* serotip A1 ve A2, *P.multocida* serotip A ve *H.somnus* ile birlikte IBR ve PI-3 virusu sığır pnömonik pastörellozisine sebep olan en yaygın patojenlerdir (64).

Sığır pnömonilerinin kompleks etiyolojilerinin önemli bir parçası da Mikoplazmalardır. İngiltere'de pnömoniden ölen buzağı sayısının yıllık ortalama %9.7'den %36.5'e yükselmesi üzerine yapılan bir çalışmada, pnömonili

akciğerlerden izole edilen *Mycoplasma bovis* oranının arttığı bildirilmiştir (80).

Pnömonilerin ortaya çıkışında primer faktörlerin yanı sıra hazırlayıcı faktörlerin de rolü büyüktür. Bunların başlıcaları; dehidrasyon, uzun süren açlıklar, viral enfeksiyonlar, toksik gazların ve partiküllerin inhalasyonu, bazı anestezipler, üremi ve asidozis gibi metabolik bozukluklar ve kortikosteroidler gibi immunosupresantlar nedeniyle mukosilyer temizleme mekanizmasının ve alveoler makrofajların fonksiyonunun zarar görmesi de predispozan faktörlerdendir. Konjenital veya sonradan şekillenmiş immun yetmezlik durumları ve hayvanların değişik bölgelerden toplanmış olmaları nedeniyle, yeni ortamdaki etkili mikroorganizmalara karşı gelişmiş bir spesifik immunitelerinin olmaması hastalık riskini artırır (4, 55, 111, 134, 149, 168). Pnömonilerin çıkışında ayrıca bakım-besleme koşulları, barınakların dizaynı, hayvanların sıklığı, transport, iklim koşulları ve mevsimler gibi daha pek çok faktörler de etkilidir (25, 42, 113).

Pnömonilerin yapıcı sebepleri arasında mantarlar da yer alır. Pnömomikozların meydana gelmesinde temel etkenler kadar hayvanların rutubetli, loş, havasız ve tozlu ahırlarda barındırılması, küflü yemlerin verilmesi ve uzun süreli antibiyotik uygulamaları da mantarların üremelerine ortam hazırlayarak etkili olmaktadır (5, 172).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1984 baskısında *P. multocida* ve *M. haemolytica* fakültatif anerobik Gram negatif çomaklar grubundaki *Pasteurellaceae* familyasının *Pasteurella* cinsi içinde yer almaktadır (30).

Pasteurellaceae familyasındaki bakteriler Gram negatif, fakültatif anaerobik veya mikroaerofilik, kemoorganotrofik, hareketsiz, sporsuz, katalaz, fosfataz ve bazı türler hariç oksidaz reaksiyonları pozitif, küresel, ovoid veya çomak şeklinde mikroorganizmalardır (36,136). *Pasteurellaceae* familyasındaki bakteriler Nitratları nitritlere indirgerler. Metil Red (MR) ve Voges Proskauer (VP) negatiftir. Lysine ve arjinin decarboxylase negatiftir. Glukoz ve diğer fermente edilebilir bileşikleri asit oluşturarak fermente ederler, fakat genellikle gaz oluşturmazlar (135).

Pasteurella cinsi mikroorganizmalar, familya içerisindeki *Haemophilus* ve *Actinobacillus* cinsleri ve *Enterobacteriaceae* familyasındaki *Yersinia* (*Lonepinella*) cinsi ile karıştırılabilmektedir (31). Birkaç özellik *Pasteurella*'yı *Lonepinella* ve *Haemophilus*'tan ayırt edebilmektedir. *Lonepinella* cinsindeki türler 22°C'de hareketli olmaları, oksidaz reaksiyonlarının negatif olmaları ve %4,5 NaCl içeren ortamlarda üremeleri ile *Pasteurella* ve *Actinobacillus* cinslerinden kolayca ayrılabilirler (16). *Haemophilus*'ların çoğu ise üremelerinde X ve V faktörüne ihtiyaç duyarken, *Pasteurella* ve *Actinobacillus* cinsi bakteriler bu faktörlere ihtiyaç duymaz (98) ve *Actinobacillus* cinsi *M. haemolytica* ve *Pasteurella aerogenes* dışındaki *Pasteurella* cinsindeki türlerden özellikle dokulardan ilk izolasyonlarında oluşturdukları mukoid koloni yapıları ve MacConkey agarda üreme özelliği ile ayrılırlar (133). Ancak *Pasteurella* cinsindeki *M. haemolytica* ve *P. aerogenes* türleri de MacConkey agarda ürerler. *Actinobacillus* türlerinin çoğu hemoliz özelliği göstermesi ve üreaz pozitif olması ile *M. haemolytica*'dan, indol reaksiyonlarının negatif olması ile de *P. aerogenes*'den ayrılırlar. *Mannheimia* D-mannozdan asit üretmemesi ile

Pasteurella cinsinden, üreaz negatif olması ile *Actinobacillus* cinsinden ve VP negatif olması ile *Lonepinella* cinsinden ayrılabilir (9).

P. multocida 0,2-0,4 µm çapında ve 0,6-2,5 µm uzunluğunda, hareketsiz, sporsuz, pleomorfik, infekte dokulardan yapılan preparatlarda tipik bipolar tarzda boyanan, Gram negatif 35-37°C'de en iyi gelişen fakültatif anaerobik bir mikroorganizmadır (124, 126, 142).

M. haemolytica 2.5 X 0.5 mikron boyutlarında pleomorfik sporsuz, hareketsiz, Gram negatif bir mikroorganizmadır. *Mannheimia*'nın bütün suşları mannitol, glukoz, maltoz, sorbitol ve sukrozu gaz oluşturmaksızın fermente ederler. *M. haemolytica*'da indol, üreaz, MR ve VP reaksiyonları negatiftir. Katalaz (hemen hemen daima) ve oksidaz pozitiftir. Trehalozu fermente etmezler ve fakat L-arabinozu fermente ederler (151).

P. multocida yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar, güneş ışığı, kuruma veya ısı ile kolayca inaktive edilen oldukça hassas bir mikroorganizmadır ve denemeler etkenin çevrede (su veya toprakta) maksimum 30 gün boyunca canlı kaldığını göstermiştir (37, 144).

Pasteurella'lar kanlı agarda iyi ürerler ve kanlı agar klinik örneklerden *Pasteurella*'ların izolasyonunda rutin olarak kullanılır. Diğer mikroorganizmalar ile kontamine materyallerden *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın izolasyonu için selektif besiyerleri gerekmektedir (119). *P. multocida* 35-37°C'de, kanlı agar veya dekstroz nişasta agarda, 18-24 saat inkubasyondan sonra 1-3 mm çapında, genellikle mukoid (M) veya smooth (S) koloniler oluşturur. M koloni formu düzenli, yuvarlak, konveks yapıda görülebildiği gibi daha büyük, geniş, nemli ve yapışkan olarak da bulunabilmektedir (126). M koloni formundaki *P. multocida*

suşlarının hepsi kapsüllüdürler ve sığır, insan, koyun, tavşan ve domuzların solunum yolu enfeksiyonlarından izole edilirler. Rough (R) koloni formu nadiren görülmektedir. Bu suşlar kapsülsüzdür. S koloni formundaki *P. multocida* suşları katı besiyerlerinde yuvarlak, düzgün ve küçük parlak koloniler oluştururlar (12). *P. multocida*'lar kapsül bulundurabildikleri gibi kapsülsüz olanları da vardır. Kapsüllü suşlar akut olaylardan izole edilirler. Taze olarak izole edilen suşlar kapsüllüdür (12, 126).

M. haemolytica kanlı agarda sadece merkezde az kalınlaşan küçük, yuvarlak, nemli ve parlak koloniler oluşturur (151, 158). *M. haemolytica* katı besiyerlerinde Smooth (S) veya Rough (R) koloni formu oluştururlar. İçinde %7 oranında at, sığır veya koyun kanı bulunan kanlı agarda oluşturduğu dar beta hemoliz zonu *M. haemolytica*'yı diğer *Pasteurella* türlerinden ayıran en önemli özelliklerden birisidir (137, 151, 158). *M. haemolytica* 25-40°C'de üreyebilse de optimum üreme ısısı 37°C'dir. *M. haemolytica* MacConkey agarda üreyebilmesi, indol ve üreaz aktivitelerinin negatif olması ile *Pasteurella* türlerinden ayrılır (137).

M. haemolytica antijenik yapıya sahip protein, polisakkarit ve lipitin hepsini birden bulduran Gram negatif bir bakteridir (3). Anti-fagositik kapsül, lipopolisakkarit, demir düzenleyici Outer Membran proteinleri (OMP), adhesinler, ruminant spesifik lökotosin ve enzimler (sialoglikoproteaz, nöraminidaz ve iki potansiyel immunoglobulin proteazlar) *M. haemolytica*'nın en önemli antijenik yapıları ve virulens faktörleridir. (33, 86, 158). Bu substanslar patogeneizde virulens faktörleri olarak görev yaparlar. *P. multocida*'da ise kapsül ve somatik antijenleri, OMP, endotoksin, diğer toksinler (dermonekrotik toksin), ısı şok

proteinleri, nöraminidaz ve diğer enzimler virulens faktörleri olarak görev yaparlar (37). *P. multocida*'nın virulens faktörleri (kapsül hariç) hakkında az şey bilinmektedir. Özellikle virulens ve patojenitesinin moleküler temeli hakkındaki bilgilerin eksik olduğu bildirilmektedir (92).

OMP'lar hücre dışına ve içine moleküllerin taşınmasında, konakçı hücrelerine adhezyonda rol oynamaktadırlar (153). *Pasteurella multocida* ile ilgili OMP'ların çoğu bunları potansiyel aşı adayları yapan, immunojenik özelliklerine bağlı olmuştur (36). İn vivo gelişen *P. multocida* suşlarının OMP'lerinin heterolog somatik serotiplerine karşı bağışıklığı sağladığı, oysa in vitro gelişen suşların OMP'leri sadece homolog immuniteye sebep olduğu bildirilmektedir (36).

P. multocida'nın OMP'leri aynı zamanda hedef hücrelere adhezyon ile alakalı olabildiği belirtilmektedir. Lübke ve ark. (1994) tarafından yapılan araştırmalar bir sığır kapsül tip izolatından elde edilen 35 kDa'luk bir proteinin bir adhezyon faktörü olabileceğini göstermişlerdir (110).

M. haemolytica'nın OMP'leri ve lipoproteinlerinin önemli koruyucu antijenler olduklarına inanılır. Bu antijenlerin bazısına karşı oluşturulan antikorların fagositoza sebep olma ve komplement aracılığı ile öldürme yeteneği vardır (86).

M. haemolytica aynı zamanda demir düzenleyici Outer Membran proteini (IROMP'lar) salgılamaktadır. IROMP'ların demir kazanmada anahtar rolü oynadığı düşünülmüştür. *M. haemolytica* bakterileri infeksiyon süreci esnasında bunların demir kazanmada rolü olan IROMP'lar üzerinde sığırların akciğerlerinde geliştiği ifade edilir (50). Böylece, Akciğer dokusu gibi demir bakımından zayıf

olan bölgelerde, demir alımını düzenleyen dış zar proteinleri, bakterinin hayatta kalması açısından önemli bir görev üstlenirler (43, 86).

Sığır lökositleri yönünden *M. haemolytica*'nın sitotoksitesi ilk kez 1978'de Benson ve ark. tarafından rapor edilmiştir (15). Metabolik olarak aktif *M. haemolytica* hücreleri ruminant lökositlerine spesifik toksik özelliğe sahip bir ekzotoksin (lökotoksin) üretirler (33). Lökotoksin en fazla logaritmik üreme fazında üretilmekte ve bakterinin invazyonunu hızlandırarak, konakçı savunmasını tuzağa düşürmektedir (150). Lökotoksin diye isimlendirilen bu toksik faktörün ruminant nötrofilleri, monositler, makrofajlar ve lenfositler için spesifik olduğu gösterilmiştir (169). Lökotoksinin oksijene ve pH'a dayanıklı, dializ olmayan, hemoliz özelliği bulunmayan, suda eriyen, antijenik bir glikoprotein olduğu ortaya konmuştur (14). Yüksek konsantrasyonlarda toksinin, şişme ve lizise yol açan hücre membranındaki porları meydana getirdiğini, düşük konsantrasyonlarda toksin ise nötrofilleri aktive etmekte (47), sitokin üretimine sebep olmakta, hücre iskeletindeki değişikliklere ve apoptozise sebep olmaktadır (154). Bu aktıveler kombine olarak savunma mekanizmalarını bozduğu ve pnömonik pastörellozisin tanımlanan yangıya ve doku hasarına neden olduğu düşünülmüştür.

Lökotoksinin bu morfolojik değişikliklere sebep olması ile ilgili tam mekanizma bilinmez. Bununla birlikte, bazı raporlar lökotoksinin hücreler içerisinde kalsiyumun geçişine izin veren hücre membranında porların teşekkülünde rol oynayabildiğini göstermiştir (38, 169).

M. haemolytica aynı zamanda endotoksin veya lipopolisakkarit (LPS) de üretir. Bakterilerin %12-25'inin LPS'den ibaret olduğu ve LPS'nin çoğunun

smooth tipte olduğu tahmin edilmektedir (169). LPS'ler lipid ve polisakkarit komponentlerinden oluşurlar. Lipid A endotoksik aktiviteye sahiptir, polisakkaritler somatik antijenlerini belirler. LPS'nin polisakkarit komponenti komplemantin alternatif yolunu aktive edebilir (120), n6trofil akımına, yangıya yol ačan TNF-alfa vasıtasıyla IL-1 Beta ve IL-8'in induksiyonundan sorumlu olduğu (169) ve LPS sığır pulmoner endothelial h6crelere zarar verdiği belirtilmiştir (34).

Akciğerde Artus yada Schwartzmann reaksiyonunun (3,83) lokalize olmasıyla yangıyı ve hasarı şiddetlendirebilen *M.haemolytica* LPS'sinin bağışıklığa aracılık eden hipersensitiviteye sebep olduğu arzedilmiştir (86). Lafleur ve ark. (1998), LPS'nin l6kotoksinin sitolitik aktivitesini artırdığı ve LPS'nin sığır alveolar makrofajlarında l6kotoksine bağlı IL-8 ve TNF-alfa ekspresyonunu artırdığını belirtmişlerdir (102). Ayrıca bunun sonucunda etkene karşı oluşan yangısal cevabın arttığını belirtmişlerdir (106).

P.multocida ve *M. haemolytica*'nın kaps6ler polisakkaritleri, serotip spesifiteden sorumludurlar (17). Kaps6ler polisakkarit bakterinin akciğer dokusuna yapışmasından, n6trofillerin fagositozunu engellemekten ve komplemant aracılığı ile oluşan lizis'e direnç g6stermekten sorumludur. Serotip A1'de kaps6l ekspresyonunun genç k6lt6rlerde arttığı, fakat 16 saatten daha eski k6lt6rlerde azaldığı belirtilmiştir (86). Yapılan araştırmalar, *P.multocida* suşunun kaps6ll6 formlarının kaps6ls6z formlarına g6re daha virulent olduğunu (27, 36) ve virulent izolatların akaps6ler mutantlarının infekte etme yeteneği olduğunu, fakat mortaliteye sebep olmadığını belirtmişlerdir (36). Bununla birlikte, infekte

kuşlardan elde edilen kapsüllü izolatların daha düşük virulenste olabildiği gösterilmiştir (24).

Hastalığın patogenezi hakkındaki çalışmalar, üst solunum yolu normal florasında bulunan *M. haemolytica*'nın alt solunum yollarına ve oradan da akciğerlere geçerek hastalığı oluşturması üzerinde yoğunlaşmıştır (139). Normalde akciğerler, akciğerlerin ve üst solunum yollarının kendiliğinden temizlenme mekanizmasından dolayı mikroorganizmalar yönünden temizdir (141, 157). *Pasteurella* türleri sağlıklı sığırların nazofarinkslerinden izole edilebilmektedir (69, 89). Klinik olarak sağlıklı sığırlarda, *M. haemolytica* biyotip A normal üst solunum yolu florası içinde az sayıda bulunmaktadır, Shipping fever ile ilişkisi zayıf olan, *M. haemolytica* biyotip A serotip 2 ise dominant olarak bulunur (67).

