**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**EGE BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN KOYUN VE KEÇİLERDE APSELERDEN İZOLE EDİLEN *CORYNEBACTERİUM PSEUDOTUBERCULOSİS* VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUBSP*. ANAEROBİUS* SUŞLARININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ÇAĞATAY NUHAY**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Serap SAVAŞAN**

**AYDIN-2024**

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**EGE BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN KOYUN VE KEÇİLERDE APSELERDEN İZOLE EDİLEN *CORYNEBACTERİUM PSEUDOTUBERCULOSİS* VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUBSP*. ANAEROBİUS* SUŞLARININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ÇAĞATAY NUHAY**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Serap SAVAŞAN**

**AYDIN-2024**

# KABUL VE ONAY

# TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda desteğini ve ilgisini esirgemeyen sevgili danışmanım Prof. Dr. Serap SAVAŞAN’a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine de teşekkür ederim. Başta Doç. Dr. Abdurrahman Anıl ÇAĞIRGAN olmak üzere İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Bakteriyoloji Laboratuvarlarında çalışan mesai arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır ve özveri için eşim Buket NUHAY’a ve tez dönemi içerisinde aramıza katılan, benim çalışmalarıma ilham kaynağı olan biricik kızım Gupse NUHAY’a teşekkür eder minnetlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY i

TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ vi

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

TABLOLAR DİZİNİ viii

ÖZET ix

ABSTRACT ix

1.GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 2

2.1. Avrupa’da ve Türkiye’ de Küçükbaş Hayvancılığının Mevcut Durumu ve Önemi 2

2.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis* ve *Staphylococcus aureus* subps*. anaerobius*’un Tarihçesi 2

2.2.1. *C. pseudotuberculosis* ’in Tarihçesi.. 2

2.2.2.*S.aureus* subps*.anaerobius*’unTarihçesi ……………………………………………….. 3

2.3. *C. pseudotuberculosis* ve *S.aureus* subps*. anaerobius*’un Etiyolojisi 4

2.3.1. *C. pseudotuberculosis*’in Etiyolojisi.. 4

2.3.2. *S. aureus* subps*. anaerobius*’un Etiyolojisi. 6

2.4 *C.pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps*. anaerobius*’un Virülens Faktörleri 7

2.4.1 *C. pseudotuberculosis*’in Virülens Faktöreri. 7

2.4.2 *S.aureus subps. anaerobius*’un Virülens Faktörleri. 9

2.5 *C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps. *anaerobius*’un Epidemiyolojisi 10

2.5.1 *C. pseudotuberculosis*’in Epidemiyolojisi. 10

2.5.2 *S. aureus* subps. *anaerobius*’un Epidemiyolojisi. 12

2.6 *C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps. *anaerobius*’un Patogenezi 13

2.6.1 *C. pseudotuberculosis*’in Patogenezi. 13

2.6.2 *S. aureus* subps*. anaerobius*’un Patogenezi.. ..14

2.7 *C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps. *anaerobius*’un Teşhisi 15

2.7.1 *C. pseudotuberculosis*’in Teşhisi.. 15

2.7.2 *S. aureus* subps. *anaerobius*’un Teşhisi.. 17

2.8 *C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps. *anaerobius*’un Koruma ve Tedavisi 18

2.8.1 *C.pseudotuberculosis*’in Koruma ve Tedavisi . 18

2.8.2. *S. aureus* subps. *anaerobius*’un Koruma ve Tedavisi. 20

3. GEREÇ VE YÖNTEM 21

3.1. Gereç 21

3.1.1.İzolasyon Örnekleri 21

3.1.2. Standart Suşlar. 22

3.1.3. Kullanılan Besi Yerleri, Solusyonlar, Ayıraçlar 22

3.1.3.1. Kanlı Agar 22

3.1.3.2. Brain Hearth Infusion Broth 22

3.1.3.3. Oksidaz Ayıracı 23

3.1.3.4. Katalaz Testi 23

3.1.3.5. Gram Boyama Kiti 23

3.1.3.6. Vitek 2 Kullanım Solüsyonu 24

3.1.3.7. Vitek 2 CBC Kiti 24

3.1.3.8. Vitek 2 GP Kiti 24

3.1.3.9. DNA Ekstraksiyon Kiti 24

3.1.3.10. Xpert Fast Hotstart Mastermix 24

3.1.3.11. Xpert Green DNA Stain Direct 24

3.1.3.12. 50X TAE (Tris, Asetik Asit, EDTA) Elektroforez Solüsyonu 24

3.1.3.13. Marker 25

3.1.3.14. Agaroz 25

3.1.4. Kullanılan Cihazlar 25

3.1.4.1. VITEK 2 Compact . 25

3.1.4.2. Santrifüj . 26

3.1.4.3. Termal Döngüleme . 26

3.1.4.4. Elektroforez . 26

3.1.4.5. Görüntüleme . 26

3.1.4.6. Hassas Terazi 26

3.1.5. Primerler 26

3.2 Yöntem 27

3.2.1. Örnekleme 27

3.2.2. *C. pseudotuberculosis* ve *S.aureus* subsp. *anaerobius*’ un İzolasyonu 28

3.2.3. Gram Boyama 28

3.2.4. Bakteriyel İzolatların VITEK 2 Compact Cihazı ile İdentifikasyonu 28

3.2.5. PCR Tekniği 30

3.2.5.1 DNA Ekstraksiyonu 30

3.2.5.2 *C. pseudotuberculosis*’in PCR Amplifikasyon Aşaması 31

3.2.5.3 *S. aureus* subsp. *anaerobius*’un PCR Amplifikasyon Aşaması 32

3.2.5.4. PCR Ürünlerinin Elektroforez Tankına Yüklenmesi 34

3.2.5.5 Jelde Yürütme 35

3.2.5.6 Görüntüleme ve Değerlendirme 35

3.2.6 İzolatların Genotiplendirilmesi 35

4. BULGULAR 36

4.1. Fenotipik İzolasyon Bulguları 36

4.2. Vitek 2 Compact ile İdentifikasyon Bulguları 36

4.3. PCR Analizi Bulguları 37

4.3.1. *C. pseudotuberculosis*’in PCR ile İdentifikasyonu 37

4.3.2. *S. aureus* un PCR ile İdentifikasyonu 38

4.3.3. *S. aureus* subsp. *anaerobius*’ un PCR ile İdentifikasyonu 39

4.3.4. *C. pseudotuberculosis*’in Genotiplendirme Sonuçları 40

4.3.5. *S. aureus* subsp, *anaerobius*’ un Genotiplendirme Sonuçları 41

5. TARTIŞMA 43

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 50

KAYNAKLAR 51

BİLİMSEL ETİK BEYANI 71

ÖZ GEÇMİŞ 72

# SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

**ATCC :** American Type Culture Collection

**BHIB :** Brain Heart Infusion Broth

**bp :** Baz Çifti

**CMN :** *Corynebacteriaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae*

**dk :** Dakika

**DNA :** Deoksiribo Nükleik Asit

**dNTP :** Deoksi Nükleotid Trifosfat

**EDTA :** Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

**ELISA :** Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay

**EUROSTAT :** Avrupa İstatistik Ofisi

**FTS :** Fizyolojik tuzlu su

**kDa :** Kilo Dalton

**MLST :** Multilocus Sequence Typing

**NCTC :** National Collection Of Type Cultures

**PCR :** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**PLD :** Fosfolipaz D

**RAPD :** Rastgele Arttırılmış Polimofik DNA

**sn :** Saniye

**TAE :** Tris Acetate EDTA Buffer

**TAGEM :** Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü

**TUİK :** Türkiye İstatistik Kurumu

**UPGMA :** Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages

**UV :** Ultraviyole

**μl :** Mikrolitre

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1.** *C.pseudotuberculosis* tür spesifik PCR’de elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüleri …………………………………………………………...……….38

**Şekil 2.** *S.aureus* tür spesifik PCR’de elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüleri ………………………………………...………………………………………39

**Şekil 3.** *S.aureus* subsp*. anaerobius* tür spesifik PCR’de elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüleri .……………………………………………...…………40

**Şekil 4.** *C.pseudotuberculosis* izolatlarının RAPD-PCR görüntüsü………...…………41

**Şekil 5.** *S.aureus* subsp. *anaerobius* izolatlarının RAPD-PCR görüntüsü………….…41

# TABLOLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** *C. pseudotuberculosis’*inbiyokimyasal özellikleri*…………………….….……..*..6

**Tablo 2.** *S.aureus* subsp. *aureus* ile *S. aureus subsp, anaerobius* özellikleri……….…...7

**Tablo 3.** *S.aureus* tarafından sentezlenen ya da üretilen önemli virülens faktörler etkileri………………………………………………………………………... 10

**Tablo 4.** Araştırma materyallerinin illere göre dağılımı……………………..…………21

**Tablo 5.** PCR analizinde kullanılan primer dizilimleri……………………………..…..27

**Tablo 6.** *C. pseudotuberculosis’*in teşhisinde kullanılan PIP genine ait PCR karışım bileşenleri tablosu…………………….……………………………….………31

**Tablo 7.** *C.pseudotuberculosis’*in teşhisinde kullanılan PIP genine ait uygulanacak PCR protokolü …………………………………………..………………………….32

**Tablo 8.** *S.aureus’*in teşhisinde kullanılan *nuc* genine ait PCR karışım bileşenleri tablosu……………………………….……………………………………..…33

**Tablo 9.** *S aureus*’un *nuc* genine ait PCR protokolü …………………..………………..33

**Tablo 10.** *S.aureus* subsp. *anaerobius* ‘un *cat808F, cat1583R* gen bölgesine ait PCR karışım bileşenleri tablosu……………………………………………….....…34

**Tablo 11.** *S. aureus* subsp*. anaerobius* ‘un *cat808F, cat1583R* gen bölgesine ait PCR protokolü…………………………………………….……………………….. 34

**Tablo 12.** *C.pseudotuberculosis* izolatına ait VITEK 2 Compact biyokimyasal testler….37

**Tablo 13.** *S.aureus* subsp*. anaerobius* izolatına ait VITEK 2 Compact biyokimyasal testler…………………………………………………………………….……37

**Tablo 14.** Çalışma genel sonuçları tablosu…………………………………….……....…42

# ÖZET

**EGE BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN KOYUN VE KEÇİLERDE APSELERDEN İZOLE EDİLEN *CORYNEBACTERİUM PSEUDOTUBERCULOSİS* VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUBSP*. ANAEROBİUS* SUŞLARININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Nuhay Ç. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2024.**

**Amaç:** Bu çalışmada Ege bölgesinde yetiştirilen koyun ve keçi apselerinden izole edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* ve *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* suşlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 2021-2023 yılları arasında 100 adet küçükbaş hayvana ait apse örneklerinden konvansiyonel, hızlı teşhis ve moleküler yöntemlerle *C.pseudotuberculosis* ve *S.aureus* subsp. *anaerobius* izolasyonu yapılmış ve izolatların filogenetik yakınlıklarını RAPD-PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** 100 adet örnekten 17 *C.pseudotuberculosis* ve 31 adet *S. aureus* subsp. *anaerobius* izole ve identifiye edildi. İzolatlarının filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan RAPD-PCR ile genotiplendirme sonucunda, *S. aureus* subsp. *anaerobius* izolatlarında % 27 -100 oranında, *C. pseudotuberculosis* izolatlarında % 41 -100 oranında benzerlik saptandı.

**Sonuç:** Bu çalışmada Ege bölgesinde yetiştiriciliği yapılan koyun ve keçilerde *C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subsp*. anaerobius* varlığı ortaya konulmuştur. Çalışmamız sonucunda koyun ve keçilerde oluşan apse olgularında koruyucu ve tedavi amaçlı uygulama sırasında her iki etkene karşı etkili olabilecek yöntemlerin uygulanması gerektiği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Corynebacterium pseudotuberculosis, Keçi, Koyun, PCR, Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius**.*

# ABSTRACT

**INVESTIGATION OF PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUBSP. *ANAEROBIUS* STRAINS ISOLATED FROM ABSCESSES IN SHEEP AND GOATS REARED IN THE AEGEAN REGION**

**Nuhay Ç. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Microbiology Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2024.**

**Objective:** It was aimed to investigate the phenotypic and genotypic characteristics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* strains isolated from abscesses found in sheep and goats reared in the Aegean region.

**Materials and Methods:** In the study, *C. pseudotuberculosis* and *S.aureus* subsp. *anaerobius* were detected from abscess samples of 100 small ruminants between 2021 and 2023, using conventional, rapid diagnostic and molecular methods. anaerobius was isolated and the phylogenetic affinities of the isolates were determined by the RAPD-PCR method.

**Results:** Out of a total of 100 materials, 17 *C. pseudotuberculosis* and 31 *S. aureus* subsp. *anaerobius* were isolated and identified. As a result of genotyping with RAPD-PCR, which was carried out to determine the phylogenetic affinities of the isolates, it was determined that they showed a similarity of 27% -100% in *S. aureus* subsp. *anaerobius* isolates, and 41 -100% in *C. pseudotuberculosis* isolates.

