

Pnömonili Sığır Akciğerlerinden Bakteri İzolasyonları ve İzole *Pasteurella*'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Saptanması*

Ayşe KILIÇ, Adile MUZ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 23119, Elazığ – TÜRKİYE

Received: 19.08.2002

Özet: Bu çalışmada Elazığ'daki bir mezbahada kesilen toplam 8222 sığır akciğeri incelendi ve bu akciğerlerin 500 (% 6)'ünde pnömoni saptandı. Beşyüz akciğer örneğinin % 7 koyun 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 tanımlanmıştır. Şüpheli *P. multocida* suşlarının 24 (% 80)'ünde fare inokulasyon testi ile pozitif sonuç alındı. Kültür pozitif *P. multocida* ve *M. haemolytica* suşlarının tümünün PZR ile de pozitif olduğu bulundu. Ayrıca, *toxA* geninden hazırlanan primerlerin kullanılması ile yapılan PZR ile toksijenik *P. multocida* suşlarının varlığı araştırıldı ve *P. multocida* suşlarının hiçbirinin toksijenik olmadığı tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Pnömoni, sığır, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), kültür

Isolation of Bacterial Agents from the Lungs of Cattle with Pneumonia and Detection of *Pasteurella* Spp. by Polymerase Chain Reaction

Abstract: Lungs from 8222 cattle slaughtered at an abattoir in Elazığ were examined macroscopically, and pneumonia was detected in 500 (6.1%) lungs. These samples were inoculated onto 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 suspected *Pasteurella* spp. isolates. In addition, a mouse inoculation test was carried out on suspected *Pasteurella multocida* 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% mixed bacteria. Twenty-four (80%) of the *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 PCR. However, toxigenic *Pasteurella multocida* was not detected in any isolates by PCR using primers derived from the *toxA* gene.

Key Words: Pneumonia, cattle, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, polymerase chain reaction (PCR), culture

Giriş

Sığırların solunum sistemi hastalıklarının, özellikle Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, İngiltere ve Avrupa başta olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde, et ve süt sığırcılığında, halen büyük kayıplara neden olduğu bilinmektedir (1,2). Pnömonik pastörelloz'un Kuzey Amerika'da sığır endüstrisini yılda en az 640 milyon doların üzerinde bir kayba uğrattığı (3,4) ve kayıpların stres faktörlerinin ve viruslar ve bakterilerin

etkisi ile daha da arttığı ortaya konmuştur (5,6). Hastalığın ortaya çıkışında taşıma, kalabalık, yetersiz beslenme, açlık ve ani hava değişiklikleri gibi stres faktörleri ile bakteriyel ve viral birçok etken rol oynadığından, etiyolojik açıdan, kompleks bir yapıya sahip olduğu kabul edilmektedir (1,7,8). Pnömonik pastörelloz *Pasteurella multocida* veya *Mannheimia haemolytica* tarafından meydana getirilmekte ve farklı hayvan türlerini etkilemektedir (9).

* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1601) tarafından desteklenmiştir.

Ülkemizde sığır pnömonileri konusundaki bakteriyolojik araştırmalar bakteri izolasyonu, identifikasyonu ve izole edilen bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının tespitinden ileri gitmemektedir.

Son yıllarda moleküler biyolojide yapılan ilerlemeler, daha çabuk ve güvenilir teşhis metotlarının geliştirilmesi yönünde olmuştur (10). Bu amaçla son yıllarda geliştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği, bakteriyel hastalıkların teşhisinde, kültür ve immunolojik testlere alternatif olarak geliştirilmiş bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır (11,12). Ayrıca bu tekniğin geleneksel fenotipik prosedürlerin bazı sınırlamalarını gidermede faydalı olduğu tespit edilmiştir (12).

Pasteurella'ların izolasyonu ve identifikasyonunda kültür metodunun uzun süre gerektirmesi, kontaminasyon problemi, saf kültür elde etmenin zor olması gibi dezavantajlara sahiptir (13). Yine Pasteurella'ların teşhisinde kullanılan fare inokülasyon metodu pratik olmadığı için, çoğu kez diğer mikroorganizmalar ile kontamine olmuş örneklerde *P. multocida*'nın varlığını saptamak için kullanılmaktadır (12,14). Bunun yanı sıra hastalığın teşhisinde diğer testler (immunolojik testler) de yoğun olarak kullanılmaktadır. Ancak bu testlerde ise kros reaksiyonlar meydana gelmektedir (15).