Bununla birlikte hastalığın şiddeti ve insidensi birkaç faktöre bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir. Sağlıklı sığırlar üst solunum yollarındaki viral bir enfeksiyon veya solunum yollarının savunma mekanizmasını bozan idare şekliyle (marketleme, nakil, aşırı kalabalık) ve çevreyle (soğuk, nemli ya da kuru sıcak hava) (67, 169) ilgili stres faktörleri, nazofarenkste *Pasteurella*'ların büyük popülasyon oluşturarak çoğalmasına ve virulensin artmasına neden olmaktadır. Sonra *Pasteurella*'lar damlacık enfeksiyonu şeklinde tracheal hava yolu ile akciğerlere geçerek pnömonik pastörellozis'i oluşturmaktadırlar (82).

Bununla birlikte, Pnömonik pastörellozun olduğu dönemde, *P. multocida*'nın sadece üst solunum yolunda bulunduğu ve kolonize olmadığı gözlenir (7). Nazofarinks'de hızla üreyen *M. haemolytica* serotip 1 konakçının solunum yolu ile damlacık enfeksiyonu şeklinde çevreye yayılmakta ve çevrede

bulunan hayvanlar için potansiyel bulaşma kaynağı oluşturmaktadır (68). Kolonizasyonda ve adhezyonda *M. haemolytica* serotip 1'in yüzeyindeki spesifik ST-1 faktörlerinin rol oynadıklarını ileri sürmektedirler (79). Pnömonik pastörelloz'da üst solunum yollarında *M. haemolytica* serotip 1'in çoğalıp hastalığı oluşturmasında, bu serotipin adhezyonunun ve kolonizasyonunun öneminin büyük olduğu bildirilmektedir (66) (Şekil 1). Ancak *M. haemolytica*'nın sığır üst solunum yolundaki kolonizasyonu ve adhezyon mekanizmaları hakkında çok az bilgi vardır (169).

Nazofarinkste kolonizasyon için gerekli şey epitel yüzeye bakterinin yapışmasıdır. Yapışma genellikle epitel hücrelerde mevcut olan glikoproteinler ya da mukosal glikolipidler için yüksek affinitesi bulunan adhesinlerle ilişkili, bakterial fimbrialar vasıtasıyla genellikle ortaya çıkar (45). Üst solunum yolunda kolonizasyon oluşmasında iki değişiklik rol oynar (169), mukosilyer örtünün değişmesi ve epitel yüzeylerde adhesive glikoprotein olan fibronektin'in kaybıdır (171). Üst solunum yolunda viral enfeksiyon, stres ve bakteriyel ürünlerin tümü fibronektin'in hücre yüzeyindeki miktarı ve mukosilyer örtünün değişiminde rol oynar. Ayrıca, *Pasteurella*'ların ürettiği nöraminidaz ve nötral proteaz da üst solunum yolunda kolonize olma yeteneğini artırır ve direk olarak mikroflorayı değiştirebilir (65,156).

Nöraminidaz birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerle ilişkili olan bir virulens faktörüdür ve invitro çalışmalarda *M. haemolytica* A1, A2'den daha fazla miktarda bu enzimi üretir (156). Buzağılarda deneysel bir çalışmada buzağılara deneysel olarak hava yolu ile *M. haemolytica* vermişler, buzağıları derhal öldürmüşler ve *M. haemolytica*'nın buzağuların alveolar epitel hücrelerinde

ya da yakınında yerleştiğini bildirmişlerdir (75). Alveolar makrofajlar sadece fagositozda rol oynamazlar, ayrıca ortama salgıladıkları faktörler ile de akciğerlerde yangı ve immün reaksiyonun hızlanmasına neden olmaktadır (25). Ayrıca, alveolar makrofajlar A1 bakterisine ilk müdahale eden hücrelerdir (66). Akciğerde pnömoninin ilerlemesini engelleyen birkaç savunma mekanizması vardır. Lillie ve Thomson (1972) sağlıklı buzağuların hava yolu ile alınmış *M. haemolytica*'nın 2 saatte %75'ini, 4 saatte %90'ını ve 8 saatte %92'sini akciğerlerden temizleme yeteneğine sahip olduklarını belirtmektedirler (107).

Buzağularda akciğer temizlenmesi birkaç mekanizmayla olduğu bildirilmiştir. Mukosilyer örtü alveollere ulaşmayan *M. haemolytica*'nın çoğunu temizler. (68). Canlı *M. haemolytica*'nın in vitro alveolar makrofajları öldüren bir lökotosin ürettiği belirtilmiştir (15). *M. haemolytica*'nın alveolar makrofajlar ile fagosite edilmesi için opsonize edilmesi gerektiği bildirilmektedir (114). Yapılan bir deneysel çalışmada pnömonik pastörellozisin ilk 30 dakikasında alveolar makrofajları akciğerlerde en fazla (%90) rastlanan savunma hücresi olarak tespit etmişler, 60 dakikada alveolar makrofajlar ile nötrofillerin yüzdesinin eşit olduğunu ve 4 saatte ortamdaki savunma hücrelerinin çoğunun nötrofiller olduğunu bildirmektedirler (167). Nötrofillerin lökotosine alveolar makrofajlardan daha az hassas olduğu belirtilmektedir (46) ve yetişkin sığırların alveolar makrofajları 16 haftalıktan daha küçük olan sığırların alveolar makrofajlarından daha dirençlidir (169).

Ruminant lökositlerine karşı spesifik toksik etkiye sahip ve aktif olarak üreyen *M. haemolytica* tarafından salgılanan lökotosin (33) pnömonik pastörelloz'un başlangıç safhasında ortamdaki alveolar makrofajların ölümüne

neden olmakta ve *M. haemolytica* hücrelerinin fagosite edilmelerini önlemektedir (34). Enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında ise artan lökotoksin miktarı, hem çok sayıda makrofaj ve nötrofillerin ölümüne yol açmakta hem de bu arada birçok oksijen radikalinin ve histaminin açığa çıkmasına neden olarak, pulmoner endotel hücrelerinin hasara uğramasına sebep olmakta ve pnömonik lezyonların oluşmasına yol açmaktadır (47). Bronş, bronşiol ve alveollerde dejenere olmuş nötrofil ve alveolar makrofajların bulunması hastalığın patolojik göstergesi olarak kabul edilir (2). Nötrofiller tarafından serbest bırakılan yangısal mediatörlerden örneğin IL-1, TNF-alfa ve lökotrienler yoluyla akciğerlerde doku zararının oluştuğu düşünülür (86).

M. haemolytica'ya karşı direncin oluşmasında, serumdaki spesifik antikorlar ile opsonize olmuş *M. haemolytica*'nın lökositler tarafından fagositozu, serum ve bronkoalveolar sıvıda bulunan antikorlar ile *M. haemolytica* lökotoksininin nötralizasyonu en önemli immün mekanizmalardır (42,46).

Confer ve ark (1988)'ının *M. haemolytica*'nın antijenik yapıları ve immün mekanizması üzerine yaptıkları çalışmaların başlıca üç önemli nedene dayandığını savunmaktadırlar. Bunlardan birincisi *M. haemolytica*'ya karşı direncin etkili bir şekilde arttırılması, ikincisi immüniteyi oluşturan ve hızlandıran antijenlerin belirlenmesi ve üçüncüsü de etkili bir *M. haemolytica* aşısının geliştirilmesidir. *M. haemolytica* serotip A1'e karşı doğal hastalıktan dolayı oluşan lökotoksin nötralize edici antikorlar, hayvanların hastalıktan korunması ile direkt ilişkilidir. Bu görüşü, *M. haemolytica* serotip A1'in lökotoksin içeren kültür süpernatantı ile aşıl原因an hayvanlarda, serotip A1 ile deneysel enfeksiyona karşı belirgin bir direncin oluşması desteklemektedir (42).

Pastörelloz'un teşhisi kültür ve serolojik testler ile yapılmaktadır. Kültür en güvenilir teşhis metodudur. Ancak, uzun zaman alması, kontaminasyon problemi, saf kültür elde etmenin zor olması gibi dezavantajları vardır (162). Primer izolasyon genellikle kanlı agar, dextrose starch agar veya trypticase soy agar gibi besiyerleri kullanılarak yapılmaktadır. İzolasyon %5 koyun kanı veya sığır kanı ilavesi ile artırılabilir (37, 126). Madsen ve ark. (1985) pnömonili danaların akciğerlerinden *Pasteurella* türlerinin izolasyonu için yaptıkları çalışmada ilk izolasyon için %5 sitratlı Columbia Blood Agar, polimiksin'li 12,5 UI/ml kanlı agar ve kloralhidratlı 1,4 mg/ml kanlı agar kullandıklarını ve %10 karbondioksitli etüvde 48 saat inkube ettiklerini bildirmişlerdir (112). Ayrıca *Pasteurella* türleri için selektif besiyeri olarak vancomycin (6 µg/ml), nystatin (12,5 µg/ml) ve %5 sitratlı koyun kanı ilave edilmiş Columbia Blood Agar kullanılmaktadır (54). Lee ve ark. (2000) tavukların sindirim sisteminden *P. multocida*'nın izolasyonu için %10 koyun kanı ilave edilmiş dekstroz nişasta agarda polymyxin, kristal violet, thallos acetate, bacitracin ve cycloheximide içeren selektif bir besiyeri geliştirmişlerdir. Bu besiyerinin *P. multocida* izolasyonunda yüksek derecede sensitif olduğunu bildirmişlerdir (103).

Pasteurella'ların izolasyonu ve identifikasyonunda konvansiyonel metotların uzun zaman alması (sonuçlar elde edilinceye kadar 1 hafta veya daha fazla zamana gerek duyulur), kontaminasyon problemi, saf kültür elde etmenin zor olması gibi dezavantajları vardır (162). Ayrıca bakteriyel etkenlerden ileri gelen bazı enfeksiyonlarda spesifik etkenin her zaman izolasyonu ve identifikasyonu mümkün olmamakta, primer etken yerine sekonder bakteriler izole edilmekte ve hastalığın teşhis ve sağaltımı buna göre yapılmaktadır.

Biyokimyasal testlerde kültürler saf olmadığında hatalı sonuçlar alınmasına neden olmaktadır.

P. multocida izolasyonunda fare inokulasyon testi de kullanılmaktadır. Fare inokulasyon metotları çoğu kez diğer mikroorganizmalar ile kontamine olmuş örneklerde *P. multocida*'nın varlığını saptamak için kullanılmaktadır (95). Bu testin taşıyıcı hayvanları araştırmak için sensitif olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, fareler için virulensin değişken olduğu rapor edilmiştir (37, 95, 122).

Pasteurella türlerinin serolojik teşhisinde birçok test kullanılmaktadır. Bunlar İndirek Hemagglütinasyon (IHA), Çabuk IHA, Çabuk Lam Agglütinasyon (Rapid Plate Agglutination) (RPA), Counter Immunoelectrophoresis (CIE), Countercurrent Immunoelectrophoresis (CCIE), Agar Jel Difüzyon (AGD), Coagglütinasyon testi ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'dır. *Pasteurella* serotiplerini saptamak için kullanılan tekniklerin karşılaştırmasının yapıldığı bir çalışmada, ELISA'nın serolojik testler içerisinde en sensitif olduğu ve kros reaksiyon ihtimalini en aza indirdiği ileri sürülmüştür (59).

M. haemolytica biyokimyasal özellikleri ve koloni morfolojisine göre A ve T olmak üzere iki biyotip altında toplanmıştır. Biyotipler L-arabinozu ya da trehalozu fermente etme yeteneğine bakılarak A ve T olarak isimlendirilmiştir (9, 18, 35, 42, 44, 61, 66, 86, 100, 108). Daha sonra Frederiksen (1973) A/T biyotiplendirme örneğine uygun olmayan suşlar için *M. haemolytica*'nın 3.taksonunu teklif etmiştir (71). T tiplerinin laktozu fermente etmediği, T tiplerinin A tiplerine kıyasla salisini daha fazla fermente ettiği ve A tiplerinin T tiplerine kıyasla ksilozu daha fazla fermente ettiği kabul edilmektedir (19, 63).

M. haemolytica'nın A ve T biyotiplerinin farklı serotipleri olduğu ilk defa Biberstein ve ark. (1960) tarafından indirekt hemaglutinasyon testi ile belirlenmiştir (17). Araştırmacılar IHA testi ile *M. haemolytica* suşlarını serotiplendirmişler ve 11 farklı serotip belirlemişlerdir. Daha sonra kapsüller polisakkaritlerdeki farklılıklar temel alınarak toplam 16 serotipin bulunduğu bildirilmiştir (61, 70, 108, 138). Buna ilave olarak *M. haemolytica* serotip (A17) son zamanlarda geliştirildi (173) ve serotiplerin sayısı sonradan 17'ye yükseldi (17, 60, 70, 174). IHA negatif *M. haemolytica* suşlarını RPA, Agar Jel Diffüzyon (AGD) ve Counter Current Immuno-electrophoresis (CCIE) testler ile serotiplendirmeye çalışmışlar (53) ve bu suşların serotiplerinin RPA metodu ile ayrılmasının, benzer somatik antijenlerinden dolayı (birbirleri ile kros reaksiyon vermeleri yüzünden) pratiklik sağlanamamıştır (62). Bu 17 serotipin genetik olarak farklı türleri temsil ettiği gösterilmiştir. A1 , A2 , A5, A9, A12, A14 , A16 ve A17 serotipleri *M. haemolytica*'yı, T3, T4, T10 ve T15 serotipleri *P.trehalosi*'yi (21, 108) ve A11 serotipi de *M.glucosida*'yı temsil etmektedir (9, 10). DNA-DNA hibridizasyonu, 16S rRNA sekans dizisi ve ve biyokimyasal tiplendirme ile biotip A organizmalarının 12 tanesi (Serotip A1, A2, A5, A9, A12, A14, A16 ve A17) *M. haemolytica* olarak yeniden isimlendirilmiştir (9). Dünyada en yaygın serotipler olarak *M.haemolytica* serotip A1 ve A2 bulunmuştur (86). A1 serotipi sığırlarda (99), A2 serotipi koyunlarda hastalık oluşturmaktadır (42, 86). *P.multocida*'da kapsüller ve somatik antijenlerine göre tiplendirme yapılır. *P.multocida* kapsüller tipine göre beş tane serotipi bilinir (A, B, D, E, F) (36, 44). Ayrıca, *P. multocida*'nın 16 somatik serotipi vardır ve serotiplendirmede Carter ve Heddleston sistemleri ile bunlar ayırt edilir (143).

Somatik tiplendirmede 2 sistem kullanılır, bunlar Namioka ya da Heddleston sistemleridir (35). *P. multocida* somatik serotiplendirmesi çoğunlukla Agar Jel İmmunodifüzyon testi ile yapılır (44). *P. multocida* serogrup B ve E sığır ve buffalolarda hemorajik septisemiyle ilgilidir (31), serogrup A kanatlı hayvanlarda kanatlı kolerasına neden olur, serogrup D ise domuzlarda atrofik rhinitis'le ilgilidir (27). Sığır hemorajik septisemisinden Güneydoğu Asya'da B:6, Afrika'da E:6 sorumlu tutulmuştur (31), halbuki sığır solunum yolu hastalığı başlıca serogrup A ile ilgilidir.