**Conclusion:** In this study, the presence of *C. pseudotuberculosis* and *S. aureus* subps. *anaerobius* was determined in sheep and goats raised in the Aegean region. As a result of our study, it was concluded that methods that can be effective against both factors should be applied during preventive and therapeutic applications in abscess cases in sheep and goats.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis, Goat, PCR, Sheep, Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*

**1. GİRİŞ**

*Corynebacterium pseudotuberculosis,* yüzeysel lenf düğümlerinde oluşan apselerin çatlayarak dışarıya açılmasıyla oluşan kazeöz lenfadenitis isimli hastalığın etkenidir. Kazeöz lenfadenitis kilo kaybına sebep olması nedeniyle ‘’Thin Ewe Syndrome’’ olarak da adlandırılmaktadır (Gates ve diğerleri, 1977).

Kazeöz lenfadenitis, koyun ve keçilerde döl veriminde azalmaya, kilo kaybına ve deri kalitesinde bozulmaya yol açması sebebiyle çok ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır ( Moller ve diğerleri, 2000). İnfeksiyonun ülkemiz ekonomisine verdiği zarar konusunda herhangi bir çalışma olmamasına rağmen, ülkemizde yapılan bazı çalışma sonuçlarına göre ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu düşünülmektedir (İlhan, 2013).

Morel hastalığı koyun ve keçilerde lenf yumrularında, deri yüzeylerinde ve kas içlerinde apselerin oluşumu ile karakterize olan *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* oluşturduğu bir infeksiyondur. Morel hastalığının bir diğer ismi apse hastalığıdır (De la Fuente ve diğerleri, 1985; Moller ve diğerleri, 2000).

*Corynebacterium pseudotuberculosis,* kaynaklı kazeöz lenfadenitis hastalığı üzerine ülkemizde birçok çalışma olmasına karşın *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius’un* oluşturduğu Morel hastalığı üzerine henüz yayınlanmış çalışma bulunmamaktadır.

Türkiye sahip olduğu küçükbaş hayvan varlığı açısından dünyada önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Bölge çeşitliliği, bitki örtüsü özellikleri, mera zenginliğinin olması ve geleneksel tüketim alışkanlıkları gibi faktörler ülkemizde küçükbaş hayvan yetiştiriciliği için daha elverişli bir ortam oluşturmaktadır (Semerci ve diğerleri, 2016).

Türkiye’ de toplam 56.265.750 küçükbaş hayvan varlığı mevcut olup, bunların 44.687.888 başı koyun, 11.577.862 keçiden oluşmaktadır. Ege bölgesinde ise Türkiye’deki küçükbaş hayvan mevcudunun %14,7’si bulunmaktadır (TÜİK, 2022).

Çalışmamızda Ege bölgesinde yetiştirilen koyun ve keçilerdeki kazeöz lenfadenitis infeksiyonlarına neden olan *Corynebacterium pseudotuberculosis* ve morel hastalığına neden olan *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* etkenlerinin izolasyonu ve identifikasyonu, elde edilen izolatların filogenetik yakınlığının RAPD-PCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

**2.GENEL BİLGİLER**

**2.1. Avrupa’da ve Türkiye’ de Küçükbaş Hayvancılığın Mevcut Durumu ve Önemi**

Avrupa İstatistik Ofisi (Eurostat) 2022 verilerine göre Avrupa’da 59.456.000 adet koyun ve 11.319.000 adet keçi varlığı bulunmaktadır. Türkiye’ de ise 44.687.888 baş koyun, 11.577.862 adet keçi varlığı bulunmaktadır (Eurostat, 2022).

Hayvancılık sektörü tüm ülkeler için büyük bir öneme sahiptir. Nüfusun dengeli ve sağlıklı beslenmesi, sanayi için hammadde oluşturması gibi çeşitli etkilerinden dolayı hayvansal ürünler ülkeler için ön sıralarda yer almaktadır. Aynı zamanda tarım işletmelerinde atıl iş gücünün ve yemin değerlendirilmesi, düzenli nakit akışı sağlanması, ekonomik riskin azaltılması gibi etkileri sebebiyle hayvancılık faaliyeti önemli görülmektedir (Öztürk ve Karkacier, 2008).

Küçükbaş hayvan yetiştiriciliği zayıf meraların, nadas alanlarının ve tarıma uygun olmayan arazilerin değerlendirmesi açısından oldukça önemlidir. Küçükbaş hayvan yetiştiriciliği ile elde edilen et, süt, yün ve deri gibi ürünler ülkemizde geniş bir sanayi kullanımına sahiptir (Paksoy, 2007; Yıldız ve diğerleri, 2021). Küçükbaş hayvancılık Türkiye’de meraya dayalı olarak ve geleneksel yöntemler kullanılarak yapılmaktadır (Çukur ve Saner, 2005). Türkiye’nin yeryüzü şekilleri, iklimi, bitki örtüsü ve coğrafi yapısından dolayı küçükbaş hayvancılık bazı bölgelerde göçer biçiminde yapılmaktadır (Sezgin, 2006).

**2.2** ***Corynebacterium pseudotuberculosis* ve *Staphylococcus aureus* subps*. anaerobius’*un Tarihçesi**

**2.2.1** ***C. pseudotuberculosis‘*inTarihçesi**

Bir sığırda meydana gelen lenfangitis vakasında 1888 yılında Fransız Veteriner Hekim Edward Nocard tarafından alışılmadık bir mikroorganizma izole edilmiştir. Hugo Von Preisz 1891 yılında koyunlarda böbrek apselerinde benzer bir bakteri izole edip *Bacterium pseudotuberculosis ovis* olarak isimlendirmiştir. Bakteriyoloji atlaslarında bakteriyi ilk defa Alman bakteriyolog Lehmanne Neumann 19. yüzyılda *Mycobacterium tuberculosis*’dekine yakın lezyonlara neden olduğundan dolayı *Bacillus pseudotuberculosis* olarak adlandırmıştır (Merchant ve Packer, 1967).

Etken, 1911 yılında Buchanan tarafından *Bacillus tuberculosis* olarak, 1918 yılında ise Eberson tarafından *Corynebacterium pseudotuberculosis Eberson* olarak adlandırılmıştır. Bergey ve arkadaşları 1921 yılında bakteriyi *Corynebacterium ovis* olarak isimlendirse de, 1948 yılında yayınlanan Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’nin 6. Baskısında etken ilk defa *Corynebacterium pseudotuberculosis* olarak isimlendirilmiştir (Arda, 1997; Baird ve Fontaine, 2007; Brown, 1987; Jones ve Collisson, 1986).

Hastalık ilk defa İngiltere’nin de arasında bulunduğu bazı Avrupa ülkelerinde yetiştirilen koyunlarda et verimi düşüklüğüne sebep olarak ekonomik kayıplar meydana getirmiştir (Baird ve Fontaine, 2007). Hayvan nakillerinin 18. yüzyılda artması ile özellikle yüksek verimli merinos cinsi koyunların nakilleri ile hastalık yayılımı sürecini hızlandırdığı düşünülmektedir (Paton, 2000).

Türkiye’ de *Corynebacterium pseudotuberculosis* kaynaklı infeksiyonlar ile ilgili olarak etkenin teşhisi, biyokimyasal özellikleri, moleküler olarak teşhisi, antibiyotik duyarlılığı ve aşı çalışmaları ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır (Aydın, 1977; Çetinkaya ve diğerleri, 2002; Erganiş ve diğerleri, 1990; Sakmanoğlu ve diğerleri, 2015; İlhan, 2003; İzgür ve diğerleri, 1999).

**2.2.2** ***S. aureus* subps*. anaerobius’*un Tarihçesi**

1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından insan apselerinden izole edilen bakteriler ilk kez *Staphylococcus* olarak isimlendirilmiştir. Bu bakterilerin üreme sırasında birbirinden ayrılmayarak üzüm benzeri yapılar oluşturması sebebiyle eski Yunanca’da üzüm bağı manasına gelen staphylus deyimi şekinde adlandırılmıştır (Brock ve Madigan, 2006; Sandel ve Mc Killip, 2004). Rosenbach 1883 yılında, saf kültür üremelerindeki sarı renkli koloni meydana getiren suşlara *Staphylococcus aureus* ismini vermiştir (Brock ve Madigan, 2006; Demiroluk, 2000; Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

*Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* ise ilk olarak 1920 yılında Aynaud tarafından izole edilmiştir (Aynaud, 1922).

Küçükbaş hayvanlarda sırasıyla 1984 yılında Bajmocy ve diğerleri, 1985 yılında De La Fuente ve diğerleri, 1993 yılında Alhendi ve diğerleri, 1997 yılında De La Fuente ve diğerleri, 2000 yılında ise Sanz ve diğerleri tarafından izole edilip, raporlanmıştır.

Bir köpekte 2006 yılında hastalığa neden olan etken insanlarda da farklı zamanlarda birkaç olgu oluşturmuştur (Crawford ve diğerleri, 1994; Friedberg ve diğerleri, 2003; Oliveira ve diğerleri, 2006; Över ve diğerleri, 2000; Peake ve diğerleri, 2006).

Hastalık şimdiye kadar çoğunlukla Afrika ve Asya kıtalarında görülmüştür. Bu kıtalarda hastalığın görüldüğü bazı ülkeler, Sudan, Kenya, Suudi Arabistan, Somali ve Tunus’ tur (Alhendi ve diğerleri, 1993; Ben Said ve diğerleri, 2002; El Sanousi ve diğerleri, 1989; Pegram, 1973; Shirlaw ve Asford, 1962). Avrupa kıtasında ise Macaristan, İspanya, Danimarka, Hırvatistan ve Polonya’da birkaç salgın şeklinde görülmüştür (Bajmocy ve diğerleri, 1984; Habrun ve diğerleri, 2004; Kaba ve diğerleri, 2007; Moller ve diğerleri, 2000; Santa Quiteria ve diğerleri, 1996).

**2.3** ***C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps*. anaerobius’*un Etiyolojisi**

**2.3.1** ***C.pseudotuberculosis’*in Etiyolojisi**

*C. pseudotuberculosis*, eni 0,5 µm ve 0,6 µm, uzunluğu 1 µm ve 3 µm arasında değişebilen, kokoid veya çomak formunda, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, fakültatif intraselüler, Gram pozitif bir bakteridir (Arda ve diğerleri, 1997). Bakteriyoskopi görüntülerinde karakteristik olarak Çin alfabesi ya da çit görünümü vardır (Baird ve Fontaine, 2007).

Corynebacterium cinsi bakteriler, *Mycobacterium, Nocardia* ve *Rhodococcus* cinsininde yer aldığı Aktinomycetes sınıfı içerisinde yer alır ( Hard, 1975; Paule ve diğerleri, 2004; Songer diğerleri, 1988; Songer, 1997). Gram pozitif olan bu bakteriler (*Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus*) CMN grup olarak adlandırılıp, bu türlerin çoğu yüksek G+C oranına sahiptir ve hücre duvarında ise peptidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asit gibi kompleks bir yapı içerir (Bayan ve diğerleri, 2003; Collins ve diğerleri, 1982; Connor ve diğerleri, 2000; Funke ve diğerleri, 1995; Hard, 1975; Navas, 1996).

*C. pseudotuberculosis* basilinin bir ucunun şişkin olması sebebiyle basil topuz görüntüsü verir. Basilin içerisinde, rastgele olarak dağılmış; genellikle uç bölgelere doğru bulunan ve anilin boyalarla koyu renkte boyanan granüller vardır. ‘’Metakromatik cisimcikler’’ veya ‘’Babes-Ernest cisimcikleri’’şeklinde isimlendirilen bu cisimcikler, etkende tesbih tanesi görünümü oluşturmaktadır (Akman ve Gülmezoğlu, 1980).

*C. pseudotuberculosis* etkeni besiyerlerinde 37°C derece inkübasyona bırakıldığında ilk 24 saatte seyrek koloniler oluşturur iken, 48-72 saat inkübasyon sonunda hem oluşan koloni miktarları artar, hem de kolonilerin çapı 1-2 mm’ye ulaşır. Etken genellikle krem rengi kuru opak R tipi koloni oluşturur (Connor ve diğerleri, 2000).

*Truperealla pyogenes* ve *Pasteurellla multocida* gibi bazı etkenlerinde apselere neden olabilme ihtimali nedeniyle, *C. pseudotuberculosis’*in gerek biyokimyasal yöntemler ile gerekse moleküler yöntemler ile ayrımının yapılması oldukça önemlidir ( Dorella ve diğerleri, 2006, Gavin ve diğerleri, 1992).

*C. pseudotuberculosis*’in biyokimyasal özelliklerini gösteren tablo bir sonraki sayfada belirtilmiştir(Dorella ve diğerleri, 2006).