Bu çalışma ile sığır akciğerlerinde pnömoniye neden olan bakteriyel etkenler izole ve identifiye edilerek, bunların içinden Pasteurella'ların bakteriyolojik yöntemler yanısıra PZR ile identifiye edilmesi hedeflendi.

Materyal ve Metot

Numunelerin Toplanması

Eylül 2000-Haziran 2001 tarihleri arasında Elazığ'daki bir mezbahada kesilen toplam 8222 sığır akciğeri muayene edildi. Çalışmada materyal olarak, makroskopik olarak pnömoni saptanan 500 adet sığır akciğeri toplandı. Toplanan örnekler 1-2 saat içerisinde laboratuara getirildi ve aynı gün ekimleri yapıldı.

İzolasyon ve İdentifikasyon

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, İndol, Üreaz, Metil Red, Voges

Proskauer, Oksidaz, Katalaz, Koagülaz, Hareket, H₂S, Sitrat, Nitrat redüksiyonu, Glikoz, Trehaloz, Ksiloz, Arabinoz, Fruktoz, Galaktoz, Maltoz, Mannoz, Sukroz, Laktoz, Dulsitol, İnositol, Salisin ile Karbonhidrat fermentasyon testleri uygulandı (16,17).

DNA İzolasyonu

Kanlı agarda üreyen *P. multocida*, toksijenik *P. multocida* ve *M. haemolytica* referans kültüründen (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) birkaç koloni alınarak 300 µl'lik distile su içeren bir eppendorf tüpte süspanse edildi. Sonra süspanse edilen bakteriler bir vorteks vasıtasıyla iyice karıştırıldıktan sonra bakteri süspanسیونu 56 °C'de 30 dakika süreyle inaktive edildi. Bu aşamayı müteakip süspanسیونu 300 ml TNES-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 süspanسیون 37 °C'de 2 saat inkube edildi. İnkubasyondan sonra 30 dakika kaynatma işlemi müteakip süspanسیون tekrar vortekslendi. Bu aşamayı müteakip süspanسیونu aynı volümde (300 ml) Tris-HCl ile satüre edilmiş fenol ilave edildi, süspanسیون 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 süspanسیونu 0,1 volüm 3 M sodyum asetat ve 2,5 volüm saf etanol ilave edilerek -20 °C'de 1-2 saat bekletildi. Daha sonra süspanسیون 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet önce 300 µl miktarındaki % 90'lık ve daha sonra da % 70'lik etanol ile muamele edildi. Bu işlemler arasında süspanسیون 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak elde edilen tortu 50 µl distile su ile süspanse edildi. Bu süspanسیونdan 5 µl alınarak PZR'de hedef DNA olarak kullanıldı (18).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Toplam 50 µl'lik volümde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10 x PZR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, % 1 Triton X-100), deoksiniükleotid

trifosfatların her birinden 250 µM, 2U Taq DNA polymerase enzimi (Promega), *P. multocida*'nın OMP geninden türetilen PMOut1 (5'-AGG TGA AAG AGG TTA TG-3') ve PMOut2 (5'-TAC CTA ACT CAA CCA AC-3') (19), *P. multocida* Tox A geninden türetilen PMTox1 (5'-GGT CAG ATG ATG CTA GAT ACT CC-3') ve PMTox2 (5'-CCA AAC AGG GTT ATA TTC TGG AC-3') (20) *M. haemolytica* subtip spesifik antijen geninden türetilen PHSSA1 (5'-TTC ACA TCT TCA TCC TC-3') ve PHSSA2 (5'-TTT TCA TCC TCT TCG TC-3') primeri ise (Leeb,T'den) kişisel görüşme ile temin edildi. Primer çiftlerinin herbirinden 20 pmol ve 5 µl hedef DNA olmak üzere 50 µl'lik volümde hazırlanan PZR karışımının üzeri 100 µl mineral yağ ile kaplandı ve PZR, Touchdown Thermocycler'de (Hybaid Marka, 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.