Son yıllarda bakteriyel hastalıkların teşhisinde kullanılan, uzun zaman alan ve sensitivite ve spesifitesi düşük olan bakteriyolojik ve serolojik metotlara alternatif olarak geliştirilen çabuk, sensitif ve spesifik bir moleküler biyolojik metot olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği kullanılmaktadır. *P. multocida*'nın tespiti için OMP geninden hazırlanan primerlerin kullanıldığı bir PZR tekniği sunulmuştur (124). Kamp ve ark. (1996) tox A geninden (progresif atrofik rinitis'te dermonekrotik toksini kodlar) hazırlanan primerlerin kullanılması ile toksijenik *P. multocida* suşlarını tespit etmek için tanımladıkları PZR testinin çok sensitif ve etkili bir metot olduğunu rapor etmişlerdir (94). Mifflin ve ark. (2001) tarafından 23S rRNA gen sekansından türetilen primerler kullanılarak *P. multocida* suşlarını tespit etmek için PZR testi geliştirilmiştir (118). Mifflin ve ark. (2001) PM23-2 PZR'ın kanatlı ve domuzlardan *Pastörella multocida*'yı tanımlama için kullanılabileceğini, fakat biovar 2 organizmalarıyla yanlış pozitif olma ihtimalinin olabileceğini bildirmiştir. Ayrıca, bu PZR ile bütün *P. multocida* izolatlarının identifikasyonunun yapılabileceği belirtilmiştir. PM23-2 PZR'in ayrıca daha önce yayımlanmış olan Kasten ve ark. (1997) ve Townsend ve

ark. (1998) tarafından yapılan PZR testlerinden (95, 161) daha yaygın ve etkili olduğu ve veteriner teşhis laboratuvarları için bu PZR'in, doğru ve hızlı bir teşhis aracı olarak önem taşıdığı belirtilmiştir (118).

Townsend ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmalarda *P. multocida*'nın tespit edilmesinde direkt kültürün, fare inokülasyonu veya PZR testinden daha az sensitif olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar bazı izolatların fareler için patojenik olmadığı için PZR ile *P. multocida*'nın tespitinin başarılı olduğunu ileri sürmektedirler (162). PZR'nin avantajları olmakla birlikte kontaminasyon, canlı mikroorganizmaların yanı sıra ölü mikroorganizmaların DNA'larını da tespit etmesi gibi dezavantajları vardır (48). Ayrıca biyolojik örnekler (kan, idrar, gaita) gibi materyaller ile çalışıldığında örnekler arasında kros kontaminasyonun olduğu ve bu materyaller içindeki substansların PZR'ı inhibe ettiği belirtilmektedir (39).

Sığırları solunum sistemi enfeksiyonlarından korumak amacıyla bilinen virüslere karşı aşılama yapılmasının hastalığın şiddetini ve insidensini azaltacağını bildirmekle birlikte, hastalığı oluşturan çok sayıda virusun bulunmasının bu işi zorlaştıracığını savunmaktadır. Bunun yerine hastalığın ölümcül seyretmesine neden olan *Pastörella* türlerine karşı aşılama yapılmasının, daha yararlı olacağını bildirmektedir (68).

Canlı *M. haemolytica* aşıları enfeksiyona direnci artırabilir (2) ve *M. haemolytica* canlı aşılarının, hayvanları pnömonik pastörellozdan korumada, diğer aşılara göre daha etkili olduğu savunulmaktadır (41). Ayrıca saflaştırılmış *M. haemolytica* lökotoksinli deneysel aşılar da antikor titresine neden olabilir, fakat pnömoniyi önlemede etkinliği tamamıyla tespit edilememiştir. Aşılar, tipik olarak ölü bakterinler ya da lökotoksinli yada lökotoksinsiz canlı aşılar olarak ayrılır. Bir

çalışmada hem bakterin- toxoidi (OneShot, Pfizer) hem de canlı aşının (Once PMH, Bayer Corp.) korumaya neden olduğu, bununla birlikte, bakterin-toxoidi'nin daha yüksek koruma sağladığı belirtilmiştir (2). Canlı olmayan *M. haemolytica* aşıları (Oneshot, Pfizer), Presponse HP/tK, ve Septimure PHK) aşılardan sonraki 7-14 gün içerisinde bütün *M. haemolytica* hücrelerine karşı antikor titresine neden olur, fakat bu aşılarından sadece iki tanesi (OneShot ve Presponse) lökotoksine antikor titresine neden olur (2).

Hasta hayvanların sağaltımına ne kadar erken başlanırsa o kadar iyi sonuç alınacağı ve hasta hayvanlar diğerlerinden ayrılarak mümkün olduğu kadar erken antibiyotik ya da sulfonamid tedavisine başlanması gerektiği bildirilmektedir (68, 86). Çünkü tedavinin az etkili ya da etkisiz olduğu bir devrede hastalık 1-2 gün içerisinde ilerleyebilmektedir (68). Sığır solunum yolu hastalığının tedavisinde antimikrobial tedavi için uygun olan antimikrobiyel ajanlar, akciğerlerde en büyük bakteriyel patojenler (*M.haemolytica* A1, *P.multocida* ve *Hemofilus somnus*) için inhibitör olacak konsantrasyonlarda olunca başarılabilirliği gösterilmiştir (159). Marbofloxacin'in önceki saha denemelerinde sığır solunum yolu hastalığının tedavisinde oxytetracyclin'den ziyade daha yararlı ve güvenli olduğu bulunmuştur (159). Yine yapılan denemelerde sığırlara oral tilmicosin tedavisinin deneysel *M. haemolytica* enfeksiyonuna karşı etkili olduğu ispat edilmiştir (64). Antibiyotik tedavisine erken başlanılmasına rağmen, *Pasteurella* türleri arasında antibiyotiklere direncin yaygın olduğunun gözönünde bulundurulması gerekmektedir (86). Dirençliliğin plazmidler ile alakalı olduğu bulunmuştur (170). *M. haemolytica*'da saptanan plazmidlerin penisilin, tetrasiklin,

streptomisin, sulfonamidler, makrolidler ve sulfametazin'ler gibi antibiyotiklere etkenin direnç göstermesinde etkili olduğu bildirilmektedir (86, 87, 117).

Pnömonik pastörellozdan korunmada aşılanmanın yanısıra bakım ve beslenmenin ve antimikrobiyal ilaç kullanımının önemi büyüktür (139). Buzağular besiyeye alınmak için farklı yerlere götürülürken mümkün olduğu kadar stres faktörlerinden (aşırı kalabalık, bulaşık sığırların bulunabileceği hayvan pazarları, açlık vb) uzak tutulması hastalıktan korunmada önemlidir (68).

Sonbahar ve kış aylarında yapılan intansif sığır besiciliğinde en sık karşılaşılan problemlerin başında özellikle solunum yolu hastalıkları gelmektedir. Bu konuda araştırmacıların birleştiği ortak nokta, pnömonilerin besi sığırlarındaki önemi ve yol açtığı ekonomik kayıplardır (42, 51, 68, 86, 89, 169). Mac Vean ve ark (1986), tarafından yapılan bir araştırmada sığırlarda solunum yolu hastalıklarının, tüm hastalıkların % 75'ini, tüm ölüm nedenlerinin ise % 64'ünü oluşturduğu ve pnömonilerin de solunum yolu rahatsızlıklarının % 75'ini teşkil ettiği ileri sürülmüştür. Bununla beraber fazladan ilaç ve veteriner masrafları nedeniyle yüksek oranda ekonomik kayıplara sebebiyet verir. Ayrıca et ve ürünleri ile insanlara bulaşan bazı zoonotik hastalıklar da akciğerlerden köken almaktadır (111).

Sığırlarda yapılan çalışmalarda, pnömoni oranının % 6.1 ile % 40 arasında oldukça farklı oranlarda değiştiği dikkati çekmektedir. (13, 29, 84, 113, 128, 129, 160). Yine Thomas ve Swann (1973) toplam 805 buzağı üzerinde kolostrumun buzağı pnömonisi oranına etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, buzağuları yaz ve kış doğumlu olarak iki gruba ayırmışlar, yazın doğanlarda kışın

doğanlara oranla daha dūřuk olmak üzere ortalama % 29,06 oranında solunum sistemi hastalığı bulmuşlardır (160).

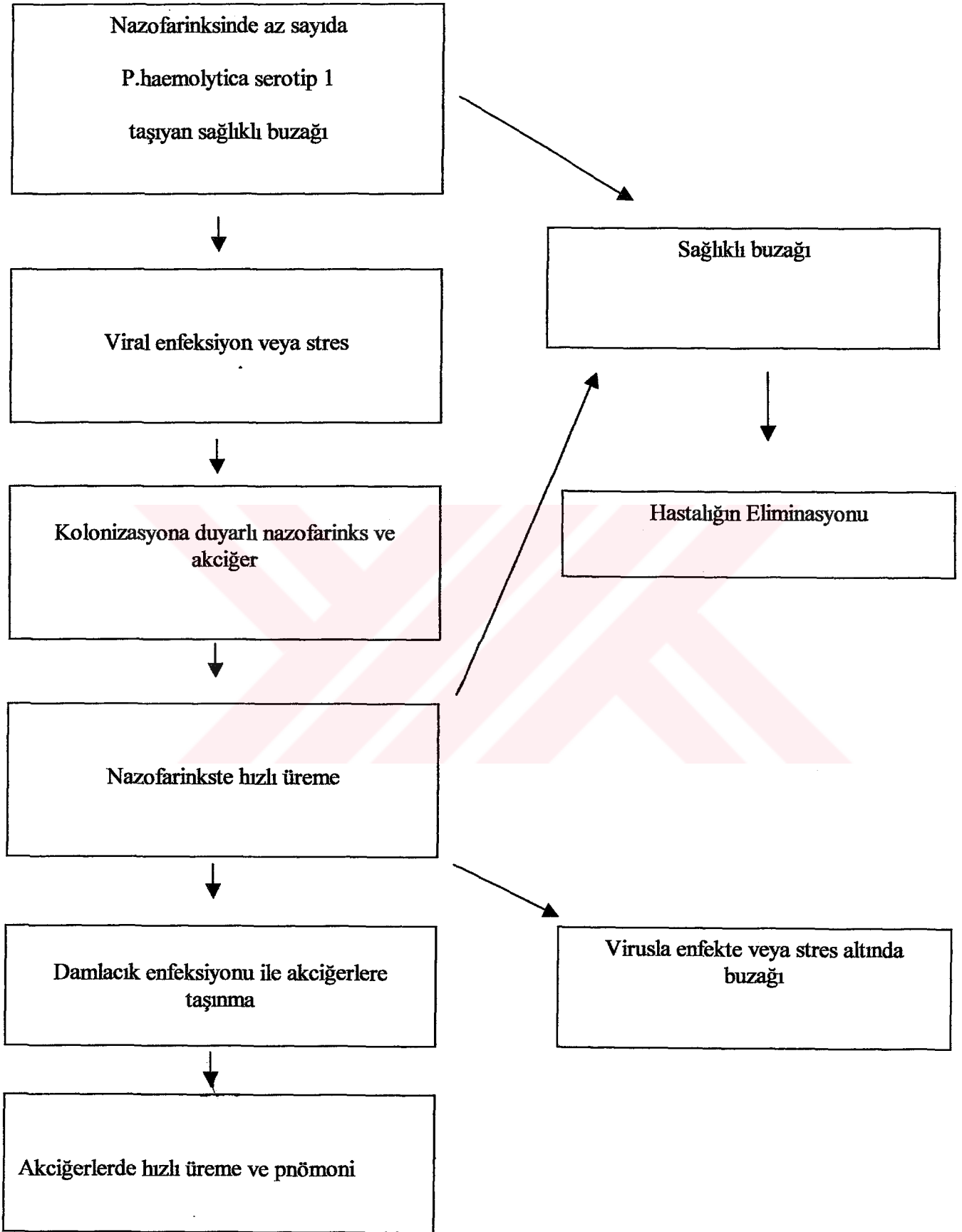
Sığır pnömonilerinde çeşitli bakteriyel ve viral etkenlerin izole edildiği bildirilmektedir. Houghton ve Gourlay (1984) pnömonili sığır akciğerlerinden %30 oranında *M. haemolytica*'yı ve %3 oranında da *P. multocida*'yı izole etmişlerdir (89). Allan ve ark (1985), pnömoni nedeniyle ölen veya kesilen buzağıların, akciğerlerinden izole edilen *M. haemolytica* (73%) ile *P. multocida* (15,8 %) arasında önemli bir fark gözlediklerini bildirmektedirler (6). Erdağ ve ark. (1993) da, ölümcül seyreden buzağı pnömonilerinden izole edilen bakteriyel etkenler içinde, *M. haemolytica*'nın, %75'lik oranı ile ilk sırada yer aldığını bildirmektedirler (58). Sığır pnömoni insidensleri oldukça farklı bulunmuştur. Bölgemizde daha önce yapılan bir çalışmada sığırlarda pnömoni insidensi %20,3 olarak tespit edilmiştir (131). Bu çalışmada ise pnömoni prevalansı %6,1 olarak tespit edilmiştir.

Türkiye'de Konya bölgesinde, buzağılar üzerinde yapılan bakteriyolojik çalışmalarda pnömonili akciğerlerden *Pasteurella*'lar % 12-24, *Staphylococcus spp.* % 12-24,5, *E. coli* % 13,3, *Klebsiella pneumonia* % 4-30, *Streptococcus spp.* % 9-16,6 ve *C. pyogenes* % 4-15 oranlarında izole edilmiştir (97, 164, 165). Bu çalışmalarda virus ve mikoplazma izolasyonu yapılamamıştır. Öztürk ve ark. (1993), Türkiye'de gerek serolojik ve gerekse virus izolasyonu amaçlı yapılan çalışmalarda, danalarda viral solunum yolu hastalıklarının da oldukça yaygın olduğunu ifade etmişlerdir (130).

Türkiye'de, ölüme neden olan buzağı pnömonilerinin incelendiği bir araştırmada Girgin ve ark. (1989) pnömonili buzağı akciğerlerinden izole ettikleri

etkenler içerisinde *E. coli*'nin %37,8 oranı ile ilk sırayı aldığını, *Pasteurella* türlerinin %18 ile ikinci, *C. pyogenes*'in ise %15 ile üçüncü sırayı aldığını belirtmişlerdir (78). Erdağ ve ark (1993) Trakya ve Marmara bölgesinde pnömonili buzağı akciğerlerinden bakteriyolojik inceleme sonucu %70 *M. haemolytica*, %4,3 *Streptococcus pneumoniae*, %30 *E. coli*, %30 *C. pyogenes*, %11,5 *S. aureus* ve %3 *Mycoplasma bovis*'i izole etmişlerdir (58). Kars yöresinde Şahin (1997) tarafından pnömonili sığır akciğerlerinden %50 *M. bovis*, %33,33 *M. bovirhinis*, %16,66 *M. arginini*, %20,75 *M. haemolytica*, %15,09 *P. multocida*, %28,30 *E. coli*, %15,09 *Staphylococcus spp.*, %13,20 *Streptococcus spp.*, %5,66 *Bacillus spp.* ve %1,88 *Actinomyces spp.* izole edilmiştir (155). Yine Konya bölgesinde Gündüz ve Erganiş (1997)'in yaptığı bir çalışmada %15,9 *P. multocida*, %14,1 *M. haemolytica*, %12,1 *E. coli*., %11,2 *Corynebacterium spp.*, %10,3 *Staphylococcus spp.*, %9,1 *Streptococcus spp.*, %3,5 *Klebsiella spp.* ve %2,3 oranında *Pseudomonas spp.* izole edilmiştir (83). Dinler'in (1998)'de yaptığı çalışmada pnömonili sığır akciğerlerinden; %5,9 *M. haemolytica*, %4,5 *P. multocida*, %14,5 *Staphylococcus spp.*, %10,5 *Corynebacterium spp.*, %10 *Klebsiella spp.*, %10 *E. coli*, %7,7 *Streptococcus spp.* ve %3,6 oranında *Pseudomonas spp.* izole edilmiştir (52). Hazıroğlu (1997)'nin yaptığı çalışmada ise pnömonili sığır akciğerlerinden %42 *M. haemolytica*, %8 *P. multocida* izole edilmiştir (85).