**Tablo 1.** *Corynebacterium pseudotuberculosis*’in biyokimyasal özellikleri (Dorella ve diğerleri, 2006)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| *Corynebacterium pseudotuberculosis’in* biyokimyasal özellikleri | | | |
| Asit Üretimi + | | Hidroliz - | |
| Glikoz | + | Eskülin | - |
| Arabinoz | d | Hippurat | - |
| Ksiloz | - | Üre | + |
| Ramnoz | - | Tirozin | - |
| Furuktoz | + | Kasein | - |
| Galaktoz | + |  |  |
| Mannoz | + | Fosfataz | + |
| Laktoz | - | Pirazinamidaz | - |
| Maltoz | + | Metil red | + |
| Sukroz | d | Nitrat redüksiyon | d |
| Trehaloz | - | Katalaz | + |
| Raffinoz | - | Oksidaz | - |
| Salicin | - | Lipofilizm | - |
| Dekstrin | d |  |  |
| Nişasta | - |  |  |
| +:%90’dan yüksek pozitif d:11-89% arası pozitif -: %90’ dan fazla negatif yada dirençli | | | |

**2.3.2** ***S. aureus* subps*. anaerobius’*un Etiyolojisi**

*Staphylococcaceae* familyasında yer alan Stafilokoklar hem insanlar hem de hayvanlar için tehlike oluşturabilen önemli patojen mikroorganizmalardır (Garrity ve diğerleri, 2004). Gram pozitif olan Stafilokoklar fakültatif anaerob, sporsuz, hareketsiz genellikle kapsülsüz ve mikroskobik bakıda üzüm salkımı şeklinde görünürler. Elektron mikroskobunda küresel şekilde görülen etkenin çapı 0,5- 1,0 μm arasında değişmektedir (Foster, 1996).

Geniş sıcaklık aralıklarında üreyebilen *Staphylococcus aureus’un* optimum üreme ısısı 35-37°C’dır. Etken ayrıca pH derecesi 4-10 arasında ve %0-20 oranında tuz konsantrasyonunda üreyebilmektedir (Cretenet ve diğerleri, 2011).

Etken, İlk defa genç koyunlardaki apselerden izole edilip, 1985 yılında bir *Staphylococcus aureus* varyantı olarak tanımlanmıştır. *S. aureus*’dan aerobik üreme, katalaz aktivesi ve sitokrom farkları sebebiyle bu varyant *S. aureus* subsp*. anaerobius* olarak isimlendirilip yeni bir alt tür olarak sınıflandırılmıştır (De la Fuente ve diğerleri, 1985).

*S. aureus* subsp. *anaerobius*’un 37°C’ de % 5 koyun kanlı Columbia agarda, mikroaerofilik ortamda 24-48 saat inkübasyon sonucu hemoliz oluşturan ufak koloniler meydana getirdiği bildirilmiştir (De la Fuente ve diğerleri, 1985).

*S. aureus* subsp*. anaerobius*’un fenotipik olarak teşhisinin zor olması nedeniyle moleküler olarak teşhisinin yapılması oldukça önemlidir (Musa ve diğerleri, 2012). *S.aureus* subsp*. aureus* ile *S. aureus* subsp*. anaerobius*’un bazı biyokimyasal ve üreme özellikleri Tablo 2.’de gösterilmiştir ( De la Fuente ve diğerleri, 1985).

**Tablo 2*.*** *S.aureus subsp. aureus* ile *S. aureus* subsp. *anaerobius* özellikleri (De la Fuente ve diğerleri, 1985).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Özellikler | *Staphylococcus aureus subsp. aureus* | *Staphylococcus aureus subsp, anaerobius* |
| Aerobik üreme | + | W yada - |
| Koagulaz | + | + |
| Clumping faktörü | + | - |
| Isıya dayanlıklık | + | + |
| Heamolyzin | + | + |
| Mannitol | + | - |
| Hiyaluronidaz | + | + |
| Nitrat | + | - |
| Pigment Üretimi | + | - |
| Fosfataz aktivitesi | + | + |
| Maltoz | + | + |
| Galactoz | + | - |
| Mannnoz | + | - |
| Trehaloz | + | - |
| Oksidaz | - | - |
| Katalaz | + | - |
| +:%90’dan yüksek pozitif -: %90’ dan fazla negatif yada dirençli | | |

**2.4** ***C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps*. anaerobius’*un virülens faktörleri**

**2.4.1** ***C.pseudotuberculosis’*in virülens faktörleri**

*C. pseudotuberculosis*’in patojenitesinde etkili olan etmenler net bir şekilde ortaya konulamamıştır. Fakat fosfolipaz D enzimi ve toksik hücre duvarı en önemli virülens etkileri arasında gösterilmektedir (Barksdale ve diğerleri, 1981; Bernheimer ve diğerleri, 1980; Biberstein ve diğerleri,1971).

Carne, 1940 yılında ilk kez fosfolipaz enziminin varlığını ortaya koymuştur (Baird ve diğerleri, 2007). Fosfotidilkolinin ayrışması ile ortaya çıkan fosfatidik asit yangı, fagositoz, nöral ve kardiyak uyarım, sitosketal düzenlenmesi, diyabet, matriks metalloproteinaz üretiminde, onkogeneziste, bakteri patojenitesinde, örümcek zehrinde ve nötfofil parçalanması gibi birçok metabolik faliyetlerde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Bocckino ve diğerleri, 1991; Cross ve diğerleri, 1996; Dhalla ve diğerleri; 1997; Frohman ve Morris, 1999; Hammond ve diğerleri, 1995; Henry ve diğerleri, 1995; Kusner ve diğerleri, 1996; Park ve diğerleri, 2000; Reich ve diğerleri, 1995; Van Dijk ve diğerleri, 1998; Waite ve diğerleri, 1997; Welsh ve diğerleri, 1994; Xu ve diğerleri, 1996.). Fosfolipazların, A, B, C ve D olarak sınıflandırılmalarının nedeni hidrolize ettiği ester bağlarıdır (Karkoeska ve diğerleri, 2009).

Membran sfingomiyelin yapısını bozan fosfolipaz D enzimi, damar permeabilitesini artırır. Bu şekilde etkenin infeksiyon bölgesinden iç organlar ile lenf yumrularına dağılmasında etkili olarak infeksiyonun patogenezisinde etkin rol oynar (Lund ve diğerleri,1982; Paton ve diğerleri, 1995; Sutherland ve diğerleri, 1993).

*C. pseudotuberculosis* kültürlerinde hem sitoplazma hem de hücre duvarında fosfolipaz D enzimi üretildiği ortaya konulmuştur (Bastos ve diğerleri, 2012; Brown ve diğerleri, 1986; Carne, 1939; Egen ve diğerleri, 1989; Onon, 1979; Songer, 1997; Tashjian ve Campbell, 1983).

Fosfolipaz D ekzotoksininin etkilerini araştırılması amacıyla deney hayvanlarında düşük dozlardaki uygulamalarda dermonekrotik etki görülmesine karşın, yüksek doz uygulamalarında ise letal etkiye sebep olduğu belirtilmiştir (Hsu ve diğerleri, 1985).

Hastalığın bir virülens faktörünün de 40 kDa ağırlığında olan serin proteaz olduğu çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Walker ve diğerleri, 1994; Wilson ve diğerleri, 1995).

*C.pseudotuberculosis*’in hücre duvarını saran mikolik asitin de, etkenin virülens faktörleri arasında olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Deneme amaçlı Farelere deri altı yol ile mikolik asit ekstraktları uygulandığında, farenin uygulama bölgesinde hemorajik nekroz, konjesyon ve yangı belirtilerinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Carne ve diğerleri, 1956).

Yeni yapılan moleküler çalışmalar ile demir metabolizmasında etkili olan integral membran proteini (*Fag A*), demir enterobaktin taşıyıcı protein (*Fag B*), ATP bağlayıcı sitoplazmik membran proteini (*Fag C*) ve demir siderofor bağlayıcı protein (*Fag D*) varlığı ortaya konulmuştur. *Fag A, Fag B, Fag C* ve *Fag D* varlığı ortaya konulması sonucu Fosfolipaz D ekzotoksininin etkinliğinin arttırılmasında bu protein yapılarınında etkili olduğu belirlenmiştir (Billington ve diğerleri, 2002; Pathirana ve diğerleri, 2022).

Aynı zamanda 2022 yılında yapılan bir çalışmada potansiyel virülens faktör olarak çalışılması önerilen oligopeptid permease (*Opp*), pili tip protein C (*Spa C*), nöromidinase (*NanH*), süperoksit dismutase ( *SodC*) ve Protein Kinaz C (*PknG*)’ye ait genlerinin varlığı tespit edilmiştir ( Pathirana ve diğerleri, 2022).

**2.4.1** ***S. aureus* subps*. anaerobius’*un virülens faktörleri**

*S. aureus*’ un virülans faktörleri; konakçıya kolonizasyonu arttıran yüzey proteinleri, etkenin dokularda yayılmasınında etkili olan invazivler, hücre dışı enzimler, fagositoz önleyici yüzey komplementleri, koagülaz ve biyofilm gibi yapılardan oluşmaktadır (Xu ark 2015). Isıya ve proteolitik enzimlere oldukça dirençli olan bu faktörlerin sayısı ne kadar fazla ise oluşan infeksiyon şiddeti o kadar arttığı çalışmalarda belirtilmiştir (Liu ve diğerleri, 2017).

*S. aureus*’ un önemli virülans faktörlerinden *spa* geni tarafından kodlanan protein A, oldukça önemlidir. Hücre duvarının majör bileşenlerinden olan protein A’ nın antifagositik, kemotatik ve mitojenik etkileri vardır ( Koneman ve diğerleri, 2005).

Virülens etkenlerden koagülaz enzimi koagülaz- reaksiyon faktör ile reaksiyona girerek inaktif olan fibrinojenin fibrine dönüşmesini katalize eder. Oluşan fibrin molekülleri bakteri hücrelerinin etrafını sararak opsonizasyonda dirençli hale getirir (Dallal ve diğerleri, 2016).

*Staphylococcus aureus* subps*. anaerobius*’un virülens faktörleri hakkında yeterli miktarda çalışma olmamak ile birlikte, 2009 yılında Sudan’ da protein A ( *spa*) ve koagulaz ( *coa*) gen yapıları üzerine bir çalışma yapılmış ve tespit edilmiştir (Musa ve diğerleri, 2009).

**Tablo 3.** *S.aureus* tarafından sentezlenen ya da üretilen önemli virülens faktörler ve etkileri (Nalça, 2021).

|  |  |
| --- | --- |
| **Virülens Faktörü** | **Etki** |
| Adezin Faktörleri | Adezyon, kolonizasyon, antifagositik |
| Protein A | Lipolizis, opsonizasyonu önleme |
| Enterotoksinler | Gıda zehirlenmesi |
| DNAaz | DNA hidrolizi |
| Kapsül | Antifagositik |
| Stafilokinaz | Fibrinolizis |
| Eksfolyatif Toksin | Kohezyon kaybı, invazyon |
| Hemolizinler | Sitotoksik etki, lizis |
| Lökosidin | Sitoliz, nekrotik etki |
| Hyaluronidaz | İnvazyon |
| Lesitinaz | Lesitin hidrolizi |
| Koagülaz | Plazma koagülasyonu/kümeleşme |
| Toksik Şok Sendrom Toksin | Hücre proliferasyonu, şok |

**2.5** ***Corynebacterium pseudotuberculosis* ve *Staphylococcus aureus* subps*. anaerobius’*un Epidemiyolojisi**

**2.5.1** ***Corynebacterium pseudotuberculosis’*in Epidemiyolojisi**

*C.pseudotuberculosis* tarafından oluşan kazeöz lenfadenitis infeksiyonunun bulaşması genellikle deri üzerindeki kesik ve yaralardan, daha az olarak da aerosol yol ile olmaktadır (Zaitoun ve Bayoumi, 1994).

Çevre koşulları ve stres faktörlerinin infeksiyonun ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Koyun ve keçilerde özellikle kırkım sırasında ya da çeşitli sebepler ile apseli lenf yumrularının açılması sonucu bakterinin çevreye ve diğer hayvanlara bulaşmasının infeksiyonun bulaşma şeklinde temel kaynağı oluşturduğu düşünülmektedir (Arda, 1997).

Kazeöz lenfadenitis infeksiyonu, koyun ve keçi populasyonunun yoğun olduğu bölgelerde daha fazla görülmektedir (Holstad, 1986; Leamaster ve diğerleri, 1987; Pepin ve diğerleri, 1994; Schreuder ve diğerleri, 1994). İnfeksiyonun sürüye girmesi ile koruyucu önemlerin yetersiz kalması sonucu 2-3 yılın sonunda sürünün önemli bir bölümünün infekte olduğu gözlemlenmiştir (Rizvi ve diğerleri, 1997).

Türkiye’de ihbarı mecburi hastalıklar sınıfında olmayan kazeöz lenfadenitis infeksiyonu genellikle endemik ve subklinik seyretmektedir. İnfeksiyon süresinin uzun olması ve görülebilir lezyonlarının az olması nedeniyle tespiti zor olmaktadır (Kuyucuoğlu ve Erganiş, 1999).

Kazeöz lenfadenitis infeksiyonu Güney Amerika, Afrika, Asya ve Kuzey Amerika, Avustralya, Avrupa gibi geniş coğrafyalarda görülmüştür (Meldrum, 1990). Hastalığın prevelansı %8 ile %90 arasında değişiklik göstermektedir (Al Gaabary ve diğerleri, 2009; Çetinkaya ve diğerleri, 2002; Erganiş ve Kaya, 1990; Stanford ve diğerleri, 1998).