Elektroforez

PZR'de amplifiye edilen DNA, agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez tampon solüsyonu olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) kullanıldı ve bir midi jel elektroforez tankında 75 voltta 1 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elektroforezi takiben, jel ethidium bromide (0,5 µg/ml) ile 30 dakika süreyle boyandı ve sonuçlar ultraviyole transilluminatörde değerlendirildi. 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.

Fare İnokulasyon Testi

Şüpheli *P. multocida* kolonilerinin 18-24 saatlik katı kültürlerinden 0,5 ml miktarında steril enjektör ile fareye intraperitoneal yolla enjekte edildi. Deneme yapılan her fare için bir fare 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 otopsi yapıldı. Kalp kanı ve karaciğerden sürme preparatlar hazırlanarak Gram ve Giemsa ile boyandı ve genel amaçlı besiyerlerine ekimleri yapıldı. Bu besiyerleri 37 °C'de aerobik ortamda 24-48 saat inkube edildi. İnkubasyon süresi sonunda identifikasyon için gerekli testler yapıldı.

İstatistiksel Analiz

pnömonili sığır akciğerlerinden elde edilen kültür pozitiflik oranlarının karşılaştırmasında, Yates corrected χ^2 testi kullanıldı. Bu işlemler Epi-Info adlı istatistik programda yapıldı (21).

Bulgular

İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada incelenen pnömonili 500 adet sığır akciğer numunesi % 7,0 koyun kanlı agarda 24-48 saatlik kültürü sonucunda pnömonili sığır akciğerlerinden 30 (% 6,0) *Pasteurella multocida* ve 9 (% 1,8) *Mannheimia haemolytica* olmak üzere toplam 311 (% 62,2) adet bakteri suşu izole ve identifiye edilirken, 189 (% 37,8) örnekte herhangi bir bakteriyel etken üremedi. Pnömonili sığır akciğerlerinden izole edilen % 6,0 *P. multocida* ve % 1,8 *M. haemolytica* pozitiflik oranları karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı (P = 0,001). İncelenen toplam 500 adet pnömonili sığır akciğerinden izole edilen mikroorganizmalar Tablo'da gösterilmiştir.

İnokulasyon Test Bulguları

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

PZR Bulguları

Çalışmada, kanlı agarda üreyen *P. multocida* ve *M. haemolytica* şüpheli kolonilerinden izole edilen sığırlarda 30 (% 6,0) *P. multocida* ve 9 (% 1,8) *M. haemolytica*, suşlarından ekstrakte edilen DNA'ların PZR'de amplifiye edilmesi ve agaroz jelde elektroforeze tabi tutulması neticesinde 221 bp ve 327 bp uzunluğunda pozitif bantlar elde edildi (Şekil). Ancak 213 bp uzunluğunda bant elde edilmediği için toplam 30 *P. multocida* suşunun hiçbirinde PZR'de toksin geni tespit edilmedi.

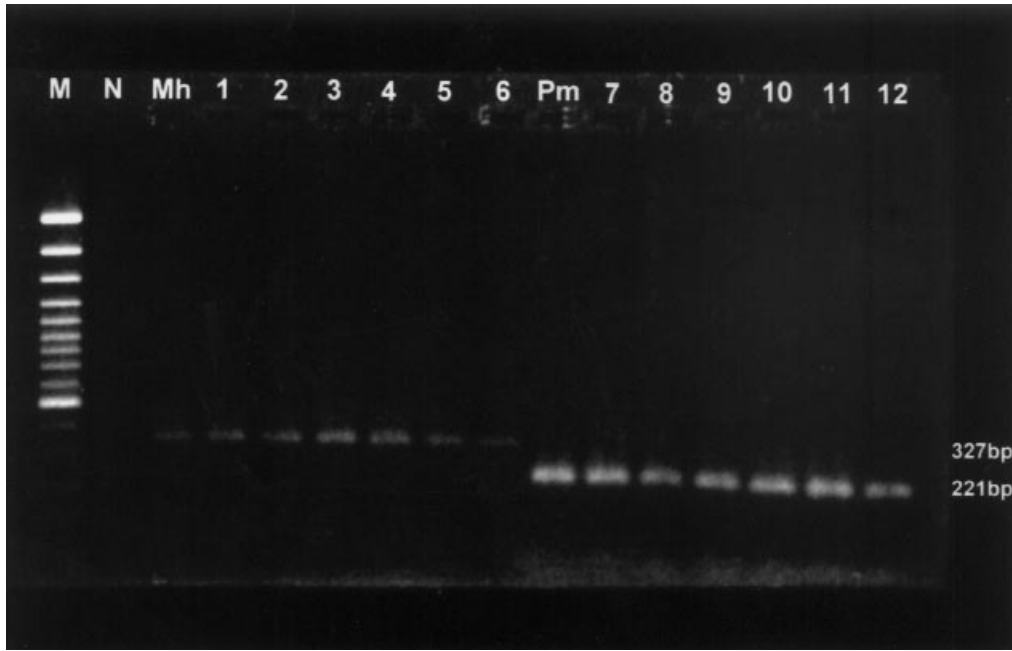
Tablo. Sığır Akciğerlerinden Tek veya Miks Enfeksiyon Halinde İzole Edilen Mikroorganizmalar.