Bu çalışma ile sığır akciğerlerinde bulunan bakteriyel etkenler izole ve tanımlanarak, bunların içinden *Pasteurella*'ların bakteriyolojik yöntemler yanı sıra son yıllarda geliştirilmiş önemli moleküler biyoloji yöntemlerinden biri olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile tanımlanması amaçlandı.



Şekil.1. *M. haemolytica* serotip 1'in sığırlardaki epidemiyolojisi ve patogenezi (Frank 1986).

4.GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Numunelerin Toplanması

Eylül 2000-Haziran 2001 tarihleri arasında Elazığ mezbahasında kesilen toplam 8222 sığır akciğeri muayene edildi. Çalışmada materyal olarak, şüpheli 500 adet akciğerde gözlenen makroskobik lezyonlar *Pasteurella* ve diğer bakteriyel etkenler yönünden incelendi. Toplanan örnekler, temiz naylon torbalara konularak 1-2 saat içerisinde laboratuara getirildi ve aynı gün ekimleri yapıldı.

4.2. Referans Suşlar

PZR tekniğinin herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek ve uygun DNA ekstraksiyon yöntemini belirleyebilmek için pozitif kontrol olarak kullanılacak *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşları Dr. L. Fodor (Department of Epizootiology, Macaristan)'dan ve toksijenik *P. multocida* suşu ise Dr. E.M. Kamp (The Institute for Animal Science Health, Hollanda)'dan temin edildi.

4.3. Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonu

Mezbahada kesim esnasında dış bakıda morfolojik ve patolojik bozukluklar gösteren akciğerler alınarak hemen aseptik plastik torbalara birer birer konularak ağızları kapatıldı. Alınan akciğerler zaman kaybetmeden derhal laboratuvara getirildi. Akciğerlerin üst kısımları kızgın bir spatül ile yakıldıktan sonra steril öze ile aseptik koşullar altında % 7 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agara ekildi. Ekimden sonra besiyerleri 37°C'de aerobik şartlarda 24-48 saat inkube edildi ve üreme görülen besiyerlerindeki koloniler tek tek alınarak saf kültürleri yapıldı. Saf olarak izole edilen mikroorganizmaların; koloni

morfolojileri, hemoliz özellikleri incelendi ve ve preparat hazırlanarak Gram boyama metodu ile boyandı. Şüpheli koloniler %5'lik gliserinli buyyonda -20°C' de saklandı.

İzole edilen şüpheli *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşlarının ve diğer bakterilerin identifikasyonu amacıyla, Triple Sugar Iron agarda üreme, MacConkey agarda üreme, Eosin Methylene Blue agarda üreme, Oksidasyon/Fermentasyon, indol, üreaz, Metil Red, Voges Proskauer, oksidaz, katalaz, koagülaz, hareket, H₂S, sitrat, nitrat redüksiyonu, glukoz, trehaloz, ksiloz, arabinoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, mannoz, sukroz, laktoz, dulcitol, inositol, salisin karbonhidrat fermentasyon testleri uygulandı (12, 137).

4.3.1. İzolasyon besiyerleri

4.3.1.1. Blood agar base (Merck 1.10886)

Blood agar.....40gr

Distile su.....1000ml

Karşımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içerisine %7 oranında steril defibrine koyun kanı ilave edildi.

4.3.2. İdentifikasyon Besiyerleri

4.3.2.1. Mac Conkey agar (Oxoid CM 115)

Pasteurella spp. şüpheli bakterilerin 18-24 saatlik saf kültürlerinden, bir koloni alınarak MacConkey agara pasaj yapıldı ve 37°C'de 48-72 saat inkube edildi ve bu süre sonunda agardaki üremeye göre tekrar değerlendirme yapıldı.

4.3.2.2. Eosin Methylen Blue Agar (Oxoid CM 69)

Özellikle *Enterobacteriaceae* ve benzer bakterilerin ayırt edilmesinde kullanıldı.

Escherichia coli gibi laktozu fermente eden bakteriler metalik refle veren yeşil

siyah renkli koloniler yaptığı gözlemlendi. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ve *Hafnia* gibi yavaş fermente edici bakterilerin benzer nitelikteki kolonileri 48 saatte oluştu. *Salmonella*, *Shigella* ve *Proteus* gibi şekerleri fermente etmeyenler ise saydam, renksiz koloniler oluşturdular (20).

4.3.2.3.Oksidasyon-Fermentasyon besiyeri

Peptone2g

NaCl.....5g

Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4).....0,3g

Agar..... 3g

Bromtimol mavisi.....0,3g

Saf su.....1000ml

PH:7,1

Karışımın pH'sı 7,2'ye ayarlandıktan sonra, 15 dakika otoklav edildi. Daha sonra 55°C'ye kadar soğutulup, %10'luk steril glikoz solüsyonundan, son konsantrasyonu %1 olacak şekilde ilave edilip, aseptik şartlarda tüplere 5'er ml dağıtıldı (20).

4.3.2.4.İndol test ortamı

Peptone.....2 g

Sodium klorür.....0,5g

Distile su.....100ml

Maddeler distile su içinde ısıtılıp eritilerek, pH'sı 7,4'e ayarlandı. Tüplere 5 ml miktarlarında taksim edilerek otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi (20).

4.3.2.5.Nitrat test ortamı

Peptone.....5.0g

KNO₃.....1.0g

Distile su.....1000ml

Distile su içinde karışım eritildikten sonra, 5 ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

4.3.2.6.MR/VP (Clark-Lubs)Besiyeri

Polypeptone.....7g

Glucose.....5g

Dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄).....5g

Saf su.....1000ml

Distile su içinde karışım eritildikten sonra, pH'sı 6,9'a ayalanıp, tüplere 5 ml miktarlarında taksim edilerek, otoklavda 121°de 15 dakika sterilize edildi.

4.3.2.7.Ayıracılar

4.3.2.7.1. İndol Ayıracı (Kovacs Ayıracı) (20)

P-Dimethylaminobenzaldehyde.....10g

Saf amyl ya da isoamyl alcohol.....150ml

HCl konsantre.....50ml

4.3.2.7.2.Metil Kırmızısı Ayıracı (20)

Metil kırmızısı.....0,050g

Etil Alkol (%95'lik)150ml

Saf su.....100ml

4.3.2.7.3.Nitrat Ayıracıları (20)

A indikatörü

Alfa-naphthylamine.....0,5g

5 N acetic acid.....100ml

B indikatörü

Sulphanilic acid.....0,8g

5 N acetic acid.....100ml

4.3.2.8.Solüsyonlar

4.3.2.8.1.Karbonhidrat Solüsyonları

Glukoz, trehaloz, ksiloz, arabinoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, mannoz, sukroz, laktoz, dulsitol, inositol, salisin 'in %10'luk eriyikleri hazırlandı ve tinalizasyon yöntemi ile sterilize edildi.

4.4.Biyokimyasal Testlerin Değerlendirilmesi

4.4.1.Oksidaz Testi: Katı besi yerinde üretilen koloniler üzerine Dimethyl -p-phenylenediamine hydrochlorid'in saf sudaki %0,5-1'lik solüsyonundan bir damla damlatılarak, koloni üzerinde renk değişimi olup olmadığına bakıldı. Birkaç dakika içinde koyu mor renk gösterenler oksidaz pozitif olarak değerlendirildi (12).

4.4.2.Katalaz Testi:

%30'luk H₂O₂ solüsyonundan bir damla temiz bir lam üzerine damlatıldı. Saf kültür halinde üretilmiş bakterinin bir kolonisi alınarak bu solüsyonda homojenize edildi. Lam üzerinde gaz çıkışının gözlenmesi halinde reaksiyon pozitif, gazın oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi (12).

4.4.3.İndol Testi:

İndol test ortamına şüpheli bakterinin saf kültüründen ekildikten sonra, 37°C'de 24 saat inkube edildi. İnkubasyondan sonra, indol ayıracından 3-5 damla tüpün yan tarafından akıtılarak, üst tarafta bir tabaka oluşturulması sağlandı.

Besiyeri ve ayıraç arasında kırmızı bir rengin oluşması “pozitif”, renk değişikliğinin olmaması ise “negatif” olarak değerlendirildi.

4.4.4.TSİ (Üç Şekerli Demirli Agar) Besiyerinde H₂S:

TSI besiyerine ekimi yapılan bakteriler 42°C’de 72 saat inkube edildi. Besiyerinde siyah renkli H₂S oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

4.4.5.Metil-Kırmızısı Testi:

Clark-Lubs besiyerine ekimi yapılan bakterinin 72 saatlik inkubasyonu sonunda üzerine 5 damla metil-kırmızısı ayıracı damlatıldı ve tüp çalkalandı. Besiyerinde kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk ise negatif olarak değerlendirildi.

4.4.6.Voges-Proskauer Testi:

Clark-Lubs besiyerine ekimi yapılan bakterinin 42°C’de 72 saat inkubasyonu sonunda, besiyerine %10’luk KOH çözeltisinden 0,2 ml. ilave edildi ve 42°C’de 2 saat bekletildi. Besiyeri renginin pembe olması pozitif, rengin değişmemesi negatif olarak değerlendirildi.

4.4.7.Nitrat Testi:

İçinde nitratlı buyyon bulunan tüplere, şüpheli mikroorganizmanın saf kültüründen, birkaç koloni ekildi ve 37 C°’de 5 gün inkube edildi. Daha sonra buyyonun üzerine nitrat ayraçlarından (Solüsyon A, Solüsyon B), 1’er ml dökülerek, besiyerinin renginin kırmızı veya kiremit kırmızısı olması “pozitif ” olarak kabul edildi.

4.4.8. Üreaz Testi:

Şüpheli mikroorganizmanın saf kültüründen, bir koloni geçilerek 37°C’de 18-22 saat inkube edildi. İnkubasyondan sonra, besiyerinin renginin kırmızı

olması “pozitif”, renk değişikliğinin görülmemesi ise “negatif” olarak değerlendirildi.

4.4.9. Glukoz’a Etki:

Temel besiyeri olarak içerisinde bir ayıraç (Andrade ayıracı) bulunan buyyon besiyeri kullanıldı. Besiyerine eklenmesi dūřtūlen karbonhidratlardan glikoz, laktoz, sūkroz ve mannitol besiyerlerine %1 son yoęunlukta, dięer karbonhidratlar ise %0.5 son yoęunlukta eklendi. İçerisinde Andrade ayıracı bulunan besiyerine ekimi yapılan bakterinin 72 saatlik inkubasyonu sonunda besiyerinde asit ve gazın oluřması pozitif, deęişiklięin olmaması negatif olarak deęerlendirildi.

4.4.10. Mac Conkey agarda ūreme:

Pasteurella řüpheli bakterilerin 18-24 saatlik saf kūltūrlerinden, bir koloni Mac Conkey agara pasaj yapıldı ve 37°C’de 48-72 saat inkube edildi. Bu sūrenin sonunda ūreyen koloniler, *Pasteurella* yūnūnden tekrar deęerlendirildi.

4.4.11. Oksidasyon-Fermentasyon Testi:

İncelenecek bakterinin kolonisinden alınan ūrnek iki glikozlu besiyeri tūpūne batırma ile ekildi. Her tūpe en az 4 batırma yapıldı ve batırmaların yarı katı kısımda 4 mm batacak řekilde yapılmasına ūzen gūsterildi. Tūplerden birisinin ūzerine yavařça steril parafin yaęı 5 mm den az olmamak ūzere konuldu. Denenmesi istenilen her karbonhidrat için bu karbonhidratı içeren iki řer tūp besiyerine aynı řekilde ekim yapıldı. Ekimler 35 derecede en çok 4 gūn bekletilirken her gūn asit oluřup oluřmadıęı, bromthymol mavisinin yeřil renginin sarıya dūnūřmesine bakarak saptandı. Her iki tūpte (aerop ve anaerop) asit oluřması bakterinin fermentasyon yolu ile, yalnız ūstū açık (parafinsiz) tūpte asit

oluşması bakterinin oksidasyon yolu ile karbonhidratı ayrıştırdığını, hiçbir tüpte değişiklik olmaması ise bakterinin karbonhidrata etkili olmadığı anlamını taşır.

4.5.Kapsül Boyama

Temiz bir lamın ortasına bir öze dolusu çini mürekkebi kondu. Serumlu katı besiyerinde üretilerek iyi kapsül yapması sağlanmış kültürden bir öze dolusu alındı. Bu kültür çini mürekkebi damlasının içerisinde karıştırılarak süspansiyon haline getirildikten sonra, temiz bir lamel ile üzeri kapatıldı. Daha sonra lamelin üzeri bir kurutma kağıdı ile bastırılarak lam lamel arasında çok ince bir tabaka halinde yayılması sağlandı. Preparat çabuk kuruyacağından bunu önlemek için lamelin kenarları sıvı parafin ile veya tırnak cılası ile çevrelenerek kapatıldı. İmmersiyon objektifi ile incelendiğinde, çok kırıcı olan bakteri hücresinin çeper sınırı parlak olarak görüldü. Bu sınır ile siyaha boyanan zemin arasında bakteriyi çevreleyen kapsül bir boşluk olarak gözlemlendi.

4.6. Deneme Hayvanları

Bu çalışmada şüpheli sığır akciğerlerinden izole edilen *P. multocida* suşlarının patojenite testlerini yapmak amacı ile kullanılan 20-25 gr ağırlığındaki beyaz fareler Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Deneme Hayvan Ünitesinden temin edildi.

4.7.Fare İnokulasyon Testi

Şüpheli *P. multocida* kolonilerinin 18-24 saatlik kültürlerinden 0,5 ml. miktarında steril enjektör ile farelere intraperitoneal yolla enjekte edildi. Bir fare de kontrol olarak kullanıldı. Patojen *P. multocida* suşları verilen fareler 24-48 saat içerisinde ölmelerine karşın deneme grubundaki fareler 10 günlük gözlem süresinde ölmediler. Deney fareleri öldükten sonra otopsileri yapıldı. Kalp kamı ve

karaciğerden sürme preparatlar hazırlanarak Gram ve Giemsa ile boyandı ve genel amaçlı besi yerlerine ekimleri yapıldı. Bu besiyerleri 37°C' de aerobik ortamda 24-48 saat inkube edildi. İnkubasyon süresi sonunda identifikasyon için gerekli testler yapıldı.

4.8.DNA İzolasyonu

PZR tekniğini optimize etmek amacıyla referans *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşları ile denemeler yapıldı. Bu denemeler neticesinde en uygun DNA ekstraksiyon metodu ve başta primerler olmak üzere PZR karışımının konsantrasyonu belirlendikten sonra, pnömonili akciğer örneklerinden izole edilen ve biyokimyasal testler sonucunda *Pasteurella* şüpheli olarak değerlendirilen suşlardan DNA izole edilerek PZR'de amplifikasyona tabi tutuldu. Kanlı agarda üreyen *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica* referans kültüründen birkaç koloni alınarak 300 µl'lik distile su içeren bir eppendorf tüpte süspanse edildi. Sonra süspanse edilen bakteriler bir vorteks vasıtasıyla iyice karıştırıldı. Daha sonra bakteri süspanasyonu 56°C de 30 dakika süreyle inaktive edildi. Bu aşamayı müteakip en etkili DNA ekstraksiyon metodunu belirlemek için iki prosedür denendi.

Birinci metotta; 56°C' de inaktive edildikten sonra süspanisyona aynı hacimde 0,1 mm. çapında zirkonyum boncukları (Zirkonium beads, Biospec Products, Oklahoma, USA) ilave edilerek " Bead beater " (Biospec Products, Oklahoma, USA) yardımıyla yüksek devirde 2x90 sn. süreyle çalkalanarak hücre duvarının mekanik olarak parçalanması işlemi gerçekleştirildi.