Dünyada yapılan çalışmalarda et, süt ve yün verimi açısından çok ciddi ekonomik kayıplara sebep olduğu bildirilmiştir. Avustralya’da yapılan bir çalışmada sadece yün verimi kaybına bağlı yıllık 10-20 milyon dolarlık zarar tespit edilmiştir (Burrel, 1980; Paton ve diğerleri, 1994).

Ülkemizde ilk kez 1977 yılında yapılan bir çalışmada farklı bölgelerden alınan materyallerde 77 adet etken izole edilerek ülkede yaygınlığı raporlanmıştır (Aydın, 1977).

Konya ilindeki mezbahalardan alınan örnekler ile yapılan bir çalışmada ise 100 adet apseli lenf doku örneğinden 16’sında etken izole edildiği bildirilmiştir (Erganiş ve diğerleri, 1990).

Kazeöz lenfadenitis infeksiyonu geçiren küçükbaş hayvanlar ile temas halinde bulunan insanlarda infeksiyonlar görülebildiği gibi infekte olan hayvanların sütünden de hastalık geçişi olabileceği belirtilmiştir (Goldberger ve diğerleri, 1981, Hemond ve diğerleri, 2008 JoinLambert, 2006; Peel ve diğerleri, 1997; Romero-Perez ve Luglio, 2004).

*C. pseudotuberculosis* başlıca koyun ve keçilerde infeksiyona neden olmak ile birlikte at, domuz, deve, geyik ve sığırlarda da infeksiyon yaptığı raporlanmıştır. Atlarda deri altı apseleri, kıl folikülleri de yangı ve ülseratif lenfangitis, sığırlarda mastitis, domuzlarda vaginitise neden olduğu raporlanmıştır (Bastos ve diğerleri, 2012; Brown ve diğerleri, 1986; Miers ve Ley, 1980 Watts ve diğerleri, 2000).

*C. pseudotuberculosis* çeşitli cerrahi girişimler, kuyruk kesimi gibi yaralar sonucu vücuda girip infeksiyona neden olur. İnfekte hayvanların apse içerikleri, sütü ve dışkısı ile çevreyi kontamine etmesi ile yayılır. Güneş ışığına oldukça duyarlı olan etkenin gölgede 4 ay canlı kaldığı raporlanmıştır (Schreuder ve diğerleri, 1994). Artropotlar ile karasineklerin bulaşmada rolü olduğu tespit edilmiştir (Braverman ve diğerleri, 1999). Etkenin solunum yolu ve sindirim yolu dışında sağlam deriden de vücuda giriş yapıp infeksiyona neden olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Rizvi ve diğerleri, 1997; Zaitoun ve Bayoumi, 1994).

**2.5.2** ***S. aureus* subps*. anaerobius’*un Epidemiyolojisi**

*S.aureus* subps *anaerobius*, koyun ve keçilerde Morel hastalığına neden olan gram pozitif bir bakteridir. Etken koyun ve keçilerde kronik deri altı bölgesinde ve superfaciel lenf nodüllerinde apseler ile seyreden infeksiyonlara neden olmaktadır (De la Fuente ve diğerleri, 1985).

Morel hastalığı Sudan, Suudi Arabistan, Macaristan, İspanya, Danimarka, İtalya ve Polonya gibi birçok ülkede tespit edilip, rapor edilmiştir (De la Fuente ve diğerleri, 2011). İnsanlarda ise yanlızca Avustralya’da bir vakada septisemiye neden olduğu tespit edilmiştir (Peake ve diğerleri, 2006).

Morel hastalığının meydana getirdiği klinik semptomlar ile kazeöz lenfadanitis infeksiyonun neden olduğu klinik semptomlar birbirlerine çok sayıda benzerlik göstermektedir (Moller ve diğerleri, 2000). Morel hastalığının daha çok genç hayvanlarda özellikle ilk 6 aylık dönemde ortaya çıktığı tespit edilmiştir (De la Fuente ve diğerleri, 1997).

Küçükbaş hayvanlarda *S. aureus* subps *anaerobius’* un sebep olduğu infeksiyonda deri altı apseler genellikle visköz, sarımsı ve kokusuz olarak belirlenmiştir (Moller ve diğerleri, 2000).

1993 yılında Suudi Arabistan’daki bir keçi sürüsünde meydana gelen salgında 225 adet keçiden, semptom gösteren 61 adedinde *S. aureus* subps*. anaerobius* izole edilerek raporlanmıştır (Alhendi ve diğerleri, 1993).

Sudan’da 441 adet koyun 609 adet keçi ile yapılan bir çalışmada 24 adet koyunda ve 25 adet keçide yüzeysel lenf düğümlerinde apseler tespit edilmiştir. Apselerden yapılan ekimler sonucunda 18 adet koyunda ve 14 adet keçide *S. aureus* subps. *anaerobius* izole edilerek raporlanmıştır. Aynı çalışma sonucunda koyunlarda %4,1 keçilerde %2,3 prevalans oranı tespit edilmiştir (Khadeega ve diğerleri, 2020).

Tunus’ta 54 adet koyun sürüsünde yapılan çalışmada, yüzeysel lenf düğümlerindeki apse örneklerinde kazeöz lenfadenitis ve morel hastalığı tespit edilmiştir (Ben Said ve diğerleri, 2002).

1984 yılında Macaristan’da bir koyun sürüsünde, 2007 yılında ise Polonya’da bir keçi sürüsünde Morel hastalığı salgınları raporlanmıştır (Bajmocy ve diğerleri, 1984, Kaba ve diğerleri, 2007).

2000 yılında Fransa’dan Danimarka’ya ithal edilen Lacaune cinsi 104 adet koyun bulunan bir sürüde yapılan incelemeler sonucunda 2 adet koyunda *S.aureus* subps. *anaerobius* izole edilerek raporlanmıştır (Moller ve diğerleri, 2000).

Ülkemizde kazeöz lenfadenitis hastalığı yönünden birçok çalışma bulunmasına karşın Morel hastalığı varlığıyla ilgili bir literatür bilgiye rastlanmamıştır.

**2.6** ***C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps*. anaerobius’*un Patogenezi**

**2.6.1** ***C. pseudotuberculosis’*in Patogenezi**

Kazeöz lenfadenitis infeksiyonun patogenezisi tam olarak açıklanamamakla beraber, infeksiyonun oluşmasında iki faktörün etkili olduğu düşünülmektedir. Bu faktörlerden ilki, etkenin konaktaki savunma hücrelerinin litik etkisinden koruyan lipid tabakası, ikincisi ise vücuda yayılmasına da yardımcı olan ekzotoksinidir (Ayers, 1977; Brown ve diğerleri, 1986; İlhan, 2003; Pepin ve diğerleri, 1994).

*C.pseudotuberculosis’*in fakültatif hücre içi bir bakteri olmasında etkili olan lipid tabakasınında etkisi ile makrofaj içerinde çoğaldığı, çoğalan etkenlerin makrofajları parçalayarak serbest kaldığı ve serbest kalan bakterilerin ise dolaşımdaki fagositik hücreler ile tekrarlayan infeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Makrofaj içerisinde ise yerleşen etkenlerin 48 saat canlı kalabildiği tespit edilmiştir (Ayers, 1977; Bastos ve diğerleri, 2012; Brown ve diğerleri, 1986; İlhan, 2003; Pepin ve diğerleri, 1994; Stefanska ve diğerleri, 2010; Yeruhan ve diğerleri, 1997).

*C. pseudotuberculosis’*intüm suşları fosfolipaz D ekzotoksinini salgılamaktadır (Batey 1986; Brown ve diğerleri, 1986; Yozwiak 1993). Hem etkenin hücre duvarı yapısından hem de sitoplazmadan sentezlenen bu ekzotoksinin molekül ağırlığının 13-40 kDa arasında olduğu tespit edilmiştir (Brown ve diğerleri, 1986; Egen ve diğerleri, 1989).

Etken koyun ve keçilerde yaralardan vücuda girerek lenf yolu ile vücuda yayılarak, lenf yumrularında ve iç organlarda kazeöz lezyonlar oluşturmaktadır. İnfeksiyon ilk dönemi 1-4 gün arası sürmekte iken bölgede etkenin çoğalması, nötrofillerin artması ve pyogranuloma oluşurması 5-10 gün arası sürdüğü bildirilmiştir. İnfeksiyonun etkili olduğu bölgeler ile ilgili yapılan çok sayıda çalışmada özellikle akciğer, parotid ve retrofaringial lenf düğümünde kazeöz lezyonlara sebep olduğu belirtilmiştir (Baird ve Fontaine, 2007; Pepin ve diğerleri, 1994).

Farelerde yapılan bir çalışmada, direk etkenin farelere verilmesi sonucu apseler görüldüğü, aktif ekzotoksin enjeksiyonu sonrası ise lokal steril apseler görüldüğü raporlanmıştır (Brown ve diğerleri, 1986).

Keçilerde yapılan deneysel infeksiyonda ise etkenin beyaz kan hücrelerinden olan makrofajlarda etkili olduğu tespit edilmiştir (Tashjian ve Campbell, 1983; Pepin ve diğerleri, 1997; Stefanska ve diğerleri, 2010).

**2.6.2** ***S. aureus* subps*. anaerobius’*un Patogenezi**

*S. aureus* subps*. anaerobius* ve *S. aureus* subps*. aureus* hücre dışı toksin ve enzim varlığı sebebiyle birbirleri arasında yakından ilişkilendirilmiştir. Fakat patojenik yetenekleri açısından birçok farklılıklar vardır. *S. aureus* subps. *anaerobius*, koyun ve keçilerde yüzeysel lenf düğümlerinde apseler oluşturan Morel hastalığına neden olmaktadır (De la Fuente ve diğerleri, 1985; De la Fuente ve diğerleri, 1997; De la Fuente ve diğerleri, 2011).

*S.aureus* subps*. anaerobius* ve *S. aureus* subps*. aureus* arasındaki en önemli farklardan biri de *S.aureus* subps*. anaerobius*’un katalaz enzim aktivitesinin olmamasıdır. Bu durum *S. aureus* subps*. anaerobius*’un etkeninde meydana gelen genetik mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir (De la Fuente ve diğerleri, 1985; De la Fuente ve diğerleri, 1997; De la Fuente ve diğerleri, 2011; Sanz ve diğerleri, 2000).

*S. aureus* subps. *anaerobius* kaynaklı apselerin lokasyonları değişkenlik göstermekle birlikte genellikle deri altı bölgedeki lenf bölgelerinde ve yakınlarında yer almaktadır. İçeriği ise viskozi sarımsı ve kokusuz olarak belirlenmiştir (Moller ve diğerleri, 2000).

Kazeöz lenfadenitis hastalığına benzer klinik belirtilere sahip olan Morel hastalığında yüzeysel lenf düğümlerinde görülen apse odakları genellikle genç hayvanlarda özellikle ilk 6 aylık dönemde bulunan koyun ve keçilerde görülmektedir (De la Fuente ve diğerleri, 1997; Moller ve diğerleri, 2000).

Sudan’ da 1050 adet koyun ve keçi ile yapılan bir çalışmada koyunların keçilerden daha fazla infeksiyona maruz kaldığı ve apselerin çeşitli deri altı lenf düğümlerinde (parotid, prescapular, precrural, popliteal, supramammary, mandibular, retrofrangial, scrotum) görülebildiği belirtilmiştir. En fazla parotis (%36) ve prescapular (%20) lenf düğümlerindeki apselerden etkenin izole edildiği bildirilmiştir (Khadeega ve diğerleri, 2020).

**2.7** ***C.pseudotuberculosis* ve *S.aureus* subps*. anaerobius’*un Teşhisi**

**2.7.1** ***C. pseudotuberculosis’*in Teşhisi**

*C. pseudotuberculosis*’in bakteriyoskopik teşhişi için hazırlanan preperatlarda gram boyamada gram pozitif kokobasil ya da çomaklar aranmaktadır (Arda, 1997). Albert ve Neisser boyama yöntemi kullanılarak yapılan boyamalarda ise metakromatik granül yapıları net bir şekilde tespit edilmektedir (Jones ve Collins, 1986).

*C. pseudotuberculosis* %5 koyun kanlı agarda ya da % 5 koyun kanı içeren Colombia agarda üreyebilmektedir. Aerobik ortamda da üreyebilen etken % 5 CO2’li ortamda daha hızlı üremektedir. İdentifikasyon için katalaz, üreaz, nitrat redüksiyon ve bazı karbonhitrat fermantasyon testleri uygulanan bazı biyokimyasal testler arasındadır (Aydın, 1977; İzgür 1999; Lloyd ve diğerleri, 1990; Muckle ve Gyes, 1986; Sutherland ve diğerleri, 1993).

Günümüzde izole edilen *C. pseudotuberculosis* şüpheli kolonilerde APİ Coryne, Vitek 2, BD Phonix System, Malti-TOF MS System gibi bazı hazır tanı kitleri ve cihazları identifikasyon için kullanılmaktadır (Freney ve diğerleri, 1991; Zasada ve Mosiej, 2018).