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</i> spp.	30	6
Maya	29	5,8
<i>Streptococcus</i> spp.	19	3,8
<i>E. coli</i>	13	2,6
<i>Moraxella</i> spp	1	0,2
<i>Actinobacillus lignieresii</i>	8	1,6
<i>Klebsiella</i> spp	6	1,2
<i>Pseudomonas</i> spp	10	2
<i>Proteus</i> spp	11	2,2
<i>Bacillus</i> spp	1	0,2
<i>S. aureus</i> + Maya	10	2
<i>S. epidermidis</i> + <i>Corynebacterium</i> spp.	5	1
<i>S. aureus</i> + <i>Corynebacterium</i> spp.	18	3,6
<i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus</i> spp	4	0,8
<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>	3	0,6
<i>Streptococcus</i> spp + <i>E. coli</i>	2	0,4
<i>Streptococcus</i> spp + <i>Corynebacterium</i> spp.	5	1
<i>E. coli</i> + Maya	5	1
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i>	5	1
<i>E. coli</i> + <i>S. epidermidis</i>	5	1
<i>Corynebacterium</i> spp + Maya	6	1,2
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>Pseudomonas</i> spp	6	1,2
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>Bacillus</i> spp	2	0,4
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>E. coli</i>	3	0,6
<i>Klebsiella</i> spp + <i>S. aureus</i>	2	0,4
<i>Klebsiella</i> spp + <i>Streptococcus</i> spp	1	0,2
<i>Klebsiella</i> spp + Maya	1	0,2
<i>Pseudomonas</i> spp + <i>Bacillus</i> spp	1	0,2
<i>Pseudomonas</i> spp + <i>S. aureus</i>	4	0,8
Maya + <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

Tartışma

Sığırlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda pnömoni oranının % 6,1 ile % 40 arasında değiştiği bildirilmiştir (22,23). Bu çalışmada, sığırlarda pnömoni prevalansı % 6 olarak tespit edilmiştir. Sığır pnömonilerinin yayılışı ülkeler ve bölgeler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar coğrafik koşullar, bireysel direnç, beslenme durumu ve hijyen gibi faktörlerden kaynaklanabilir. 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 (24). 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. Bu çalışmada tespit edilen pnömoni prevalansı (% 6) ile bölgemizde daha önce yapılan çalışmada rapor edilen oran (% 20,3) (25) 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'lar akut pnömoni olgularından en sık izole edilen bakterilerdir. Kronik pnömoniler akut pnömonilerin bir komplikasyonu olarak kabul edilmekte olup, bu tip pnömonilerden Pasteurella dışındaki bakteriler de (*Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* vb.) izole edilebilmektedir (7). Pnömoni sığır akciğerlerinden % 3 *M. haemolytica* ve % 6 *P. multocida* izole edildiği bildirilmiştir (26). Konya'da pnömoni sığır akciğerlerinden % 12,9 *M. haemolytica* ve % 15,4 *P. multocida* izole edilmiş ve iki türün izolasyon oranları arasında belirgin bir fark gözlenmediği rapor edilmiştir (27). Erzurum'da pnömoni sığır akciğerlerinde % 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 (28). Ayrıca *P. multocida*'nın izolasyon oranının düşük olması kaba yem ağırlıklı besleme yapıldığı için yem değişikliği stresinin çok fazla olmaması ve iklim koşullarının özellikle *P. multocida* için fazla uygun olmamasına bağlanmıştır. Bu çalışmada, pnömoni 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



Şekil. Pnömonili 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.

sonuçlar Türkiye'de Gündüz ve Erganiş (27) tarafından Konet mezbahasından ve 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 (27). Araştırmacılar inceledikleri akciğer örneklerinden benzer şekilde *P. multocida*'nın % 15,9, *M. haemolytica*'dan % 14,1 daha yüksek oranda izole edildiğini 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.