İkinci metotta ise; 56°C' de inaktive edildikten sonra süspanisyona 300 µl K-tamponu (20 mM Tris pH 8.0+150 mM NaCl+10 mM EDTA+% 0,2 SDS) ve

200 µg/ml Proteinase K ilave edildi. Daha sonra süspansiyon 37°C'de 2 saat inkube edildi. İnkubasyondan sonra 30 dakika kaynatma işlemine tabi tutuldu. Kaynatma işleminden sonra süspansiyon vortekslendi. Bu iki farklı aşamayı müteakip fenol ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirildi. Süspansiyona birinci metotta, aynı volümde (300 µl) ve ikinci metotta ise süspansiyona (300 µl distile su+kültür+300 µl K-tamponu) 600 µl Tris-HCl ile satüre edilmiş fenol ilave edildi, süspansiyon elle 5 dakika süreyle iyice çalkalandı ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra eppendorfun üst kısmındaki solüsyon gözle görülebilen bir çizgiyle ayrılmış olan alt kısma (fenollü kısım) dokunmaksızın bir mikropipet yardımıyla dikkatli bir şekilde başka bir eppendorfa aktarıldı. Daha sonra DNA'nın presipitasyonu amacıyla süspansiyona 0,1 volüm 3M Sodyum asetat ve 2,5 volüm saf etanol ilave edilerek -20°C'de 1-2 saat bekletildi. Yüksek devirde (11.600 g) 10 dak. santrifüjü müteakip elde edilen tortu önce 300 µl miktarındaki %90'lık ve daha sonra da %70'lik etanol ile her basamaktan sonra 5 dak. santrifüj işlemi uygulanarak, yıkandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak elde edilen tortu 50 µl distile suda sulandırıldı ve bu süspansiyondan 5 µl alınarak PZR'de hedef DNA olarak kullanıldı.

4.9.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Toplam 50 µl'lik volümde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10xPZR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %1 Triton X-100), deoksitükleotid trifosfatların (Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin) her birinden 250 µM, 2U Taq DNA polymerase enzimi (Promega, USA), primer çiftlerinin (Tablo 3) herbirinden 20 pmol ve 5 µl hedef DNA konduktan sonra karışımın üzeri

100 µl mineral yağ ile kaplandı ve PZR, Touchdown Thermocycler'de (Hybaid, İngiltere) gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu; 94°C'de 5 dakika ön ısıtmayı müteakip 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72°C'de 2 dakika sentez olmak üzere 30 siklus halinde gerçekleştirildi.

4.10.Elektroforez

PZR'de amplifiye edilen DNA, agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutuldu. %1,5 oranında agaroz jel hazırlandıktan sonra 7 µl numune, 3 µl loading solüsyonu (bromofenol blue, Sigma) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yerleştirildi. Elektroforez tampon solüsyonu olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) kullanıldı ve bir jel elektroforez tankında (Hybaid, İngiltere) 75 voltta 1 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elektroforezi müteakip, jel ethidium bromide (0.5 µg/ml) ile 30 dakika süreyle boyandı ve sonuçlar ultraviyole transilluminatörde değerlendirildi. Bantların moleküler ağırlığını saptamak için DNA ladder (Promega) adı verilen 100 bp'lik bir marker kullanıldı. PZR ürünlerinin jel elektroforezi neticesinde 221 bp, 213 bp ve 327 bp uzunluklarındaki bantlar sırasıyla *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica* yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Metodun herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla gerek DNA ekstraksiyonu aşamasında gerek PZR'de pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Negatif kontrollerde DNA amplifikasyonunun hiçbir zaman şekillenmemesi metodun kontaminasyondan arı olduğunu ortaya koydu.

4.11.İstatiksel Analiz

Sığır akciğerlerinden elde edilen kültür pozitiflik oranlarının karşılaştırmasında, Yates corrected χ^2 testi kullanıldı. Bu işlemler Epi-Info adlı istatiksel programda yapıldı (1).



Tablo 3. *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica* suslarının PZR ile İdentifikasyonunda Kullanılan Primerler

Baz Dizileri (5' - 3')	Spesifiklik	Gen Bölgesi	Baz Uzunluğu	Literatür
AGG TGA AAG AGG TTA TG TAC CTA ACT CAA CCA AC	<i>Pasteurella multocida</i>	P.m. Outer Membrane Protein (PMOut)	221	Neumann ve ark. (1998)
GGT CAG ATG ATG CTA GAT ACT CC CCA AAC AGG GTT ATA TTC TGG AC	<i>Pasteurella multocida</i>	P.m. ToxA (PMTox)	213	Kamp ve ark. (1996)
TTC ACA TCT TCA TCC TC TTT TCA TCC TCT TCG TC	<i>Pasteurella (Mannheimia) haemolytica</i>	P.h. subtype specific antigen (PHSSA)	327	T.Leeb (Kişisel görüşme)

5.BULGULAR

5.1.İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada incelenen 500 adet sığır akciğer numunesi %7 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agarda 24-48 saatlik kültürü sonucunda sığır akciğerlerinden toplam 30 adet *P. multocida*, 9 adet *M. haemolytica* olmak üzere 39 (%7,8) adet *Pasteurella spp.* toplam 311 (%62,2) bakteri suşu izole ve identifiye edilirken, 189 (%37,8) örnekte herhangi bir bakteriyel etken üremedi. Sığır akciğerlerinden izole edilen % 6 *P. multocida* ve % 1,8 *M. haemolytica* pozitiflik oranları karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p=0,001$).

Çalışma süresince incelenen toplam 500 adet sığır akciğerinden izole edilen mikroorganizmalar Tablo 1'de, izole edilen *P. multocida* ve *M. haemolytica*'ların biyokimyasal özellikleri Tablo 2'te gösterilmiştir.

Tablo 1. Sığır Akciğerlerinden Tek veya Miks Enfeksiyon Halinde İzole Edilen Mikroorganizmalar

Bakteriler	n	%
<i>P. multocida</i>	30	6
<i>M. haemolytica</i>	9	1,8
<i>S. aureus</i>	36	7,2
<i>S. epidermidis</i>	18	3,6
<i>Corynebacterium spp.</i>	30	6
<i>Maya</i>	29	5,8
<i>Streptococcus spp.</i>	19	3,8
<i>E. coli</i>	13	2,6
<i>Moraxella spp</i>	1	0,2
<i>Actinobacillus lignieresi</i>	8	1,6
<i>Klebsiella spp</i>	6	1,2
<i>Pseudomonas spp</i>	10	2
<i>Proteus spp</i>	11	2,2
<i>Bacillus spp</i>	1	0,2
<i>S. aureus</i> + <i>Maya</i>	10	2
<i>S. epidermidis</i> + <i>Corynebacterium spp.</i>	5	1
<i>S. aureus</i> + <i>Corynebacterium spp.</i>	18	3,6
<i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus spp</i>	4	0,8
<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>	3	0,6
<i>Streptococcus spp</i> + <i>E. coli</i>	2	0,4
<i>Streptococcus spp</i> + <i>Corynebacterium spp.</i>	5	1
<i>E. coli</i> + <i>Maya</i>	5	1
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i>	5	1
<i>E. coli</i> + <i>S. epidermidis</i>	5	1
<i>Corynebacterium spp</i> + <i>Maya</i>	6	1,2
<i>Corynebacterium spp</i> + <i>Pseudomonas spp</i>	6	1,2
<i>Corynebacterium spp</i> + <i>Bacillus spp</i>	2	0,4
<i>Corynebacterium spp</i> + <i>E. coli</i>	3	0,6
<i>Klebsiella spp</i> + <i>S. aureus</i>	2	0,4
<i>Klebsiella spp</i> + <i>Streptococcus spp</i>	1	0,2
<i>Klebsiella spp</i> + <i>Maya</i>	1	0,2
<i>Pseudomonas spp</i> + <i>Bacillus spp</i>	1	0,2
<i>Pseudomonas spp</i> + <i>S. aureus</i>	4	0,8
<i>Maya</i> + <i>A. lignieresii</i>	1	0,2
<i>A. lignieresii</i> + <i>S. aureus</i>	1	0,2
Üreme olmayan	189	37,8
TOPLAM	500	100

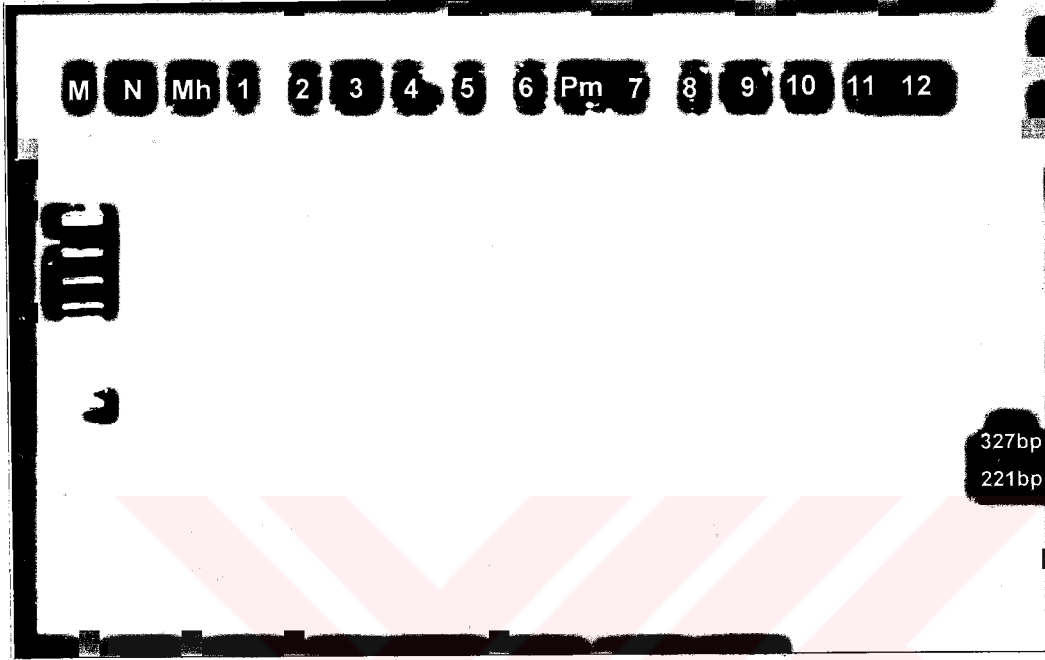
Tablo 2. *P. multocida* ve *M. haemolytica* İzolatlarının Biyokimyasal Özellikleri

Biyokimyasal Testler	<i>P. multocida</i>				<i>M. haemolytica</i>			
	pozitif		negatif		pozitif		negatif	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Katalaz	30	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0
Oksidaz	30	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0
Hareket	0	0,0	30	100,0	0	0,0	9	100,0
H ₂ S	0	0,0	30	100,0	0	0,0	9	100,0
İndol	30	100,0	0	0,0	0	0,0	9	100,0
Metil Red (MR)	0	0,0	30	100,0	0	0,0	9	0,0
Voges Proskauer(VP)	0	0,0	30	100,0	0	0,0	9	0,0
Beta-hemoliz	0	0,0	30	100,0	9	100,0	0	0,0
MacConkeyde üreme	0	0,0	30	100,0	9	100,0	0	0,0
Üreaz	0	0,0	30	100,0	0	0,0	9	0,0
Karbonhidratlardan Gaz teşekkülü	0	0,0	30	100,0	0	0,0	9	100,0
Glukoz	30	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0
Laktoz	0	0,0	30	100,0	9	100,0	0	0,0
Sukroz	30	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0
Maltoz	0	0,0	30	100,0	9	100,0	0	0,0
Mannitol	30	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0
Trehaloz	0	0,0	30	100,0	0	100,0	9	100,0
Arabinoz	30	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0
Ksiloz	30	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0
Salisin	0	0,0	30	100,0	0	100,0	9	100,0
Nitrat Redüksiyonu	30	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0

5.2.PZR Bulguları

DNA izolasyonu aşamasında kullanılan iki metottan birincisi olan zirkonyum boncukları ile muamele metodunda, referans kültürle yapılan PZR denemelerinde elde edilen sonuçlarda süreklilik gözlenmedi. K- tamponu metodunda ise, her denemede başarılı sonuçlar elde edildi ve kültürden *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın DNA'sını ekstrakte etmek için bu metot tercih edildi.

Çalışmada, Elazığ'daki mezbahadan toplanan 500 adet sığır akciğer örneklerinin kanlı agarda üreyen *P. multocida* ve *M. haemolytica* şüpheli kolonilerinden izole edilen sığırlarda 30 (%6) *P. multocida* ve 9 (%1,8) *M. haemolytica* suşlarının DNA'larının PZR'de amplifiye edilmesi ve agaroz jelde elektroforeze tabi tutulması neticesinde 221 bp ve 327 bp uzunluğunda pozitif bantlar elde edildi. Ancak 213 bp uzunluğunda bant elde edilmedi. Böylece sığır akciğerlerinden izole edilen toplam 30 *P. multocida* suşunun hiçbirinde PZR'de toksin geni tespit edilmedi.



Şekil 2. Sığır akciğerlerinden izole edilen *P. multocida* ve *M. haemolytica*'dan elde edilen DNA'ların PZR'de analizi sonucu oluşan sırasıyla, 221 bp ve 327 bp uzunluğundaki bantları gösteren ethidium bromide ile boyanmış %1,5'lük bir agaroz jel. M: DNA ladder, N: Negatif kontrol, Mh: *M. haemolytica*'nın pozitif kontrol, 1,2,3,4,5,6: Pozitif *M. haemolytica* kültür örnekleri, Pm: *P. multocida*'nın pozitif kontrolü, 7, 8, 9, 10, 11, 12: Pozitif *P. multocida* kültür örnekleri.

5.3. Fare İnokülasyon Test Bulguları

Sığır akciğerlerinden izole edilen toplam 30 *P. multocida* suşunun farelere intraperitoneal olarak enjeksiyonları sonucunda, sırasıyla 24 tanesi 2 gün içerisinde öldü. Ölen farelerin visseral organlarından sürme preparat hazırlanarak Gram negatif ve Giemsa boyası ile boyandı ve mikroskopik inceleme sonucu Gram negatif ve bipolar görülen etkenler *Pasteurella* olarak değerlendirildi ve bu toplam 24 suşun fareler için patojen olduğu belirlendi. Farelerden 6 tanesi 15 gün içerisinde ölmediği için etil alkol ile öldürülerek otopsis yapıldı ve *P. multocida* identifiye edilemedi.



6.TARTIŞMA VE SONUÇ

Pnömoniler ülkemizde ve bütün dünyada her yaştaki hayvanlarda yaygın olarak görülen ve etiyojisi kompleks bir hastalıktır (175). Hastalığın Kuzey Amerika'daki sığırların en az %1'ini öldürdüğü ve bu hayvanların en az %10'unda morbidite, kilo kaybı ve performans kaybından sorumlu olduğu bildirilmiştir (86, 115). Pnömonilerin risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan epidemiyolojik çalışmalar yetersizdir (49, 77). Ülkemizde sığır pnömonileri konusundaki araştırmalar bakteri izolasyonu, identifikasyonu ve izole edilen bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının tespitinden ileri gitmemektedir. Bu çalışma, sığır akciğerlerinde bulunan bakteriyel etkenleri belirlemek, bu etkenlerin içinden *Pasteurella*'ların bulunma sıklığını tespit etmek ve *Pasteurella*'ları bakteriyolojik yöntemler yanı sıra moleküler biyoloji tekniklerinden biri olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile tespit etmek amacı ile gerçekleştirildi.

Sığır solunum sistemi hastalık kompleksinde, Pnömonik Pastörellozis, patolojik olarak fibrinöz plöropnömoni ile karakterize olup, özellikle süttan kesilmiş buzağılarda ve 1 yaşın altındaki danalarda ölümcül seyretmektedir (68, 173). Sığır pnömonilerinde yapılan mikrobiyolojik incelemelerde birçok etken izole edilmiştir. Hastalığın oluşmasında birçok faktör etkili ise de, özellikle *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* hastalığın şiddetlenmesine ve bazen ölümcül seyretmesine sebep olmaktadır (66, 173).