Hastalığın teşhişi için hayvan deneyleri de kullanılmaktadır. Özellikle kobay, fare ve kuzular içerisinde etkene en duyarlı olan kobaylar en çok kullanılan deneme hayvanıdır. Letal etkisi için kobaylar, dermonekrotik etkisi için ise tavşanlar daha çok tercih edilmektedir (Batey, 1986).

Kazeöz lenfadenitis hastalığının serolojik olarak teshişi için birçok yöntem çalışılmıştır. Lam aglütinasyon, Tüp agütünasyon, mikro aglütünasyon, immünodiffüzyon, komplement fikzasyon, indirek hemaglütinasyon, Enzim Linked İmmunosorbent Assay (ELİSA) bunların bazılarıdır (Aydın, 1977; Burrel, 1980; Erganiş ve diğerleri, 1990; İlhan, 2013; Menzies ve diğerleri, 1994; Shigidi, 1979; Ter Laak ve diğerleri, 1992).

Ülkemizde hastalığın serolojik olarak teşhisi için yapılan bir çalışmada Koyunlarda *C.pseudotuberculosis*’in ELİSA ve Dot-Blot ELİSA yöntemi ile teşhişi geliştirilmiş ve uygulanabilirliği ortaya konulmuştur (İlhan, 2013). Kazeöz lenfadenitis hastalığın serolojik olarak teşhisi için ticari olarak üretilen ELİSA kitleri de mevcuttur.

*C. pseudotuberculosis’*in oluşturduğu infeksiyonun serolojik teşhişi için birçok ülkede çalışmalar yapılmıştır. 2007 yılında İngiltere’ de antikorlardan teşhisine yönelik bir ELİSA testi geliştirilmeye çalışılmıştır (Binns ve diğerleri, 2007). Brezilya’ da 2011 yılında hastalık kaynaklı antikorların tespiti için indirek ELİSA geliştirme çalışmaları yapılmıştır (Solanet ve diğerleri, 2011). İrlanda’ da 2009 yılında *C. pseudotuberculosis* kaynaklı infeksiyonların teşhişi için yüzey plazmon rezonansa dayalı yöntemin geliştirmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır ve Sandviç ELİSA ile karşılaştırması sonucu başarılı sonuçlar alınmıştır (Stapleton ve diğerleri, 2009).

*C. pseudotuberculosis*’in moleküler yöntemlerle tespitine yönelik yapılan çalışmalarda en çok Konvansiyonel PCR olmak üzere Real Time PCR (RT-PCR) ve Multipleks PCR kullanılmaktadır. Moleküler çalışmalarda genellikle canlı hayvandan alınan apse örnekleri, nekropsi sonrası alınan akciğer dokusu ve uygun besiyerlerinde üreyen *C. pseudotuberculosis* şüpheli koloniler materyal olarak kullanılmaktadır (Çetinkaya ve diğerleri, 2002; Khamis ve diğerleri, 2004; Pacheco ve diğerleri, 2007). 2007 yılında Pacheco ve arkadaşların yaptığı çalışma sonrası PLD gen bölgesi tespitleri ve 2012 yılında yine D’Afonseca ve arkadaşlarının PIP gen bölgesinin farklı bir bölümü ile yaptığı çalışmalar sonucu elde edilen primer grupları ile yapılan çalışmalar oldukça yaygındır (D’Afonseca ve diğerleri, 2012; Pacheco ve diğerleri, 2007).

*C. pseudotuberculosis* moleküler teşhisinde PLD gen bölgesinin tespitine yönelik ticari Real Time PCR kitleri de bulunmaktadır.

*C.pseudotuberculosis*’un virülens faktörlerinin tespitine yönelik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. PLD Ekzotoksin virülens geni dışında *SigE, SpaC, SodC, PknG, NanH, NrdH,* *CpaE, FagA, FagB, FagC, FagD, OppA, OppB, OppC, OppD, OppF* ve *CopC,* virülens gen bölgelerine yönelik çalışmalarda yapılmıştır (Li ve diğerleri, 2018; Pathirana ve diğerleri, 2022).

**2.7.2.** ***Staphylococcus aureus* subps*. anaerobius’*un Teşhisi**

*S. aureus* subsp*. anaerobius*’un bakteriyoskopik teşhişi için hazırlanan preperatlarda Gram boyamada, Gram pozitif kok etkenler aranmaktadır (De la Fuente ve diğerleri, 1985).

*S. aureus* subsp*. anaerobius* 37°C’ de % 5 koyun kanlı Columbia agarda, mikroaerofilik ortamda 24-48 saat inkübasyon sonucu hemoliz oluşturan koloniler meydana getirdiği çalışmalarda belirtilmiştir (De la Fuente ve diğerleri, 1985).

*S.aureus* subsp. *anaerobius* identifikasyonu Vitek 2 Compact System, BD Phonix System gibi sistemlerde tam tanımlama olmamaktadır. Cihazda uygulanan biyokimyasal testler ile değerlendirme yapılabilmektedir. Fakat Malti-TOF MS System kullanılarak etkenin teşhisi yapılabilmektedir (Slosarkova ve diğerleri, 2019).

*S. aureus* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda koagülaz geni (*coa*), metisilin direnç geni (*femA*) ve termonükleaz geni (*nuc*) gibi tür spesifik genler kullanılmaktadır. Hem coa hem de femA yüksek polimorfizm gösterir ve teşhis amaçları için uygun değildir. Aksine nuc, hem insan hem de hayvan izolatlarında türe özgü bir markör olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Pilla ve diğerleri, 2013).

*S. aureus* subsp*. anaerobius* biyokimyasal testler ile teşhisi zor olması nedeniyle moleküler olarak teşhişinin yapılması oldukça önemlidir (Musa ve diğerleri, 2010).

*S. aureus* subsp*. anaerobius*’un teşhişinde Konvansiyonel PCR ve Multilocus Sequence Typing yöntemleri kullanılmaktadır (Sanz ve diğerleri, 2000; Szaluś‑Jordanow ve diğerleri, 2018).

Szaluś‑Jordanow ve arkadaşların teşhiş için kullandığı Multilocus Sequence Typing yönteminde *yqiL, arcC, glp, tpi, gmk, pta* ve *aroE* gen bölgeleri kullanılmıştır (Szaluś‑Jordanow ve diğerleri, 2018).

**2.8.** ***C. pseudotuberculosis* ve *S. aureus* subps*. anaerobius’*un Koruma ve Tedavisi**

**2.8.1** ***C.pseudotuberculosis’*in Koruma ve Tedavisi**

*C. pseudotuberculosis* etkeninin hücre içine yerleşmesi ve apseli granülom oluşturan bir seyirde infeksiyon oluşturması nedeniyle tedavi için kullanılan antibiyotiklerin etkili olamadığı ve buna bağlı olarak hastalığın ciddiyetini koruduğu çalışmalar ile belirlenmiştir. Bu nedenle hastalığa karşı korunmada immunoproflaktik uygulamaların önemi yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Olson ve diğerleri, 2002; Sakmanoğlu ve diğerleri, 2015).

Hastalığın koyun ve keçilerde ekonomik olarak verdiği zararlar düşünüldüğünde Amerika, Kanada, Norveç gibi çeşitli ülkelerde aşı geliştirme çalışmalarına önem verilmiş, yüksek miktarda kaynaklar harcanmış ve aşı uygulamaları sıklaştırılmıştır (Eggleton ve diğerleri, 1991).

Özellikle hastalıktan korunmada etkenin tek varyasyonları değil birkaç kombinasyonlarını içeren, tüm hücre, hücre duvarı, toksoid aşılarla ilgili çalışmalar yapılmıştır (Brogden ve diğerleri, 1984; Cameron ve diğerleri, 1972; Ellis ve diğerleri, 1995).

PLD enzimi Kazeöz lenfadenitis infeksiyonun oluşmasında en önemli virülens faktör olarak olarak belirtilmektedir. PLD ekzotoksinin karakterizasyonu ve mekanizmasının belirlenmesiyle birlikte aşı yapımlarında kullanılması önem kazanmıştır (Egen ve diğerleri, 1989; Hodgson ve diğerleri, 1994).

Sakmanoğlu ve diğerleri (2015) ülkemizde yaptığı tez çalışmasında PLD enzimi kullanılarak geliştirdiği Rekombinant toksoid aşı denemesinde diğer PLD aşı çeşitlerine göre immun yanıtın daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

*Clostridium tetani, Clostridium septicum, Clostridium novyi* ve *Clostridium chauvoei* ile oluşabilecek infeksiyonları engellemek için aşılar ile kombine olarak inaktif PLD toksini içeren ticari aşılar oldukça yaygındır (Paton ve diğerleri, 2003; Piontkowski ve diğerleri, 1998; Stanford ve diğerleri, 1998; Wiiliamson, 2001). Kombine aşılar uygulandığı sürülerde apselerde sayı ve büyüklüklerin azaldığı raporlanmıştır ve bu şekilde saçılımında azaldığı belirtilmiştir (Paton ve diğerleri, 2003; Williamson, 2001).

Yapılan bir çalışmada ise kombine aşılara kıyasla monovalan aşı uygulamalarının hastalığa karşı daha başarılı olduğu belirtilmiştir (Anderson ve Narin, 1984).

Sivas ilindeki Küçükbaş Hayvanları Yetiştiricileri Birliği üyelerinin sürülerinde hayvanlarda çok yaygın Kazeöz lenfadenitis hastalığı görülmesi üzerine TAGEM tarafından desteklenen bir projede sahadan elde edilen suşlar ile otovaksin aşı geliştirilip 90000 doz olarak 2007-2010 yılları arasında uygulanmıştır (Erganiş ve diğerleri, 2012).

Hastalığın tedavisinde oluşan apselerin kalın kapsüler yapısından dolayı antibiyotiklerin etkili olamadığı, uygulanan tedavilerden de yeterli sonuçların alınmadığı bildirilmiştir. Fakat etkenin invitro şartlarda amoksisilin, ampisilini linkomisin, kloramfenikol, gentamisin, penisilin G, neomisin ve tetrasiklin ‘e duyarlı olduğu belirtilmiştir (Brown ve Olander, 1987; İzgür, 1999).

Ülkemizde 72 adet *C. pseudotuberculosis* izolatı ile yapılan bir çalışmada, in vitro antibiyotik duyarlılık testinde, izolatların seftiofur (%91.6), oksitetrasiklin (%81.9), linkomisin (%37.5), enrofloksasin (%83.3), gentamisin (%81.9), penisilin G (%83.3), rifamisin (%81.9), florfenikol (%98.6), eritromisin (%69.4), sulbaktam+ampisilin (%76.3), kloksasilin (%55.5), ampisilin (%37.5), telitromisin (%91.6), novobiosin (%95.8), spiramisin (%58.3) ve amoksisiline (%77.7) oranında duyarlı olduğu belirtilmiştir ( Sakmanoğlu ve diğerleri, 2015).

Yine ülkemizde 2020 yılında 16 *C. pseudotuberculosis* suşu ile yapılan bir çalışmada, suşlardan 13 (%81.2) adeti neomisin/basitrasin/tetrasikline, 11 (%68.7) adeti oksitetrasikline, 11 (%68.7) adeti amoksisilin/klavulanik asite, 14 (%87.5) adeti enrofloksasine, 10 (%62.5) adeti kloksasiline, 9 (%56.2) adeti tetrasikline, 12 (%75.0) adeti penisilin/novobiosine, 5 (%31.2) adeti ampisilin/sulbaktama ve 3 (%18.7) adeti ise trimetoprim/sulfametaksazole duyarlı bulunmuştur (İlhan, 2020).

**2.8.2** ***S. aureus* subps*. anaerobius’*un Koruma ve Tedavisi**

*S. aureus* subsp. *anaerobius* koyun ve keçilerde neden olduğu Morel hastalığı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmadığı için koruma ve tedavisi ile ilgili kaynaklar sınırlıdır.

Genç koyun ve keçilerde daha etkili olan infeksiyon ekonomik olarak olarak ciddi kayıplara neden olduğu için birkaç aşı çalışması yapılmıştır. Morel hastalığı ile mücadele için 1988 yılında inaktif aşı denemeleri ilk kez kullanılmıştır. Aşının sürüde bulaşmayı azalttığı ve hastalık oranını da %65 oranında düşürdüğü raporlanmıştır (Elhaj ve diğerleri, 2009).

1996 yılında hastalığı karşı kültür, toksoid ve kapsül antijenleri ile hazırlanan bir aşı denemesinde ise koyunlarda %96’lık bir koruma elde edildiği bildirilmiştir (Rodwan, 1996, Elhaj ve diğerleri, 2009).

2009 ise hastalığı karşı üç aşı tipi karşılaştırılmış, en etkili koruma sağlayan aşının %85 ile (%60 bakteri hücresi+40 toksoid) içeren aşı numunesinin olduğu diğerlerinin sıra ile %78 (%50 bakteri hücresi+50 toksoid), %60 (Formüle edilmiş toksoid) olduğu belirtilmiştir (Elhaj ve diğerleri, 2009).