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.

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 % 100 spesifiteye sahip olduğu belirtilmiştir (19).

Domuzların tonsillerinden toplanan swab örneklerinden *P. multocida*'nın izolasyonunda direkt kültür, fare inokulasyonu ve PZR kullanılmış ve *P. multocida*'nın saptanmasında direkt kültürün fare inokulasyonu veya PZR testinden daha az sensitif olduğu tespit edilmiştir (13). Aynı araştırmacılar bazı izolatların farelerde patojenik olmadığı için PZR'nin *P. multocida*'nın saptanmasında başarılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Pnömonili sığır akciğerlerinden % 4,5 oranında izole edilen *P. multocida* suşlarının farelere intraperitoneal olarak verildiği bir çalışmada, farelerin % 80'inin iki gün içerisinde öldüğü ve bunların dokularından *P. multocida* izole edildiği ve % 20'sinin de zayıf patojen veya apatojen

olduğu bildirilmiştir (26). 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.

Toksijenik *P. multocida*'nın saptanmasında Kamp ve ark. (20) tarafından tanımlanan toxA geninden hazırlanan primerlerin kullanıldığı PZR testinin diğerleri tarafından tanımlanan PZR testlerinden (29,30) daha sensitif ve etkili bir metot olduğu için bu çalışmada, Kamp ve ark. (20) tarafından tanımlanan PZR kullanılmıştır. Bu çalışmada pnömonili 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.

Bu araştırma ile, *Mannheimia haemolytica* ve *P. multocida*'nın, sığırlarda pnömoninin oluşmasında önemli bakteriyolojik etkenler olduğu ve pnömoneye neden olan bakteriyel etken dağılımının miks enfeksiyon karakterinde olduğu saptanmıştır. Ayrıca sığır kökenli Pasteurella'ların bakteriyolojik yöntemler yanısıra, son yıllarda geliştirilmiş moleküler biyoloji metotlarından biri olan PZR ile de identifiye edilebileceği ortaya konmuştur.