Dünyanın değişik bölgelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda sığırlarda pnömoni oranının %6,1-40 arasında değiştiği bildirilmiştir (4, 29). Omar (1966), İngiltere'de yaptığı bir araştırmada 3667 danadan 342 (%9,5)'sinin

pnömoniden öldüğünü, Rosenquist ve Dobson (1974), 178 danadan 12 (%6,74)'sinin akut solunum yolu hastalığı semptomları gösterdiğini, Filippo ve ark (1987) ise, 19 ayrı sürüdeki toplam 1341 dana ve buzağının 118 (%8,79)'inde pnömoni tespit ettiklerini bildirmişlerdir (127, 134, 147). Bu çalışmada, sığırlarda pnömoni prevalansı %6,1 olarak tespit edilmiştir. Belirlenen oranın diğerlerinden düşük olduğu gözlenmiş ve ayrıca genel olarak hastalığın bazı ülkelere oranla ülkemizdeki oranının daha düşük olduğu dikkati çekmiştir.

Sığır pnömonilerinin yayılışı genel olarak ülkeler ve bölgeler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar coğrafi şartlara, hayvanların yaşına, cinsiyetine, ırklarına, bireysel dirençlerine, beslenme durumu ve buldukları yerin hijyenik şartlarının farklılığına bağlıdır. Pnömoni oranını %65,83'lere kadar bildiren araştırmacılar (84) olmakla birlikte, çok sayıda materyal kullanılarak yapılan çalışmalarda (4, 128, 129, 147) bu oranın %5 ile %9,5 arasında değiştiği dikkat çekmektedir. Oranın yüksek (%40) çıktığı çalışmada materyal sayısı genellikle düşük olup, araştırmalar sadece belirli sayıda hayvan popülasyonu üzerinde gerçekleştirilmiştir (29, 84, 160). Ayrıca bu sınırlı sayıdaki gruplarda, hayvanların genel olarak sağlıklı olması veya bulaşıcı bir hastalık etkisi altında bulunması gibi nedenlerle de oran olduğundan daha düşük veya daha yüksek çıkabilir. Genel olarak pazarlama ve yetiştirmede kullanılan metotlar da hastalığın şiddetine katkıda bulunabilir ve hayvanları hastalığa karşı duyarlı hale getirebilir. Yine pnömonilerin sıkça görüldüğü İngiltere, Kuzey Amerika, Kanada gibi ülkelerde iklimin hastalıkta önemli rol oynadığı ve özellikle pnömoni oranının yüksek oranda bulunduğu İngiltere gibi ılıman ve nemli iklime sahip ülkelerde ruminantların önemli bir problemi olarak kendini göstermektedir.

Sığırlarda pnömoni oranının aylara ve mevsimlere göre dağılımını belirlemek amacıyla yapılan bir epidemiyolojik çalışmada pnömoni oranı yaz döneminde %16, yağışlı aylarda %21,7 ve kış döneminde de %23 olarak tespit edilmiştir (113). Aynı çalışmada, en yüksek oranın (%27,7) Kasım ayında ve en düşük oranın (%13,9) da Haziran ayında olduğu tespit edilmiş ve pnömoni oranının ortalama olarak %20,1 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışma sığırlarda pnömoni oranının mevsimlere göre önemli ölçüde değişebileceğini ve kış aylarında daha yüksek bir oran ile seyrettiğini saptamıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da sığırlardaki pnömoni oranları birbirinden oldukça farklı bulunmuştur. Özer (1987), yaptığı bir çalışmada Elazığ Et ve Balık kurumu kombinasında kesilen besi danalarının akciğerlerini incelemiş ve 6121 dananın 220 (%3,6)'sinde pnömoni tespit etmiştir (129). Yine Bursa yöresinde yapılan bir çalışmada Aytuğ ve ark. (1992) ise, kullanılan 147 buzağının 25 (%17)'inde klinik olarak pnömoni saptamışlardır (13). Çalışmada aşılamanın pnömoni oranını düşürdüğü sonucuna varılmış fakat patolojik bulgulara yer verilmemiştir.

Bu çalışmada tespit edilen pnömoni prevalansı (%6,1) ile bölgemizde daha önce yapılan çalışmada rapor edilen oran (%20,3) (131), arasında önemli bir farklılığın bulunmasında hayvanların yaşı, ırkı, iklim koşulları, beslenme, barınak koşulları, cinsiyet, sıklık, taşıma mesafesi ile hayvanların orijinleri gibi faktörler etkili olmaktadır.

Sığırlarda *Pasteurella* türleri akut pnömoni olgularından en sık izole edilen bakterilerdir. Kronik pnömoniler akut pnömonilerin bir komplikasyonu olarak kabul edilmekte olup, bu tip pnömonilerden *Pasteurella* dışındaki bakterilerde

(*Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *E. coli* vb.) izole edilebilmektedir (116). Pnömonili sığır akciğerlerinden %3 *M. haemolytica* ve %6 *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (89). Diğer araştırmacılar pnömonili buzağuların akciğerlerinden %73 *M. haemolytica* ile %15,8 *P. multocida* izole etmişler ve bu iki türün izolasyon oranları arasında önemli bir fark gözlendiklerini bildirmişlerdir (6). Trakya ve Marmara bölgesinde, pnömonili buzağı akciğerlerinden bakteriyolojik inceleme sonucu %70 *M. haemolytica*, %4,3 *S. pneumonia*, %30 *E. coli*, %30 *C. pyogenes*, %11,5 *S. aureus* ve %3 *Mycoplasma bovis* izole edilmiştir (58). Erzurum'da pnömonili sığır akciğerlerinden %4,5 *P. multocida* ve %5,9 *M. haemolytica* izole edilmiş ve *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın izolasyon oranları arasında belirgin bir fark olmadığı belirtilmiştir (52). Araştırmacı *P. multocida*'nın izolasyon oranının düşük olmasını kaba yem ağırlıklı besleme yapıldığı için yem değişikliği stresinin çok fazla olmaması ve iklim koşullarının özellikle *P. multocida* için fazla uygun olmamasına bağlamıştır. Bu çalışmada sığır akciğerlerinden %6 *P. multocida* ve %1,8 oranında *M. haemolytica* izole edilmiş ve iki etken oranları karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p=0,001$). Bu sonuçlar Türkiye'de Gündüz ve Erganiş tarafından bir mezbahadan alınarak Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne getirilen ve hastalık sebebiyle ölen ya da kesilen buzağı ve danalardan alınan örneklerde gerçekleştirilen araştırmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir (83). Araştırmacılar inceledikleri akciğer örneklerinden benzer şekilde *P. multocida*'nın %15,9, *M. haemolytica*'dan %14,1 daha yüksek oranda izole ettiklerini bildirmişlerdir. *P. multocida* izolasyon oranının *M. haemolytica*'dan daha yüksek bulunması, bu bakterinin sığır pnömonilerindeki

rolünün önemli olduğunu, ayrıca iklim koşullarının özellikle *P. multocida* için fazla uygun olmasına bağlanabilir.

Araştırma süresince incelenen sığır akciğerlerinden *Pasteurella* türleri dışında, %7,2 *S. aureus*, %3,6 *S. epidermidis*, %6 *Corynebacterium spp*, %3,8 *Streptococcus spp*, %2,2 *Bacillus spp*, %5,8 *Maya*, %2,6 *E. coli*, %0,2 *Moraxella spp*, %1,6 *Actinobacillus spp*, %1,2 *Klebsiella spp*, %2 *Pseudomonas spp* ve %0,2 *Proteus spp* tespit edilmiştir. Bu durum bölgede görülen subklinik pnömonilerin bakteriyel etiolojisinin miks enfeksiyon karakterde olmasına bağlanabilir. Konya'da, yapılan çalışmada pnömonili sığır akciğerlerinden *Pasteurella* türleri dışında, %12,1 *E. coli*, %11,2 *Corynebacterium spp*, %10,2 *Staphylococcus spp*, %8,9 *Streptococcus spp*, %3,5 *Klebsiella spp* ve %2,3 *Pseudomonas spp* tespit edilmiştir (83). Bir çalışmada %4,3 *S. pneumonia*, %30 *E. coli*, %30 *Corynebacterium pyogenes*, %11,5 *S. aureus* ve %3 *Mycoplasma bovis*'in (58) ve başka bir çalışmada %6 *Streptococcus spp*, %3 *Pseudomonas spp*'nin izole edildiği bildirilmektedir (78).

Sığır pnömonileri konusunda yapılan diğer araştırmalarda olduğu gibi, bu çalışma ile de hastalığın etiolojisinde, çeşitli bakterilerin rol oynadığı ortaya konulmuştur. Her ne kadar bakteriyel etken olarak, *Pasteurella* türlerinin yaygın olarak bulunması, bu bakterilerin pnömonilerde önemli bir role sahip olduklarını işaret etse de pnömonilerin ortaya çıkışını birçok faktörün etkilemesi nedeniyle, bu konu hakkında kesin bir yargıya varılmasını zorlaştırmaktadır.

Pastörellozun teşhisi kültür, serolojik testler ve fare inokülasyon testi ile yapılmaktadır. Fare inokülasyon testi masraflı ve pratik olmadığı için rutin yada

geniş ölçekli epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilmez (161). Serolojik testlerde ise kros reaksiyonlar meydana gelmektedir (59).

Pnömonili sığır akciğerlerinden %4,5 oranında izole edilen *P. multocida* suşunun farelere intraperitoneal olarak verildiği bir çalışmada, farelerin %80'inin iki gün içerisinde öldüğü ve bunların dokularından *P. multocida* izole edildiği ve %20'sinde ise *P. multocida* identifiye edilemediğinden negatif kabul edilmiştir (52). Bu çalışmada ise, fare inokulasyon testi, sığırlarda kültür ile pozitif 30 *P. multocida* suşundan 24 (%80)'ünde pozitif ve 6 (%20)'sında negatif olarak tespit edilmiştir.

Son yıllarda, biyomedikal araştırmalar yanısıra enfeksiyöz hastahkların teşhisinde, epidemiyoloji, genetik defektlerin saptanmasında, adli tıp ve diğer alanlarda da geniş bir uygulama alanı bulan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği kullanılmaktadır (11). PZR testi klinik örneklerden ya da az miktarda üretilmiş bakterilerden direk olarak mikroorganizmaların saptanmasını sağlar (161). Böylece, bakteriyel identifikasyon için gerekli süreyi azaltır ve sensitiviteyi artırır. Ayrıca, spesifik primerlerin kullanılması özellikle suş, tür ve cins tayininde faydalı olmuştur (140).

Bu çalışma, sığır akciğerlerinde *Pasteurella*'ların PZR ile identifikasyonuna yönelik araştırma bulunamadığından çalışma bulguları diğer hayvan türlerinden elde edilmiş *Pasteurella*'ların PZR çalışmaları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada *P. multocida*'nın OMP geninden, *P. multocida* tox A geninden, *M. haemolytica* subtip spesifik antijen geninden hazırlanan primer çiftlerinin kullanılması ile farklı bakterilerin yanlış pozitif reaksiyon vermesi önlenmiştir. Ayrıca, subtip spesifik antijen geninden hazırlanan primerlerin

kullanıldığı PZR ile *M. haemolytica*'nın tespit edilmesi hakkında herhangi bir çalışma bulunmadığından dolayı burada sadece *P. multocida* ve toksijenik *P. multocida* konusunda yapılan çalışmalardan bahsedilmiştir.

Çalışmada, kültür ile pozitif *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşları PZR ile de pozitif bulunmuştur. PZR ile, toksijenik *P. multocida* ile enfekte olduğu bilinen domuzlardan alınan nasal ve tonsiller swab örneklerinin diğer serolojik teşhis metotlarından (ELISA (%8,1) ve kültür (%6,4) daha fazla pozitif (%11,6) sonuç elde edilmiştir (94). Ayrıca, toksijenik *P. multocida* izole edilen bütün örneklerin PZR testinde pozitif olduğu bildirilmiştir. Böylece PZR testinin kullanılan 3 metottan daha fazla sensitif ve spesifik olduğu vurgulanmıştır. Pnömonili köpek akciğerlerinden *P. multocida* ve toksijenik *P. multocida*'nın multipleks PZR ve kültür metotları ile tespit edildiği bir çalışmada, kültür ile pozitif *P. multocida* suşları PZR ile de pozitif bulunmuş ve PZR'nin kültürden daha çabuk ve spesifik olduğu belirtilmiştir (124). Domuzların tonsillerinden toplanan swab örneklerinden *P. multocida*'nın izolasyonunda direkt kültür, fare inokulasyonu ve PZR testi kullanılmış ve PZR ile örneklerin %44,4'ünde *P. multocida* pozitif ve bütün örnekler *P. multocida* toksini (PMT) yönünden negatif olarak test edilmiştir (162). Fare inokulasyonu ile örneklerin %22,2'si, direkt kültür ile %25'i, her iki izolasyon metodu ile %11,1'i pozitif bulunmuştur. Böylece, *P. multocida*'nın tespit edilmesinde direkt kültürün fare inokulasyonu veya PZR testinden daha az sensitif olduğu tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar bazı izolatların farelerde patojenik olmadığı için PZR'nin *P. multocida*'nın tespitinde başarılı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Toksijenik *P. multocida*'nın saptanmasında Kamp ve ark. (1996) tarafından tanımlanan toxA geninden hazırlanan primerlerin kullanıldığı PZR testinin diğerleri tarafından (Lichtensteiger ve ark., 1996; Hotzel ve ark., 1997) tanımlanan PZR testlerinden (88, 94, 105) daha sensitif ve etkili bir metot olduğu için bu çalışmada, Kamp ve ark. (1996) tarafından tanımlanan PZR kullanılmıştır (94). Çalışmada, sığır akciğerlerinden elde edilen *P. multocida* suşlarının hiçbirinde toksin geni tespit edilememiştir. Böylece toksin oluşturan *P. multocida*'nın çalışmada incelenen pnömonili sığır akciğerlerinde bulunmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, ülkemizde bu konuda yapılmış sınırlı sayıdaki araştırmalara (52, 83, 128, 129, 131) rağmen yeterince bilgi bulunmadığından, sığır akciğerlerinden bakteri izolasyon ve identifikasyonunu konu alan geniş çaplı böyle bir araştırmaya ihtiyaç duyulmuş ve Türkiye'de ilk defa *Pasteurella*'lar son yıllarda geliştirilmiş bir metot olan ve genetik materyalin (DNA) in vitro olarak çok kısa süre içerisinde (2-3 saat) milyonlarca defa çoğaltılması esasına dayanan PZR ile teşhisine yönelik olarak yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışmada hiç bir hastalık belirtisi olmadan sadece kesim için gelen besi sığırlarında %6,1 gibi bir oranda pnömoninin görülmesi hazırlayıcı sebeplerin başında gelen besi şartlarının genelde iyi olmadığına işaret etmektedir. Gerekli koruyucu önlemlerin alınması, bakım ve besleme şartlarının iyileştirilmesi ve zamanında müdahale edilmesi, besicilikteki problemlerden birisi olan pnömonilerin neden olduğu önemli ekonomik kayıpları önleyecektir.