Morel hastalığının antibiyotik ile tedavisine yönelik çok fazla çalışma olmamasına karşın 2010 yılında Sudan’ da 17 adet *S. aureus* subsp*. anaerobius* ST1464 ile yapılan bir çalışmada siprofloksasin, sefalotin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, fusidik asit, gentamisin, kanamisin, klindamisin, oksasilin, ve penisilin ‘e karşı tüm suşların duyarlı olduğu bildirilmiştir (Elbir ve diğerleri, 2010).

**3. GEREÇ VE YÖNTEM**

**3.1. Gereç**

**3.1.1. İzolasyon Örnekleri**

Araştırma materyalini Ege bölgesinde yetiştiriciği yapılan koyun ve keçilerde meydana gelen deri altı apse örnekleri oluşturmaktadır. Örneklemeler Ege bölgesinde yer alan Aydın, İzmir, Kütahya, Manisa, Denizli, Uşak, Muğla ve Afyonkarahisar illerindeki küçükbaş yetiştiriciliği yapan sürülerde oluşan deri altı apselerin sebebinin teşhisi amacıyla Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına gelen materyaller oluşturmuştur. Çalışmadaki örneklerin yer ve sayı olarak dağılımı Tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 4.** Araştırma materyallerinin illere göre dağılımı.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| İl | Koyun apse örneği sayısı | Keçi apse örneği sayısı |
| İzmir | 8 | 8 |
| Aydın | 6 | 6 |
| Manisa | 6 | 6 |
| Muğla | 6 | 6 |
| Denizli | 6 | 6 |
| Uşak | 6 | 6 |
| Kütahya | 6 | 6 |
| Afyonkarahisar | 6 | 6 |
| Toplam | 50 | 50 |

**3.1.2. Standart Suşlar**

Çalışmada *Corynebacterium pseudotuberculosis*’lerin belirlenmesi amacıyla pozitif kontrol olarak *Corynebacterium pseudotuberculosis* NCTC 3450 Suşu,(Atafen A.Ş.) *Staphylococcus aureus*’ların belirlenmesi için ise, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923( Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü) Suşu kullanılmıştır.

**3.1.3 Kullanılan Besi Yerleri, Solusyonlar, Ayıraçlar**

**3.1.3.1. Kanlı Agar (Merck 1.10886)**

Pepton 10 gr/l

Triptoz 10 gr/l

Sodyum klorür 5 gr/l

Agar 15 g/l

Distile Su 1000 ml

pH (25°C) 7,3±0,2

40 gram besi yeri 1 litre distle su ile homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Sonra 121°C 15 dakika şeklinde ayarlanan otoklavda otoklandı. Besi yeri 50°C’ye kadar soğuduktan sonra içerisine %5 olacak şekilde defibrine koyun kanı ilave edilip her steril petride 12,5 ml olacak şekilde dökülüp soğumaya bırakıldı.

**3.1.3.2. Brain Hearth Infusion Broth (Oxoid-CM1135)**

HM infüzyon toz 12,5 g/l

BHI tozu 5 g/l

Proteoz pepton 10 g/l

Dekstroz (Glukoz) 2 g/l

Sodyum klorür 5 g/l

Disodyum hidrojen fosfat 2,5 g/l

Distile Su 1000 ml

pH (25°C) 7,4±0,2

37 gram besi yeri 1 litre distle su ile homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Sonrasında her bit tüpte 5 ml olacak şekilde dağıtılıp 121°C 15 dakika şeklinde ayarlanan otoklavda otoklandı. Otoklavlama öncesinde toplam içerikte %20 gliserin olacak şekilde besi yeri içerisine gliserin ilave edildi.

**3.1.3.3. Oksidaz Ayıracı (Oxoid, BR 64)**

Gram boyama uygulması sonrası şüpheli kolonilere oksidaz aktivitelerinin kontrolü için, oksidaz çubukları (Oxoid) ile bakıldı. Oksidaz çubuğunda mor renk gösteren koloniler pozitif, renk değişikliği olmayan koloniler negatif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

**3.1.3.4. Katalaz Testi (Himedia®)**

Lam üzerine 1 ml %3’lük H2O2 damlatılarak üzerine öze ile şüpheli koloniden alınarak karıştırıldı. Hava kabarcığı oluşturan koloniler katalaz pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

**3.1.3.5. Gram Boyama Kiti (Liofilchem)**

Kristal Violet Solüsyonu 250 ml

Dekolorizer 250 ml

İodine Solüsyonu 250 ml

Safranin solüsyonu 250 ml

Yukarıda verilen solüsyonu içeren Liofilchem marka hazır Gram Boyama kiti kullanılmıştır.

**3.1.3.6. Vitek 2 Kullanım Solüsyonu**

4,5 gram Sodyum klorür ile 1 lt distile su ile karıştırılarak homojenize edildikten sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. Vitek 2 cihazında şüpheli kolonilerin identifikasyonu için kullanılması gereken solüsyondur.

**3.1.3.7. Vitek 2 CBC Kiti**

*Corynebacterium* cinsi benzeri şüpheli etkenlerin Vitek 2 ile identifikasyonunda kullanılan kittir.

**3.1.3.8. Vitek 2 GP Kiti**

Gram pozitif bakterilerin Vitek 2 ile identifikasyonunda kullanılan kittir.

**3.1.3.9. DNA Ekstraksiyon Kiti**

Hedef DNA’nın ekstraksiyonunda High Pure PCR Template Preperation ticari kiti (Roche) kullanıldı.

**3.1.3.10. Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye (Grisp)**

Mastermix olarak Grisp marka Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) kullanıldı.

**3.1.3.11.** **Xpert Green DNA Stain Direct (Grisp)**

Elektroforez işleminden önce görüntüleme için Grisp marka Xpert Green DNA Stain Direct kullanıldı.

**3.1.3.12. 50X TAE (Tris, Asetik Asit, EDTA) Elektroforez Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific®)**

1X TAE Kullanma Solüsyonu

Tris Base 40 M

Asetik Asit 20 M

EDTA 1 mM 1X

TAE Kullanma Solüsyonu Hazırlanışı

50X TAE 10 ml

Distile su 490 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlanmıştır.

**3.1.3.13. Marker (Grisp)**

Marker olarak Grisp marka GRS Universal Ladder (50 ug) kullanıldı.

**3.1.3.14. Agaroz (Sigma)**

Jel Agaroz jel hazırlanmasında Sigma marka agaroz kullanılmıştır.

**3.1.4.Kullanılan Cihazlar**

**3.1.4.1. VITEK 2 Compact**

VITEK 2 Compact Cihazı bakteri, maya ve mantar örnekleri için identifikasyon ve antibiyogram uygulamaları yapan bir cihazdır.

**3.1.4.2. Santrifüj**

Santrifüj işlemleri için 24 örnek kapasiteli Thermo MicroCL17 santrifüj cihazı kullanılmıştır.

**3.1.4.3. Termal Döngüleme**

PCR işlemi 96 örnek kapasiteli Techne-TC412 termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

**3.1.4.4. Elektroforez**

Elektroforez işlemi Thermo marka elektroforez tankında, güç kaynağı olarak Thermo Fisher Scientific® Electron Corporation cihazı kullanılmıştır.

**3.1.4.5. Görüntüleme**

Görüntüleme işlemi Er Biyotek Fx51/FxT (Er Biotek, Türkiye) marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

**3.1.4.6. Hassas Terazi**

Tartım işlemleri için Santorius TE2145 ( Sartorius AG- Almanya) marka hassas terazi kullanılmıştır.

**3.1.5. Primerler**

Araştırmada kullanılan *Corynebacterium pseudotuberculosis, Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus aureus subp. anaerobius* türlerinin PCR analizi ile tespitinde kullanılan primer dizilimleri Brakstad ve diğerleri (1992), D’Afonseca ve diğerleri (2010) ve Sanz ve diğerleri (2000)’nin çalışmalarında belirtildiği şekilde üretici firmaya dizayn ettirilmiştir (Tablo 5). *Staphylococcus aureus* subps*. anaerobius*’un pozitif kontrolü için ise cat808F 5´ CTCCATTTTAGAACGCAACAA 3´ ve cat1583R 5´ TGGGTCAGCTTTGTAACA 3´ uygun olacak şekilde sentetik gen dizisi dizayn ettirilip pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

**Tablo 5.** PCR analizinde kullanılan primer dizilimleri

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Hedef** | **Primer İsmi** | **Primer Dizilimi** | **PCR Ürün Büyüklüğü** | **Kaynak** |
| *Corynebacterium pseudotuberculosis* | PIP F  PIP R | 5’-AACTGCGGCTTTCTTTATTC-3’,  5’-GACAAGTGGGAACGGTATCT-3’ | 551 bp | D’Afonseca ve diğerleri,2010 |
| *Staphylococcus aureus* | Nuc F  Nuc R | 5’-GCGATTGATGGTGATACGGTT 3’,  5’-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3’ | 279 bp | Brakstad ve diğerleri, 1992 |
| *Staphylococcus aureus* subps*. anerobius* | cat808F  cat1583R | 5´ CTCCATTTTAGAACGCAACAA 3´  5´ TGGGTCAGCTTTGTAACA 3´ | 775 bp | Sanz ve diğerleri, 2000 |

**3.2. Yöntem**

**3.2.1. Örnekleme**

Çalışma materyelini 2021 ile 2023 yılları arasında Ege bölgesi illerinde yetiştiriciliği yapılan koyun ve keçilerden kazeöz lenfadanitis ve morel hastalığı şüphesi ile Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Teşhis Laboratuvarı gelen apse örnekleri oluşturmuştur. Gelen örnekler tez çalışması yapılana kadar -20**° ‘**de saklandı.

**3.2.2. *C.pseudotuberculosis* ve *S.aureus* subsp*. anaerobius’* un İzolasyonu**

Steril enjekörler içerisinde gelen apse örnekleri 1 ml steril boş plastik petrilere damlatıldı. Petri üzerindeki apse örneklerinden 1 öze dolusu alınarak %5 koyun kanı içeren kanlı agara ekildi. Mikroerofilik şartlarda 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

*C.pseudotuberculosis* için inkubasyon sonrası küçük, beyaz, kuru ve kolay parçalanan koloniler, Gram boyama metodu ile boyandı. Gram pozitif, küçük koko-basiller seçilerek subkültürleri yapıldı. Katalaz pozitif, oksidaz negatif koloniler *C. pseudotuberculosis* şüpheli belirlenip olarak saklandı (Erganiş ve diğerleri, 1990; Baird ve Fontaine, 2007).

*S.aureus* subsp*. anaerobius* için inkubasyon sonrası küçük, hemoliz oluşuran koloniler, Gram boyama metodu ile boyandı. Gram pozitif koklar seçilerek katalaz negatif ve oksidaz negatif reaksiyon veren koloniler *S. aureus* subsp*. anaerobius* şüpheli olarak saklandı (De la Fuente ve diğerleri, 1985).

**3.2.3. Gram Boyama**

Üreyen şüpheli koloniler gram boyama tekniği ile boyaması yapılmıştır. Gram boyama uygulaması için lam üzerine 1 damla fizyolojik tuzlu su damlatılıp *C.pseudotuberculosis ve S.aureus subsp. anaerobius* şüpheli kolonilerden alınarak homojen hale getirilip oda şartlarında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lam fiziksel fiksasyon işlemi için alevden 3 kez geçirilmiştir. Tespit yapılmış ve sonrasında soğumaya bırakılmış lam üzerine ilk olarak kristal violet solusyonu damlatılmış ve 2 dakika boyanması için bırakılmıştır. Ardından boya dökülüp lamın yıkınması için distle su kullanılmıştır. Yıkanan lam üzerine lugol solusyonu koyulup ve 1 dakika beklenmiştir. 1 dakika bittiğinde lügol solüsyonu dökülüp lamın yıkınması için distle su kullanılmıştır. Preperat üzerine decolorizasyon sıvısı eklenerek 10-15 saniye beklenmiş ve ardından lam distile su ile yıkanmıştır. Sonrasında lam üzerine safranin solüsyonu eklenmiş ve 30 saniye boyamaya bırakılmıştır. Ardından preperat bol distile su ile yıkanmış ve kurutma kağıdı ile kurutulmuştur. Elde edilen boyanmış preperatlar ışık mikroskobu altında 100x objektif ile değerlendirilmeye alınmıştır (Arda, 1997).