Kaynaklar

1. Yates, W.D.G.: A Review of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Shipping Fever Pneumonia and Viral-Bacterial Synergism in Respiratory Disease of Cattle. Can. J. Comp. Med. 1982; 46: 225-263.
2. Frank, G.H.: The Role of *Pasteurella haemolytica* in the Bovine Respiratory Disease Complex. Vet. Med. 1986; 12: 841-846.
3. Bowland, S.L., Shewen, P.E.: Bovine Respiratory Disease: Commercial Vaccines Currently Available in Canada. Can. Vet. J. 2000; 41: 33-48.
4. Highlander, S.K.: Molecular Genetic Analysis of Virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Fron. Biosci. 2001; 6: 1128-1150.
5. Dyer, R.M.: The Bovine Respiratory Disease Complex: A Complex Interaction of Host, Environment and Infectious Factors. Compend Contin. Educ. 1982; 4: S296-S304.
6. Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J., Ames, T.R., Kannan, M.S.: *Pasteurella haemolytica* A1 and Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis. J. Vet. Internal Med. 1992; 6: 11-12.
7. McKercher, D.G.: Bovine Respiratory Infections. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1968; 152: 7729-7737.
8. Frank, G.H.: Pasteurellosis of Cattle, In "Pasteurella and Pasteurellosis" Ed. by Adlam C., Rutter J.M., Academic Press Inc., New York. 1989.
9. Zamri-Saad, M., Effendy, A.W.M., Maswati, M.A., Salim, N., Omar, A.R.S.: The Goat as a Model for Studies of Pneumonic Pasteurellosis Caused by *Pasteurella multocida*. Br. Vet. J. 1996; 152: 453-458.
10. Hunt, M.L., Adler, B., Townsend, K.M.: The Molecular Biology of *Pasteurella multocida*. Vet. Microbiol. 2000; 72: 3-25.
11. Arda, M.: Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), No. 2, KÜKEM Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara. Pp:176-192. 1994.
12. Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J.S.: Development of PCR Assay for Species and Type-Specific Identification of *Pasteurella multocida* Isolates. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 1096-1100.
13. Townsend, K.M., Hanh, T.X., Boyle, D.O., Wilkie, I., Phan, T.T., Wijewardana, T.G., Trung, N.T., Frost, A.J.: PCR Detection and Analysis of *Pasteurella multocida* from the Tonsils of Slaughtered Pigs in Vietnam. Vet. Microbiol. 2000; 72: 69-78.
14. Kasten, R.W., Carpenter, T.E., Snipes, K.P., Hirsh, D.C.: Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in Turkey Flocks by the Use of the Polymerase Chain Reaction. Avian Dis. 1997; 41: 676-682.
15. Fodor, L., Penzes, Z., Varga, J.: Coagglutination test for serotyping *Pasteurella haemolytica*. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 393-397.
16. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., Izzür, M., Diker, K.S.: "Fakültatif Anaerobik Gram Negatif Çomaklar". Özel Mikrobiyoloji. Aydın, N. (Editör). No. 26, Medisan Yayın Serisi, Ankara. Pp: 64. 1999.
17. Carter, G.R.: Genus I Pasteurella In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". (Editor) Krieg, N.R., Holt, J.G. Vol I, Williams and Wilkins, Baltimore. Pp: 553-556. 1984.
18. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Biochemical Techniques. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. 1982.
19. Neumann, S., Leeb, T., Brenig, B.: Vergleich Zwischen PCR und Kultureller Untersuchung zum Nachweis von Infektionen mit *Pasteurella multocida* beim Hund. Kleintierpraxis. 1998; 43: 69-74.
20. Kamp, E.M., Bokken, G.C.A.M., Vermeulen, T.M.M., de Jong, M.F., Buys, H.E.C.M., Reek, F.H., Smits M.A.: A Specific and Sensitive PCR Assay Suitable for Large-Scale Detection of Toxigenic *Pasteurella multocida* in Nasal and Tonsillar Swabs Specimens of Pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 1996; 8: 304-309.

21. Abramson, J.H.: Making Sense of Data. Oxford University Press, Second Edition, New York. Pp; 176-179. 1994.
22. Alexander, B.H., MacVean D.W., Salman, M.D.: Risk Factors for Lower Respiratory Tract Disease in a Cohort of Feedlot Cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1989; 195: 207-211.
23. Caldow, G.L, Edwards, S., Nixon, P., Peters, A.R.: Associations between Viral Infection and Respiratory Disease in Young Beef Bulls. Vet Rec. 1988; 122: 529-531.
24. Maity, B., Deb, P.: Seasonal Variation in Incidence of Pneumonia in Cattle. Ind. J. Anim. Sci. 1991; 61: 261-262.
25. Öztürk, G., Özcan, C., Kalender, H.: Elazığ Et Balık Kurumu Mezbahasında Kesilen Sığırlarda Rastlanan Pnömonilerin Patolojik ve Bakteriyolojik Olarak İncelenmesi. Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg. 1996; 27: 163-174.
26. Houghton, S.B., Gourlay, R.N.: Bacteria Associated with Calf Pneumonia and Their Effect on Gnobiotic Calves. Res. Vet. Sci. 1984; 37: 194-198.
27. Gündüz, K., Erganiş, O.: Pnömonili Sığır Akciğerlerinden İzole Edilen *Pasteurella haemolytica* Suşlarının Biyotiplendirilmesi ve Serotiplendirilmesi. Veterinarium, 1998; 9: 11-19.
28. Dinler, U.: Pnömonili Sığır Akciğerlerinde *Pasteurella multocida*'nın İzolasyon ve İdentifikasyonu. (Uzmanlık Tezi), 1998; Ankara.
29. Lichtensteiger, C.A., Steenbergen, S.M., Lee, R.M., Polson, D.D., Vimr, E.R.: Direct PCR Analysis for Toxigenic *Pasteurella multocida*. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 3035-3039.
30. Hotzel, H., Erler, W., Schimmel, D.: Detection of Dermonecrotik Toxin Gene in *Pasteurella multocida* Strains Using Polymerase Chain Reaction. Berl. Munch. Tierarztl. Woch. 1997; 110: 139-142.