Yine bu çalışmada, pnömoniye neden olan bakteriyel etkenlerden biri olan *Pasteurella*'ların bakteriyolojik yöntemler yanısıra, moleküler biyoloji

metotlarından biri olan PZR ile de identifiye edilebileceği ortaya konmuş ve Pastörelloz'un teşhisinde kültüre alternatif olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

1. Abramson J H. (1994). Making sense of data. Oxford University Press, Second Edition, Newyork. 176-179.
2. Ackermann M R. and Brogden K A. (2000). Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Microbes and Infection*. 2: 1079-1088.
3. Adlam C. (1989). The structure function and properties of cellular and extracellular components of *Pasteurella haemolytica*. *Pasteurella and Pasteurellosis*. In (Editör) C Adlam and JM Rutter. Academic Press, Pp 75-92.
4. Alexander B H, Mac Vean D W. and Salman M D. (1989). Risk factors for lower respiratory tract disease in a cohort of feedlot cattle. *JAVMA*. 195 (2): 207-211.
5. Alibaşoğlu M. ve Yeşildere T. (1988). Solunum sistemi. "Veteriner Sistemik Patoloji". Cilt I, Kardeşler Basımevi, İstanbul. 207-262.
6. Allan E M, Wiseman A, Gibbs H A. and Selman I E. (1985). *Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns. *Vet Rec*. 117: 629-31.
7. Ames T R, Markbam R J F, Opuda-Asibo J, Leininger J R. and Maheswaran S K. (1985). Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Can J Comp Med*. 49: 395-400.
8. Angen Ø, Mutters R, Cougant D A, Olsen J E. and Bisgaard M. (1997). Genotyping relationships among strains classified under the *Pasteurella haemolytica* complex as indicated by ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis. *Zbl Bakt*. 286: 333-354.
9. Angen Ø, Mutters R, Cougant DA, Olsen JE. and Bisgaard M. (1999). Taxonomic relationships of the *Pasteurella haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov. comb. nov, *Mannheimia granulomatis* comb. nov, *Mannheimia glucosida* sp. nov, *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 49: 67-86.
10. Angen Ø, Quirie M, Donachie W. and Bisgaard M. (1999). Investigations on the species specificity of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol*. 65: 283-290.
11. Arda M. (1994). *Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler)*. No: 2. KÜKEM Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara. Pp:176-192.

12. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M. ve Diker K S. (1999). "Fakültatif Anaerobik Gram Negatif Çomaklar" Özel Mikrobiyoloji. Aydın N (Editör). No. 26, Medisan Yayın Serisi, Ankara. Pp:64.
13. Aytuğ N, Tavukçuoğlu F. ve Çöven F. (1992). Bursa yöresindeki enzootik buzağlarında PI-3 virusunun insidensi ve aşılamanın klinik pnömonilerin önlenmesindeki etkinliği üzerine bir araştırma. Pendik Hayv Hst Merk Araşt Enst Derg 23 (1): 51-57.
14. Balayut C S, Simonson R R. and Bemrick W J et al. (1981). Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. Am J Vet Res. 42: 1920-1926.
15. Benson M L, Thomson R G, Valli VEO. (1978). The bovine alveolar macrophage II: In vitro studies with *Pasteurella haemolytica*. Can J Comp Med. 42: 368-369.
16. Bercovier H. and Molaret H H. (1984). Genus XIV *Yersinia* In "Bergeys Manual of Systematic Bacteriology". (Editör) Krieg N R. and Holt J G. Vol I, Williams and Wilkins, Baltimore. Pp: 503-506.
17. Biberstein E L, Gills M. and Knight H. (1960). Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell Vet. 50: 283-300.
18. Biberstein E L. and Gills M G. (1962). The relation of the antigenic types to the A and T types of *Pasteurella haemolytica*. J Comp Path. 72: 316-320.
19. Biberstein E L. (1978). Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In "Methods in Microbiology". (Editör) T Bergan and RJ Norris. Academic Press, London. 253-267.
20. Bilgehan H. (1995). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir.
21. Bingham D P, Moore R. and Richards A B. (1990). Comparison of DNA/DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella hemolytica* and related species. Am J Vet Res. 51(8):1161-1165.
22. Bisgaard M, Frederiksen W, Mannheim W. and Mutters R. (1994). Zoonoses caused by organisms classified with *Pasteurellaceae*. In Handbook of Zoonoses, 2nd (Editör) CRC Press, Boca Raton. 203-208.
23. Blackall P J. and Miflin J K. (2000). Identification and typing *Pasteurella multocida* : A review. Avian Pathology. 29: 271-287.
24. Brogden K A, Rhoades K R. and Heddleston K L. (1978). A new serotype of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. Avian Diseases. 22: 185-190.

25. Brogden K A, Lehmkuh I H D. and Cutlip R C. (1998). *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. *Vet Res.* 29 (3-4): 233-254.
26. Bowland S L. and Shewen P E. (2000). Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J.* 41: 33-48.
27. Boyce J D. and Adler B. (2000). The Capsule Is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect and Immun.* 68(6): 3463-3468.
28. Burrill T J. (1883). New species of *Micrococcus*. *Amer Naturalist.* 17: 319-320.
29. Caldow G L, Edwards S, Nixon P. and Peters A R. (1988). Associations between viral infection and respiratory disease in young beef bulls. *Vet Record.* 122: 529-531.
30. Carter G R. (1984). Genus I *Pasteurella* In "Bergeys Manual of Systematic Bacteriology". (Editör) Krieg N R. and Holt J G. Vol I, Williams and Wilkins, Baltimore. Pp: 553-556.
31. Carter G R. and Alwis M C L. (1989). Haemorrhagic septicaemia in "Pasteurella and Pasteurellosis". (Editör) Adlam C. and Rutter J M. Academic Press Inc, New York. Pp: 131-160.
32. Castleman W L, Lay J C, Dubovi E J. and Slauson D O. (1985). Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves. light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavaged lung cells. *Am J Vet Res.* 46 (3): 547-553.
33. Chang Y F. (1984). *Pasteurella haemolytica* exotoxin: chemical , biological and immunological characterization of a leukotoxin produced by *Pasteurella haemolytica*, dissertation abstracts international. 45 (5): 1334-1335.
34. Chang Y F, Renshaw H W. and Augustine J L. (1985). Bovine pneumonic pasteurellosis: chemiluminescent response of bovine peripheral blood leukocytes to living and killed *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Escherichia coli*. *Am J Vet Res.* 46 (11): 2266-2271.
35. Chaslus-Dancla E, Lesage-Descauses M C, Leroy Setrin S, Martel J L, Coudert P. and Lafont J P. (1996). Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. 52: 91-102.
36. Christensen J P. and Bisgaard M. (1997). Avian Pasteurellosis: taxonomy of the organisms Involved and aspects of pathogenesis. *Avian Pathology.* 26: 461-483.
37. Christensen J P. and Bisgaard M. (2000). Fowl cholera. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 19 (2): 626-637.

38. Clinkenbeard K D, Mosier D A. and Timko Al. et al. (1989). Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on cultured bovine lymphoma cells. *Am J Vet Res.* 50: 271-275.
39. Cohen N D, McGrudder E D, Neibergs H L, Bhele R W, Waillis D. and Hargis B M. (1994). Detection of *Salmonella enteritidis* faeces from poultry using booster polymerase chain reaction oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. *Poult Sci.* 73: 354-357.
40. Collins J K, Jensen R, Smith G H, Flack D E, Kerschen R, Bennett B W, Jones R L. and Alexander A F. (1988). Association of bovine respiratory syncytial virus with atypical interstitial pneumonia in feedlot cattle. *Am J Vet Res* 49 (7): 1045-1049.
41. Confer A W, Panciera R J, Fulton R W, Gentry M J. and Rummage J A. (1985). Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica* on resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Am J Vet Res.* 46 (2): 342-347.
42. Confer A W, Panciera R J. and Mosier D A. (1988). Bovine pneumonic pasteurellosis: Immunity to *Pasteurella haemolytica*. *J Am Vet Med Assoc.* 193 (10): 1308-1316.
43. Confer A W, Simons K R, Panciera R J, Mort A J. and Mosier D A. (1989). Serum antibody response to carbohydrate antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: Relation to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Am J Vet Res.* 50: 98-104.
44. Confer A W. (1993). *Pasteurella immunogens*. *Vet Microbiol.* 37: 353-368.
45. Confer A W, McCraw R D, Durham J A, Morton R J. and Panciera R J. (1995). Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet Immunol. Immunopathol.* 47 (1-2): 101-110.
46. Czuprynski C J, Hamilton H L. and Noel E J. (1987). Ingestion and killing of *Pasteurella haemolytica* A1 by bovine neutrophils in vitro. *Vet. Microbiol.* 14: 61-74.
47. Czuprynski C J, Noel E J, Carranza O. and Srikumaron S. (1991). Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infection and Immunity.* 59 (9): 3126-3133.
48. Çetinkaya B. (1998). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temel prensipleri. *F Ü Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12: 149-156.
49. Davies D H. (1985). Aetiology of pneumonia of young sheep. *Preg Vet Microbiol Immun.* 1: 229-248.

50. Davies R L, McCluskey H A, Gibbs J G, Coote J H, Freer J H. and Parton R. (1994). Comparison of outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* expressed in vitro and in vivo in cattle. *Microbiol.* 140: 3298-3300.
51. Dawson P S, Stuart P, Darbyshire J H, Parker W H. and McCrea C T. (1966). Respiratory disease in a group of intensively reared calves. *Vet Record.* 78 (16): 543-546.
52. Dinler U. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinde *Pasteurella multocida*'nın izolasyon ve identifikasyonu. (Uzmanlık Tezi), Ankara.
53. Donachie W, Fraser J, Quire M. and Gilmour N J L. (1984). Studies on strains of *Pasteurella haemolytica* not typable by the indirect hemagglutination test. *Res Vet Sci.* 37: 188-193.
54. Dunbar M R, Ward A C S, Eyre K G. and Bulgin M. (1990). Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in free ranging rocky mountain bighorn sheep. *Bienn Symp North Wild Sheep and Goat Counc.* 7: 102-108.
55. Dungworth D L. (1985). The Respiratory system. In "Pathology of Domestic Animals" (Editör) K V F Jubb, P C Kennedy. and N Palmer. Vol 2, 3rd ed, Academic Press, London. 413-556.
56. Dyer R M. (1982). The Bovine respiratory disease complex: A complex interaction of host, environment and infectious factors. *Compend Contin Educ.* 4: S296-S304.
57. Edington N. and Jacobs J W. (1970). Respiratory syncytial virus in cattle. *Vet Record.* 87: 762.
58. Erdağ O, Erdoğan İ, Türkaslan J. ve Gürel A. (1993). Buzağı ve dana pnömonilerinde mikoplazma ve bakteriyel etkenlerin izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Pendik Vet Microbiol Derg.* 24 (2): 143-148.
59. Fillion L G, Cho H J, Shewen P E, Raybould T J G. and Wilkie B N. (1985). Comparison of serological techniques to measure antibody to *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Comp Med.* 49: 99-103.
60. Fodor J, Varga J, Hajtos I. and Szemerédi G Y. (1984). Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep, goats and calves. *Zbl Vet Med. B,* 31: 466-469.
61. Fodor L. and Varga J. (1988). Characterization of a new serotype of *Pasteurella haemolytica* isolated in Hungary. *Res Vet Sci.* 44, 399.
62. Fodor L, Penzes Z. and Varga J. (1996). Coagglutination test for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol.* 34 (2): 393-397.
63. Fodor L, Varga J, Hajtos I. and Molnar T. (1999). Serotypes of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* isolated from farm animals in Hungary. *J Vet Med.* 46: 241-247.

64. Fodor L, Reeve-Johnson L, Hodge A. and Varga J. (2000). Efficacy evaluations of the use of oral tilmicosin in pneumonic calves. *The Vet Journal*. 159: 194-200.
65. Frank G H. and Tabatabai L B. (1981). Neuraminidase activity of *Pasteurella haemolytica* isolates. *Infect Immun*. 32: 1119-1122.
66. Frank G H. (1986). The Role of *Pasteurella haemolytica* in the bovine respiratory disease complex. *Vet Med*. 12: 841-846.
67. Frank G H. (1988). When *Pasteurella haemolytica* colonizes the nasal passages of cattle. *Vet Med*. Symposium on *Pasteurella haemolytica*, Oct.
68. Frank G H. (1989). Pasteurellosis of cattle. In "Pasteurella and Pasteurellosis" (Editör) Adlam C. and Rutter J M. Academic Press Inc. New York. Pp: 197-222.
69. Frank G H, Briggs R E. and DeBey B M. (1993). Bovine tonsils as reservoirs for *Pasteurella haemolytica*: colonization, immune response and infection of the nasopharynx. *Proceedings Aust Cente Int Agric Res*. 43: 83-88.
70. Fraser J, Laird S. And Gilmour N J L. (1982). A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci*. 32: 127-128.
71. Frederiksen W. (1973). *Pasteurella* taxonomy and nomenclature. *Contrib Microbiol Immun*. 2: 170-176.
72. Frederiksen W. (1989). Pasteurellosis of man In "Pasteurella and Pasteurellosis". (Editör) Adlam C. and Rutter J M. Academic Press Inc. New York. Pp: 303-320.
73. Gerardo S H, Citron D M, Claros M C, Fernandez H T. and Goldstem E J C. (2001). *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and glucosidase activity. *J Clin Microbiol*. 39 (7): 2558-2564.
74. Gibbs H A, Allan E M, Wiseman A. et al. (1984). Experimental production of bovine pneumonic pasteurellosis. *Res Vet Sci*. 37: 154-166.
75. Gilka F, Thomson R G. and Savan M. (1974). Microscopic findings in the lungs of calves aerosolized with *Pasteurella haemolytica* and treated to alter pulmonary clearance. *Zbl Vet Med*. B,21: 774-786.
76. Gilmour N J L, Thompson D A. and Fraser J. (1974). The Recovery of *Pasteurella haemolytica* from the tonsils of adult sheep. *Res Vet Sci*. 17: 413-414.
77. Gilmour N J L. and Angus K W. (1983). Pasteurellosis In "Disease of sheep" (Editör) Martin W B. Blackwell Scientific Publication. London. Pp:3-8.
78. Girgin H, Nedret A, Canbazoğlu M. ve Aksoy E. (1989). İç Anadolu Bölgesinde Buzağı Pnömonisinde Rol Oynayan Bakteriler ile Bunların Meydana Getirdiği Lezyonların Patolojik Özellikleri. 1.Uluslararası Önemli Buzağı Hastalıkları Sempozyumu. Etlik-Ankara.

79. Gonzales C T. and Maheswaran S K. (1993). The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: Review and hypothesis. *Br Vet J.* 149 (2): 183-193.
80. Gourlay R N, Thomas L H. and Wyld S G. (1989a). Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Vet Rec.* 124 (16): 420-422.
81. Gourlay R N, Thomas L H. and Wyld S G. (1989b). Experimental *P. multocida* pneumonia in calves. *Res Vet Sci.* 47: 185-189.
82. Grey C L. and Thomson R G. (1971). *Pasteurella haemolytica* in the tracheal air of calves. *Can J Comp Med.* 35: 121-128.
83. Gündüz K. ve Erganiş O. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinden izole edilen *Pasteurella haemolytica* suşlarının biyotiplendirilmesi ve serotiplendirilmesi. *Veterinarium.* 9 (1): 11-19.
84. Haritani M, Nakazawa M, Hashimoto K, Narita M, Tagawa I. and Nakagawa M. (1990). Immunoperoxidase evaluation of the relationship between necrotic lesions and causative bacteria in lungs of calves with naturally acquired pneumonia. *Am J Vet Res.* 51 (12): 1975-1979.
85. Hazıroğlu R, Erdeger J, Gulbahar M Y. and Kul O. (1997). Association of *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* with pneumonia in calves. *Dtsch Tierarztl Wschr.* 104: 125-164.
86. Highlander S K. (2001). Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Frontiers in Bioscience.* 6: d1128-1150.
87. Hormansdorfer S. and Bauer J. (1996). Resistance of bovine and porcine *Pasteurella* to florfenicol and other antibiotics. *Berl Munch Tieraazt Wochenschr.* 111: 422-426.
88. Hotzel H, Erler W. and Schimmel D. (1997). Detection of dermonecrotic toxin gene in *Pasteurella multocida* strains using polymerase chain reaction. *Berl Munch Tierarztl Woch.* 110: 139-142.
89. Houghton S B. and Gourlay R N. (1984). Bacteria associated with calf pneumonia and their effect on gnotobiotic calves. *Res Vet Sci.* 37: 194-198.
90. Hunt M L, Carmel Ruffolo C G, Rajakumar K. and Adler B. (1998). Physical and genetic map of the *Pasteurella multocida* A:1 Chromosome. *J. Bacteriol.* 180 (22): 6054-6058.
91. Hunt M L, Adler B. and Townsend K M. (2000). The Molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.* 72: 3-25.
92. Hunt M L, Boucher D J, Boyce J D. and Adler B. (2001). In vivo expressed genes of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity.* 69 (5):3004-3012
93. Jones F A. (1921). Study of *Bacillus bovisepiticus*. *J Exp Med.* 34: 561-577.