**3.2.4. Bakteriyel İzolatların VITEK 2 Compact Cihazı ile İdentifikasyonu**

VITEK 2, Vitek Sistem’in geliştirilmesiyle oluşturulmuş, üreme bazlı teknolojiyle çalışan tam otomatize bir mikrobiyolojik tanımlama sistemidir. Genişletilmiş kapasite ve otomasyon olarak birbirinden farklı üç formatta bulunur; VITEK 2 Compact, VITEK 2 ve VITEK 2 XL. Her üç sistem de aynı kalorimetrik kartları kullanacak şekilde tasarlanmıştır (Pintus, 2006). Bu sistem çeşitli mikrobiyal tanımlama kartlarında bulunan biyokimyasal reaksiyonlar sonucu üretilen optik bir sinyali değerlendirme üzerine kurulmuştur. Bilinmeyen mikroorganizmanın standart süspansiyonu cihaz içine yüklendikten sonra, cihaz içinde kart inkübe edilir ve cihazın içindeki optik okuyucu tarafından okunur. VITEK 2 veri tabanındaki sonuçların bilinen türlere özgü reaksiyonlarla karşılaştırılması ile de mikroorganizma tanımlanır (Hata ve diğerleri, 2007). VITEK 2 Compact tanımlama sisteminde, Gram negatif bakteriler (VITEK 2 GN ID Kart), Gram pozitif bakteriler (VITEK 2 GP ID Kart), mayalar (VITEK 2 YST ID Kart), Basiller (VITEK 2 BCL ID Kart), Neisseria/Heamophilus gibi zor üreyen bakteriler için (VITEK 2 NH ID Kart), anaerop (VITEK 2 ANC ID Kart) ve Corynebacterium grubu bakteriler için (VITEK 2 CBC ID Kart) olmak üzere yedi farklı tanımlama kartı bulunmaktadır. Antibiyogram kartı olarak ise Gram negatif bakteriler (enterik–enterik olmayan), Gram pozitif bakteriler (stafilokok, streptokok&enterokok, pnömokok) ve mayalar için farklı kartlar kullanılmaktadır. Reaktif kartları, her biri ayrı test substratı içeren altmış dört kuyucuğa sahiptir. Substratlar asidifikasyon, alkalinizasyon, enzim 28 hidrolizi ve inhibitör maddeler varlığında üreme gibi çeşitli metabolik aktiviteleri ölçerler. Kartın her iki yanında bulunan şeffaf optik bir film, organizma substrat karışımı ile teması önleyen sızdırmaz kapillerleri içerirken uygun seviyedeki oksijenin geçişine izin verir. Kartlar üzerinde ürün tipi, lot numarası ve son kullanma tarihini içeren bilgiler yer alır. Kart içinde test edilen biyokimyasal reaksiyonlar gliserol, D-galaktoz, D-maltoz, D-rafinoz, D-mannoz, D-sorbitol gibi yirmi adet karbonhidrat testi ile; nitrojen kaynağı kullanımı ve enzimatik testler; N-asetilglukozamin, lösin-arilamidaz, gama-glutamil-transferaz, α-glikozidaz, üreaz şeklinde enzimatik testleri de içermektedir (P). Cihaz hazırlanmış kültür süspansiyonunu otomatik olarak tüp içinden alır ve inkübe eder. 35.5°C’de 18 saat inkübe edilen kartlar, her 15 dakikada bir optik olarak okunur (Felmingham ve Brown, 2001). Bu okumalara dayanarak, bir tanımlama profili oluşturulur ve belirli bir algoritmaya göre yorumlanır. Nihai profil sonuçları veri tabanıyla karşılaştırılarak bilinmeyen organizmanın tanımlanması sağlanır. Tanımlama profili oluşturulması ve yorumlanması ise şu şekilde gerçekleşir; kartın optik olarak okunduğu ilk an ile sonraki okumalardaki ışık yansıması oranlanır ve yüzde değişimi elde edilir. Her kuyucuk, yani her test için bu değişim oranı, o test için belirlenmiş eşik değer ile karşılaştırılarak test pozitif veya negatif olarak değerlendirilir. Yüzde değişim oranı; eşik değerden küçük ise test negatif, eşik değere eşit veya eşik değerden büyükse test pozitif olarak okunur. Pozitif veya negatif sonuçlar biyolojik bir sayıya çevrilir. Mikroorganizmanın adlandırılması ise, test edilen kimyasal maddelerin cihaz veri tabanında bulunan biyolojik sayıya yaklaşma olasılığına çevrilmesi ile gerçekleşir. Tanımlanan mikroorganizma türü ve antibiyotik duyarlılık paternine göre 4-18 saat içerisinde cihaz tarafından sonuç verilmektedir.

*Corynebacterium pseudotuberculosis’*in identifikasyonu için Vitek 2 CBC kiti kullanılmıştır. 24 saatlik taze şüpheli koloniler Vitek 2 cihazı için hazırlanan tüplere Vitek 2 solüsyonu içerisinde Mc Farland 3,0 koloni yoğunluğuna göre ayarlanıp Vitek 2 CBC kiti ile cihaza verilmiştir. Cihazdan elde edilen biyokimyasal identifikasyon verileri dikkate alınmıştır.

*Staphylococcus aureus subsp. anaerobius’*un identifikasyonu için Vitek 2 GP kiti kullanılmıştır. 24 Saatlik taze şüpheli koloniler Vitek 2 cihazı için hazırlanan tüplere Vitek 2 solüsyonu içerisinde Mc Farland 0,60 koloni yoğunluğuna göre ayarlanıp Vitek 2 GP kiti ile cihaza verilmiştir. Cihazdan elde edilen biyokimyasal identifikasyon verileri dikkate alınmıştır.

**3.2.5 PCR Tekniği**

**3.2.5.1 DNA Ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonu kit talimatına uygun olarak yapıldı.

1. Örneklere 200 μl Tissue Lysis Buffer ve 40 μl Proteinase K ilave edilip 55 °C’de 60 dk inkübasyona bırakıldı.

2. Örneklerin üstüne 200 μl Binding Buffer ilave edildi ve karıştırıldı.

3. 10 dakika 70 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Aynı zamanda elution buffer da örnek sayısına uygun bir şekilde 70 °C sıcaklıkta en son aşama için bekletilmeye başlandı.

4. Her tüpe 100 μl isopropanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.

5. Örnek miktarı kadar ‘collection tüp’ çıkartıldı ve her birine filtreli tüp yerleştirildi.

6. Elde edilen materyal collection tüplere aktarıldı. 8000 xg’de 1 dakika santrifüj işlemi uygulandı.

7. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collection tüplere alındı.

8. Her bir tüpe 500 μl inhibitör removal buffer ilave edildi. 8000xg de 1 dakika santrifüj işlemi uygulandı.

9. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collection tüplere alındı.

10. Her tüpe 500 μl wash buffer ilave edildi.8000 xg’de 1 dakika santrifüj işlemi uygulandı.

11. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collection tüplere alındı.

12. Her tüpe 500 μl wash buffer ilave edildi. 8000xg’de 1 dakika santrifüj işlemi uygulandı.

13. Collection tüplerdeki sıvı döküldü ve tekrar 13000xg de 10 sn spin yapıldı.

14. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler 1,5ml’lik ependorflara alındı.

15. Her tübe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 70°C’de bekletilmekte olan elution bufferdan 200 μl eklendi.

16. 8000xg de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı.

17. Filtreli tüpler atıldı ve DNA’lar ependorflar içinde elde edildi. Elde edilen DNA’lar moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

**3.2.5.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis’*in PCR Amplifikasyon Aşaması**

*C. pseudotuberculosis* genomunda, PIP genlerini içeren patojenite adacıkları vardır. *C. pseudotuberculosis* izolatlarında PIP gen bazlı PCR araştırıldı ve PIP pozitif izolatların tamamı *C. pseudotuberculosis* olarak tanımlandı(D’Afonseca ve diğerleri, 2010; Parın ve diğerleri, 2018).

*C.pseudotuberculosis’*in teşhisinde kullanılan PIP genine ait PCR karışım oranı Tablo 6’da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** *C.pseudotuberculosis’*in teşhisinde kullanılan PIP genine ait PCR karışım bileşenleri tablosu.

|  |  |
| --- | --- |
| **Bileşenler** | **Hacim** |
| Mastermix | 12,5 µl |
| Primer Forward | 2 µl |
| Primer Reverse | 2 µl |
| Materyel DNA | 5 µl |
| Nükleaz free su | 3,5 µl |
| **Toplam** | **25 µl** |

PIP geni için uygulanacak PCR protokolü Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** *Corynebacterium pseudotuberculosis’*in teşhisinde kullanılan PIP genine ait uygulanacak PCR protokolü (D’Afonseca ve diğerleri, 2010).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Aşamalar** | **Sıcaklık (ºC)** | **Süre (dk)** | **Döngü sayısı** |
| İlk Denatürasyon | 95ºC | 10 | 1 |
| **PZR Amplifikasyonu** | | | |
| Denatürasyon | 95ºC | 1 | 35 |
| Annealing | 54ºC | 1 |
| Uzama | 72ºC | 2 |
| Son Uzama | 72ºC | 10 | 1 |
| Bekletme | 4ºC | ∞ | - |

Protokol sonucu elde edilen amplikonlar diğer aşamaya geçilene kadar 4˚C’de saklandı. D’Afonseca ve diğerleri (2010) tarafından belirtilen şekilde *PIP* geni varlığı araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısıl döngü protokolleri uygulanmıştır.

**3.2.5.3 *S.aureus* subsp*. anaerobius’un* PCR Amplifikasyon Aşaması**

*S. aureus* subsp*. aureus ve S.aureus* subsp*. anaerobius’*unkatalaz enzim aktivitesindeki farkılık sebebiyle *katA* ve *katB* gen bölgeleri incelendiğindebazı gen bölgelerindeki mutasyonlar belirlenmiş ve bu gen mutasyon bölgeleri nedeniyle *S.aureus* subsp*. anaerobius’*un katalaz enzim aktivitesi olmadığı düşünülmüştür (Sanz ve diğerleri, 2000).

*S.aureus* subsp*. anaerobius’*un teşhisinde öncelikle *S. aureus*’un teşhişinde kullanılan *nuc* genine yönelik PCR çalışması yapılmıştır. *nuc* geni tespit edilen DNA örneklerine ise *S.aureus* subsp*. anaerobius’*un teşhisinde kullanılan katalaz enzim aktivitesi eksikliği ile bağlantılı *cat808F*, *cat1583R* gen bölgesine yönelik PCR çalışması yapılmıştır (Brakstad ve diğerleri, 2010; Musa ve diğerleri, 2012; Sanz ve diğerleri, 2000). Kullanılan *nuc* genine ait PCR karışım oranı Tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** *S.aureus’*in teşhisinde kullanılan *nuc* genine ait PCR karışım bileşenleri tablosu.

|  |  |
| --- | --- |
| **Bileşenler** | **Hacim** |
| Mastermix | 12,5 µl |
| Primer Forward | 2 µl |
| Primer Reverse | 2 µl |
| Materyel DNA | 5 µl |
| Nükleaz free su | 3,5 µl |
| **Toplam** | **25 µl** |

*nuc* geni için uygulanacak PCR protokolü Tablo 9’da verilmiştir.

**Tablo 9.** *S.*aureus’un *nuc* genine ait PCR protokolü (Brakstad ve diğerleri, 1992).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Aşamalar** | **Sıcaklık (ºC)** | **Süre (dk)** | **Döngü sayısı** |
| İlk Denatürasyon | 95ºC | 10 | 1 |
| **PZR Amplifikasyonu** | | | |
| Denatürasyon | 95ºC | 1 | 35 |
| Annealing | 57,5ºC | 1 |
| Uzama | 72ºC | 2 |
| Son Uzama | 72ºC | 10 | 1 |
| Bekletme | 4ºC | ∞ | - |

Protokol sonucu elde edilen amplikonlar diğer aşamaya geçilene kadar 4˚C’de saklandı. Brakstad ve diğerleri (1992) tarafından belirtilen şekilde *nuc* geni varlığı araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısıl döngü protokolleri uygulanmıştır.

**Tablo 10.** *S. aureus subsp. anaerobius* ‘un *cat808F, cat1583R* gen bölgesine ait PCR karışım bileşenleri tablosu.

|  |  |
| --- | --- |
| **Bileşenler** | **Hacim** |
| Mastermix | 12,5 µl |
| Primer Forward | 2 µl |
| Primer Reverse | 2 µl |
| Materyel DNA | 5 µl |
| Nükleaz free su | 3,5 µl |
| **Toplam** | **25 µl** |

**Tablo 11.** *S. aureus* subsp*. anaerobius* ‘un *cat808F, cat1583R* gen bölgesine ait PCR protokolü (Sanz ve diğerleri, 2000; Musa ve diğerleri, 2012).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Aşamalar** | **Sıcaklık (ºC)** | **Süre (dk)** | **Döngü sayısı** |
| İlk Denatürasyon | 95ºC | 10 | 1 |
| **PZR Amplifikasyonu** | | | |
| Denatürasyon | 95ºC | 1 | 35 |
| Annealing | 52ºC | 1 |
| Uzama | 72ºC | 2 |
| Son Uzama | 72ºC | 10 | 1 |
| Bekletme | 4ºC | ∞ | - |

Protokol sonucu elde edilen amplikonlar diğer aşamaya geçilene kadar 4˚C’de saklandı. Sanz ve diğerleri (2000) tarafından belirtilen şekilde cat808F,cat1583R geni varlığı araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısıl döngü protokolleri uygulanmıştır.