94. Kamp E M, Bokken G C A M, Vermeulen T M M, de Jong M F, Buys H E C M, Reek F H. and Smits M A A. (1996). Specific and sensitive PCR assaysuitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J Vet Diagn Invest.* 8: 304- 309.
95. Kasten R W, Carpenter T E, Snipes K P. and Hirsh D C. (1997). Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by the use of the polymerase chain reaction. *Avian Disease.* 41: 676-682.
96. Kaya O. ve Erganiş O. (1991). Koyun ve kuzu pnömonileri üzerinde etiyolojik survey. *Veterinarium.* 2 (3-4): 27-29.
97. Kaya O, Erganiş O. ve Boynukara B. (1993). Koyun, kuzu ve buzağı pnömonilerinde bakteriyel etiyoloji ve antibiyogram. *Türk Vet Hek Derg.* 5 (2): 57-60.
98. Kilian M. and Biberstein E. (1984). Genus II *Haemophilus* In "Bergeys Manual of Systematic Bacteriology". (Editör) Krieg N R. and Holt J G. Vol: I, Williams and Wilkins, Baltimore. Pp: 558-569.
99. Kehrenberg C, Schulze-Tanzi G, Martel J L, Dancla E C. and Schwarz S. (2001). Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res.* 32: 323-39.
100. Kodjo A, Villard L, Bizet C, Borges E, Maurin F, Richard Y. et al. (1999). Pulsed field gel electrophoresis is more efficient than ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. *J Clin Microbiol.* 37(2): 380-385.
101. Kuhnert P, Boerlin P, Emler S, Krawinkler M. and Frey J. (2000). Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA sequencing. *Int J Med Microbiol.* 290: 599-604.
102. Lafleur R L, Abrahamsen M S. and Maheswaran S K. (1998). The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 66: 4087-4092.
103. Lee C W, Wilkie I W, Townsend K M. and Frost A J. (2000). The Demonstration of *Pasteurella multocida* in the alimentary tract of chickens after experimental oral infection. *Vet Microbiol.* 72: 47-55.
104. Lehmann K B. and Neumann R, *Lehmann's Medizin Handatlant.* (1899). X. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik, 3. Aufl.
105. Lichtensteiger C A, Steenbergen S M, Lee R M, Polson D D. and Vimr E R. (1996). Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol.* 34: 3035-3039.

106. Li J. and Clinkenbeard K D. (1999). Lipopolisaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun.* 67: 2920-2927.
107. Lillie L E. and Thomson R G. (1972). The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice. *Can J Comp Med.* 36: 129-137.
108. Lo R Y C. (2001). Genetic analysis of virulence factors of *Manheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* A1. *Vet.Microbiol.* 83: 23-35.
109. Loubinoux J, Lozniewski A, Lion C, Garin D, Weber M. and Faour A E L. (1999). Value of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. *J Clin Microbiol.* 37(8): 2488-2492.
110. Lübke A, Hartmann L, Schröder W. and Hellmann E. (1994). Isolation and partial characterization of the major protein of the outer membrane of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Zentralblatt für Bakteriologie.* 281: 45-5.
111. Mac Vean D W, Franzen D K, Keefe T J. and Bennett B W. (1986). Airborne particle concentration and meteorologic conditions associated with pneumonia incidence in feedlot cattle. *Am J Vet Res.* 47 (12): 2676-2682.
112. Madsen E B, Bisgaard M, Mutters R. and Pedersen K B. (1985). Characterization of *Pasteurella* species isolated from lungs of calves with pneumonia. *Can J Comp Med.* 49: 63-67.
113. Maity B. and Deb P. (1991). Seasonal variation in incidence of pneumonia in cattle. *Indian J of Animal Sci.* 61(3): 261-262.
114. Markham R J F. and Wilkie B N. (1980). Interaction between *pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages: cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. *Am J Vet Res.* 41: 18-22.
115. Martin S W, Meek A H, Davis D G, Johnson J A. and Curtis R A. (1981). Factors associated with morbidity and mortality in feedlot calves: The Bruce County Beef Project, year two. *Can J Comp Med.* 45: 102-11.
116. McKercher D G. (1968). Bovine respiratory infections. *JAVMA.* 152 (6): 7729-7737.
117. Mevius D J, Breukink H J, Van-Miert A S, Kessels B G, Jobse A S. and Smit J A. (1991). Effects of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* infection in dairy calves on the pharmacokinetics of flumequine. *J Vet Pharmacol Ther.* 14: 174-184.
118. Mifflin J K. and Blackall P J. (2001). Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett in App Microbiol.* 33: 216-221.
119. Morris E J. (1958). Selective media for some *pasteurella* species. *J Gen Microbiol.* 19: 305-311.

120. Morrison D C, Ulevitch R J. (1978). The effects of bacterial endotoxin on host mediator systems. *Am J Path.* 93: 527-617.
121. Mraz O. (1969). Comparative study of species *Actinobacillus lignieresii* and *Pasteurella haemolytica*. I. *Actinobacillus lignieresii* BRUMPT, 1910, Emend. *Zentralbl Bakteriol.* 209: 212-232.
122. Muhairwa A P, Christensen J P. and Bisgaard M. (2000). Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. *Avian Pathol.* 29: 133-142.
123. Mutters R P I, Pohl S, Frederiksen W. and Mannheim W. (1985). Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol.* 35: 309-322.
124. Neumann S, Leeb T. und Brenig B. (1998). Vergleich Zwischen PCR und Kultureller Untersuchung zum Nachweis von Infektionen mit *Pasteurella multocida* beim Hund, *Kleintierpraxis.* 43: 69-74.
125. Newson I. and Cross F. (1932). Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. *J Am Vet Med Assoc.* 80: 711-719.
126. Office International des Epizooties (OIE). (1996). Fowl cholera (Avian Pasteurellosis). Chapter 3.6.11. In *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, 3rd ed: OIE, Paris. Pp: 572-577.
127. Omar A R. (1966). The Aetiology and pathology of pneumonia in calves. *The Vet Bulletin.* 36 (5): 259-272.
128. Özer H. (1985). Besi danalarında eksudative pneumonie'lerin yayılışı. *Elazığ Bölgesi Vet Hek Od Derg.* 1 (3): 63-70.
129. Özer H. (1987). Besi sığırlarında atipik interstitial pneumonie'lerin yayılışı. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg.* 1 (1-A): 27-34.
130. Öztürk F, Yavru S. ve Şimşek A. (1993). Solunum yolu enfeksiyonu gösteren danalardan virus izolasyonu. *S Ü Vet Fak Derg.* 9 (1): 46-47.
131. Öztürk G, Özcan C. ve Kalender H. (1996). Elazığ et balık kurumu mezbahasında kesilen sığırlarda rastlanan pnömonilerin patolojik ve bakteriyolojik olarak incelenmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg.* 27 (2): 163-174.
132. Panciera R J. and Corstvet R E. (1984). Bovine pneumonic pasteurellosis : Model for *Pasteurella haemolytica*- and *Pasteurella multocida*-induced pneumonia in cattle. *Am J Vet Res.* 45 (12): 2532-2537.
133. Phillips J E. (1984). Genus III *Actinobacillus* In "Bergeys Manual of Systematic Bacteriology". (Editör) Krieg N R. and Holt J G. Vol: I, Williams and Wilkins, Baltimore. Pp: 570-574.

134. Phillippo M, Arthur J R. and Halliday G J. (1987). The effects of selenium, housing and management on the incidence of pneummonia in housed calves. *Vet Record*. 121 (22): 509-512.
135. Pohl S. (1979). Reklassifizierung der Gattungen *Actinobacillus* Brumpt 1910, *Haemophilus* Winslow et al. 1917 und *Pasteurella* Trevisan 1887 Anhand Phanotypischer und Molekularer Daten, Insbesondere der DNS. Verwandtschaften bei DNS:DNS Hybridisierung in vitro und Vorschlag Einer Neuen Familie, Pasteurellaceae. Thesis, Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn.
136. Pohl S. (1981). DNA Relatedness among members of *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In: Kilian M, Frederiksen W. and Biberstein E.L. (Editör) "Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus". London, Academic Press Pp: 245-253.
137. Quinn P J, Carter M E, Markey B. and Carter G R. (1994). *Pasteurella* species. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publ, Dublin. Pp: 254-259.
138. Quirie M, Donachie W. and Gilmour N J L. (1986). Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet Rec*. 119: 93-94.
139. Radostits O M, Blood D C. and Gay C C. (1994). *Veterinary Medicine, A Textbook of the Disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. Bailliere Tindall, London.
140. Relman D A. and Persing D H. (1996). Genotypic methods for microbial identification. In Persing D H. (Editör) *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases: a Supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM Press, Washington, D C. Pp: 3-31.
141. Reynolds H Y. (1991). Immunologic system in the respiratory tract. *Physiological Reviews*. 71(4): 751-755.
142. Rimler R B. and Rhoades K R. (1989a). *Pasteurella multocida*, *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. Academic Press, London. Pp: 37-73.
143. Rimler R B. and Rhoades K R. (1989b). *Pasteurella multocida*, In Adlam C. and Rutter J M. (Editör) "Pasteurella and pasteurellosis". London, Academic Press. Pp: 95-113.
144. Rimler R B. and Glisson, J.R. (1997). Fowl cholera. In *Disease of Poultry*, 10th (Editör) Calnek B W. with Barnes H J, Beard C W, McDougald L R. and Saif Y M. Iowa State University Press, Ames. Pp: 143-161.
145. Rosenbusch C T. and Merchant I A. (1939). A study of the haemorrhagic septicaemia Pasteurellae. *J Bacteriol*. 37: 69-89.
146. Rosenquist B D, English J E, Johnson D W. and Loan R W. (1970). Mixed viral etiology of a shipping fever epizootic in cattle. *Am J Vet Res* 31 (6): 989-994.

147. Rosenquist B D. and Dobson A W. (1974). Multiple viral infection in calves with acute bovine respiratory tract disease. *Am J Vet Res.* 35 (3): 363-365.
148. Scott F W, Shively J N, Gaskin J. and Gillespie J H. (1973). Bovine syncytial virus isolations. *Archiv für die gesamte Virusforschung.* 43: 43-52.
149. Scott P R. (1994). Field study of undifferentiated respiratory disease in housed beef calves. *Vet Record.* 134 (13): 325-327.
150. Shewen P E. and Wilkie B N. (1985). Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am J Vet Res.* 46 (5) : 1212-1214.
151. Smith G R. and Phillips J E. (1990). *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In (Editör) Parker M T, Duerden B I. Topley and Wilson's. "Principles of Bacteriology" *Virology and Immunology.* Vol: 2, 8th ed: Decker B C. Inc, USA. Pp: 383-399.
152. Sneath P H A. and Johnson R. (1973). Numerical taxonomy of *Haemophilus* and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 23: 405-418.
153. Squire P H, Smiley D W. and Croskel R B. (1984). Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infection and Immunity.* 45(3): 667-673.
154. Sun Y K, Clinkenbeard K D, Clarke C R, Cudd L, Highlander S. and Dabo M. (1998). *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation. *Vet Microbiol.* 161:8- 114.
155. Şahin M. (1997). Kars yöresinde sığır pnömonilerinden mikoplazmaların izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi. *Etlik Vet Mikrob Derg.* 9(2): 71-86.
156. Tabatabai L B. and Frank G H. (1981). Neurominidase from *Pasteurella haemolytica*. *Curr Microbiol.* 5: 203-206.
157. Taede S, Gerde J B, Gamelkoorn S H. and Jeurissen M. (1989). Structure in function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit Rev Immunol.* 9(2): 119-150.
158. Tefera G. and Smola J. (2001). *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella* sensu stricto as new genus *Mannheimia*: Changes in Taxonomy. *Vet Med.-Czech.* 46 (4): 119-124.
159. Thomas E, Caldow G L, Borell D. and Davot J L. (2001). A field comparison of the efficacy and tolerance of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *Journal of Vet Pharm.* 24 (5): 353-360.
160. Thomas L H. and Swann R G. (1973). Influence of colostrum on the incidence of calf pneumonia. *Vet Record* 92: 454-455.
161. Townsend K M, Frost A J, Lee C W, Papadimitriou J M. and Dawkins H J S. (1998). Development of PCR assay for species and type-specific

- identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol.* 36 (4): 1096-1100.
162. Townsend K M, Hanh T X, Boyle D O, Wilkie I, Phan T T, Wijewardana T G, Trung N T. and Frost A J. (2000). PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. *Vet Microbiol.* 72: 69-78.
163. Trevisan V. (1887). Sul Micrococco Della Rabbia e Sulla Possibilita di Riconoscere Durante il Periode D'incubazio, Dall'esame del Sangue Della Persona Moricata, se ha Contratta l'infezione Rabbica, *Rend. 1 st. Lombardo (Ser.2).* 20.: 88-105.
164. Turgut K, Erganiş O, Başoğlu A, Çorlu M. ve Ok M. (1989). Trakeal yıkama örneğinin mikrobiyolojik muayenesi ve klinik önemi. *S Ü Vet Fak Derg.* 5 (1): 191-197.
165. Turgut K, Erganiş O. ve Başoğlu A. (1992). Therapeutic effects of enrofloxacin on pneumonic and diarrhoeic calves. *S Ü Vet Fak Derg.* 8 (1): 55-57.
166. Türker S. (1993). Cumhuriyetin 70. yılında hayvancılık endüstrisi. *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Derg.* Kasım Özel Sayı-I: 53-58.
167. Walker R D, Hopkins F M, Schultz T W, McCracken M D. and Moore R N. (1985). Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res.* 46(12): 2429-2433.
168. Wilson S H, Church T L. and Acres S D. (1985). The influence of feedlot management on an outbreak of bovine respiratory disease. *Can Vet J.* 26: 335-34.
169. Whiteley L O, Maheswaran S K, Weiss D J, Ames T R. and Kannan M S. (1992). *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. *J Vet Internal Med.* 6 (1): 11-12.
170. Wood A R, Lainson F A, Wright F, Baird G D. and Donachie W A. (1995). A native plasmid of *Pasteurella haemolytica* serotype A1: DNA sequence analysis and investigation of its potential as a vector. *Res Vet Sci.* 58: 163-168.
171. Woods D E. (1987). The role of fibronectin in the pathogenesis of gram negative pneumonia. *Rev Infect Dis.* 9 (suppl 4): 386-390.
172. Yaman D. (1991). Hayvanlarda mantarlara bağlı bronkopnömonilerde görülen histo-patolojik lezyonlar. *U Ü Vet Fak Derg.* 10 (1-2-3): 143-149.
173. Yates W D G. (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med.* 46: 225-263.

174. Younan M. and Fodor L. (1995). Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res Vet Sci.* 58:98.
175. Zamri-Saad M. (1996). Effendy A W M, Maswati M A, Salim N. and Omar A R S. The goat as a model for studies of pneumonic Pasteurellosis caused by *Pasteurella multocida*. *Br Vet J.* 152: 453-458.



8.ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladıktan sonra, 1988-1989 öğrenim yılında girdiğim Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1994 yılında mezun oldum. 1996 yılı Eylül ayında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladım. 1997 yılında Araştırma görevliliği kadrosuna atandım. Evli ve iki çocuk annesiyim.