**3.2.5.4 PCR ürünlerinin elektroforez tankına yüklenmesi**

PCR işleminden sonra elde edilen ürünlerden 10‘ar μl pipet yardımıyla alınıp, 2 μl Xpert Green DNA Stain Direct (Grisp) solüsyonu ile karıştırılmıştır. 10 µl DNA ürünü ve boya birlikte %2‘lik hazırlanan agaroz jelde uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir. İlk kuyucuğa 5 µl’lik marker marker, 2 μl Xpert Green DNA Stain Direct (Grisp) solüsyonu ile karıştırılıp koyulmuştur.

**3.2.5.5 Jelde yürütme**

Jel Agaroz hazırlanıp gerekli materyallerin yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez cihazı tankının üst kapağını kapatılıp, anot ve katot pozisyonlarını uygun bir şekilde bağlandıktan sonra 15 dakika 80 volt 500 amper akım ardından 40 dakika 40 volt 500 amper akımda yürütülmüştür.

**3.2.5.6. Görüntüleme ve değerlendirme**

Elektroforez uygulaması sonrasındaki jel, herhangi bir zarar vermeden dikkatlice elektroforez tankından çıkarılmıştır. İşlem sonrası yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki bölüme yerleştirilmiştir. Ultraviyole ışık altında fotoğraflandıktan sonra, her bir etkenin bant büyüklükleri dikkate alınarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

**3.2.6 İzolatların Genotiplendirilmesi**

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

**4. BULGULAR**

**4.1. Fenotipik İzolasyon Bulguları**

Çalışmamızda 100 adet apse örneklerinden kanlı agar üzerine ekimler yapılmış ve inkübasyon sonucu 48 (%48) örnekte üreme gözlemlenmiştir. Bunlardan küçük, beyaz, kuru ve kolay parçalanan koloniler, Gram boyama metodu ile boyanıp, gram pozitif, küçük koko-basiller seçilerek *C.pseudotuberculosis* şüpheli olarak kabul edildi. *Corynebacterium pseudotuberculosis* şüpheli 17 adet izolattan katalaz pozitif ve oksidaz negatif olanlar Vitek 2 Compact Cihazına CBC kiti ile identifikasyon için pasaj yapılmıştır.

Meydana gelen üremelerden küçük, hemoliz oluşuran koloniler, Gram boyama metodu ile boyanarak, Gram pozitif koklar olanlara katalaz ve oksidaz testi uygulandı. Katalaz ve oksidaz testi negatif olan 31 izolat *S.aureus* subsp*. anaerobius* şüpheli olarak kabul edildi.

**4.2. Vitek 2 Compact ile İdentifikasyon Bulguları**

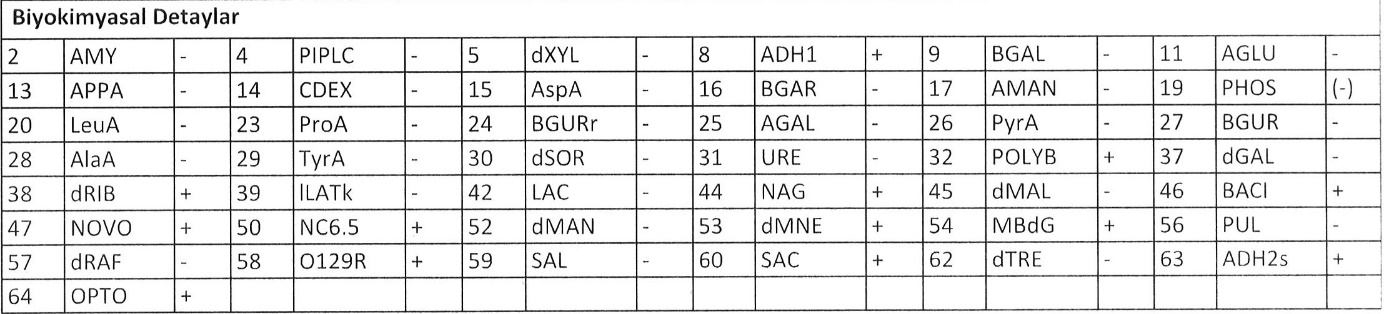
*C.pseudotuberculosis* şüpheli 17 adet izolat Vitek 2 CBC kiti ile Vitek 2 Compact cihazında biyokimyasal identikasyonu için tanımlaması yapılmıştır. Vitek 2 Compact cihazı tarafından 17 izolatın tamamı *C.pseudotuberculosis* olarak identifiye edilmiştir.

**Tablo 12.** *C.pseudotuberculosis* izolatına ait VITEK 2 Compact biyokimyasal testler



*S.aureus* subsp*. anaerobius* şüpheli 31 izolat ise Vitek 2 GP kiti kullanılarak Vitek 2 Compact cihazında biyokimyasal testleri incelenmiştir. Elde edilen biyokimyasal veriler ile *S.aureus* subsp*. anaerobius’*un biyokimyasal özellikleri karşılaştırılıp uyumlu bulunmuştur.

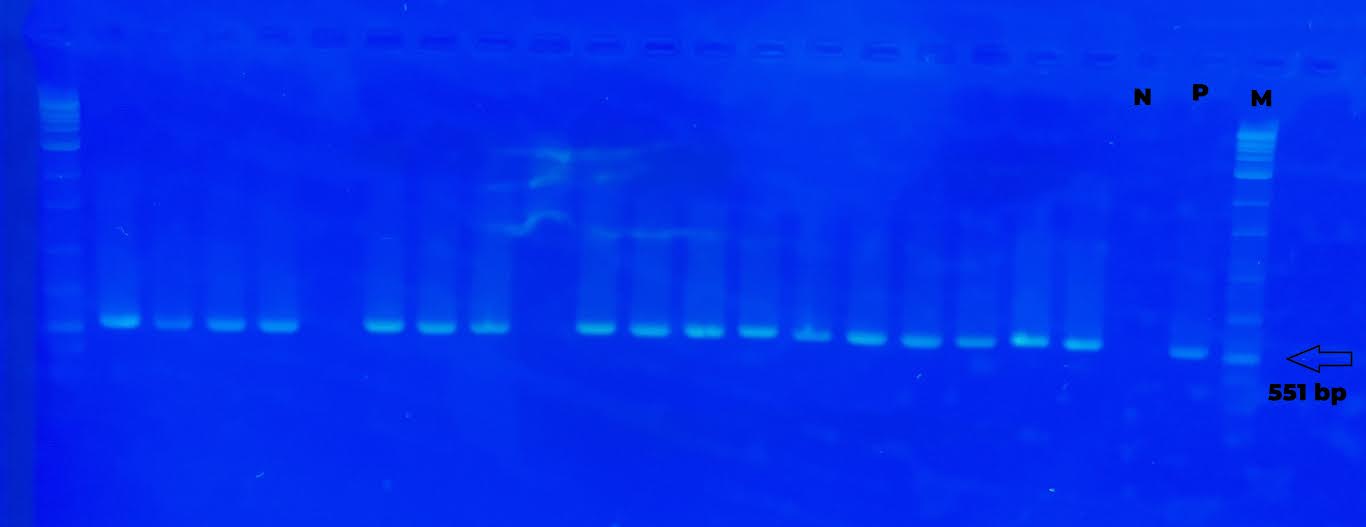
**Tablo 13.** *S.aureus* subsp*. anaerobius* izolatına ait VITEK 2 Compact biyokimyasal testler



**4.3. PCR Analizi Bulguları**

**4.3.1. *C.pseudotuberculosis’*in PCR ile İdentifikasyonu**

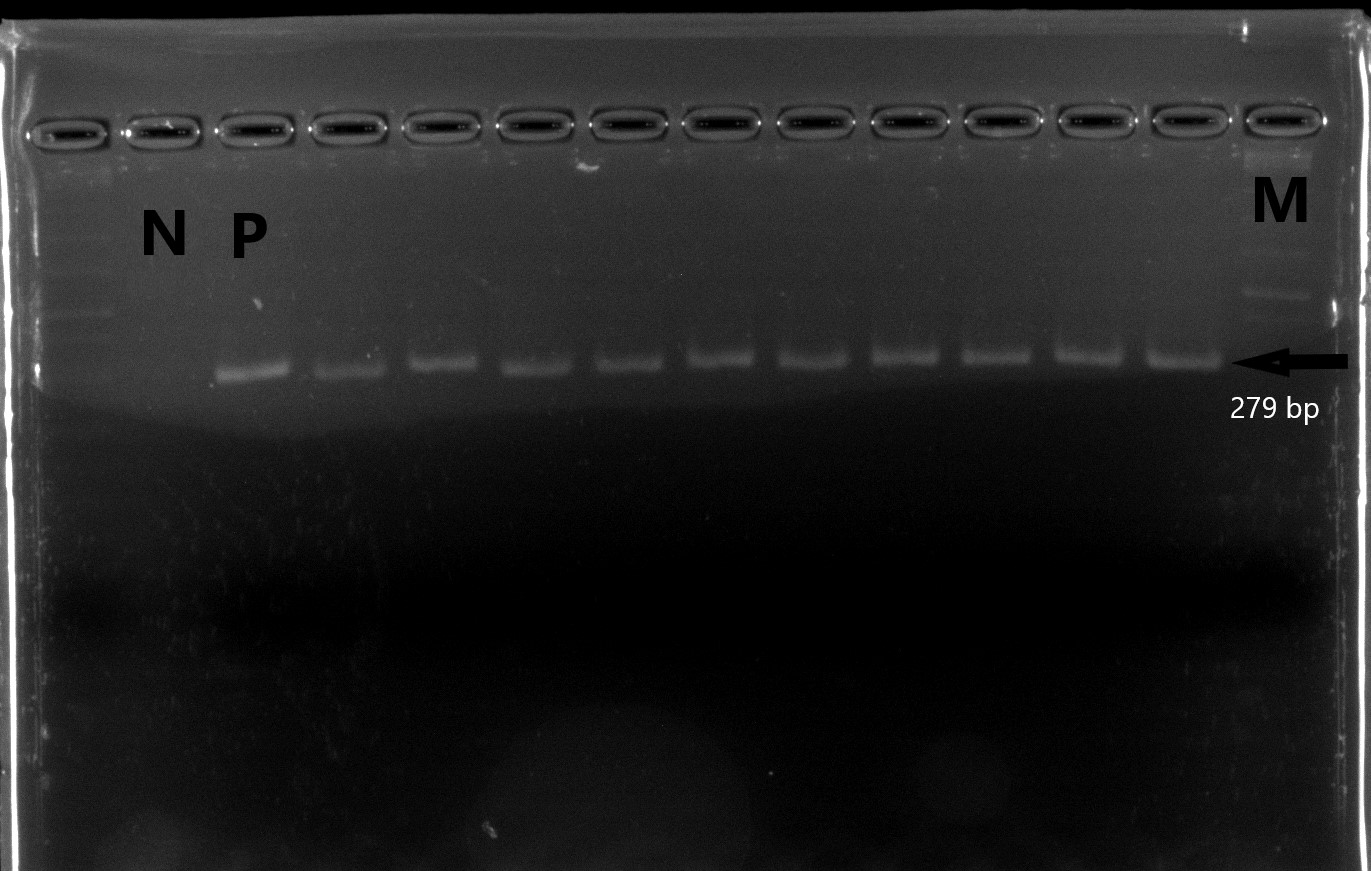
Konvansiyonel yöntemler ve Vitek 2 Compact sistem ile *C. pseudotuberculosis* olarak tespit edilen 17 adet izolata PIP gen bölgesi araştırılmaz üzere PCR analizi uygulanmıştır. Elde edilen amplikonların elektroforez işlemi sonucunda 551 bp aralağında bant verdiği tespit edilmiştir. Ve tüm izolatlar *C.pseudotuberculosis* olarak tanımlanmıştır. İzolatların elektroforez işlemi sonucu görüntüleme cihazındaki görüntüsü Şekil 1 de verilmiştir.



**Şekil 1.** *C.pseudotuberculosis* tür spesifik PZR’de elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüleri (551 bp) (M: 100 bp DNA marker; P: *C.pseudotuberculosis* Pozitif Kontrol; N: Negatif Kontrol Diğerleri: *C.pseudotuberculosis* izolatları ).

**4.3.2 *S. aureus’ un* PCR ile İdentifikasyonu**

Konvansiyonel yöntemler ve Vitek 2 Compact sistem *S.aureus* subsp*. anaerobius* olarak tespit edilen 31 adet izolata öncellikle *S.aureus* ait nuc gen bölgesi için PCR analizi uygulanmıştır. Elde edilen amplikonların elektroforez işlemi sonucunda 279 bp aralağında bant verdiği tespit edilmiştir, ve tüm izolatlar *S.aureus* olarak tanımlanmıştır. İzolatların elektroforez işlemi sonucu görüntüleme cihazındaki görüntüsü Şekil 2’de verilmiştir.



**Şekil 2.** *S.aureus* tür spesifik PZR’de elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüleri (279 bp) (M: 100 bp DNA marker; P: *S.aureus* Pozitif Kontrol; N: Negatif Kontrol Diğerleri: *S.aureus* subsp*. anaerobius* izolatları).

**4.3.3. *S.aureus*** **subsp*, anaerobius’ un* PCR ile İdentifikasyonu**

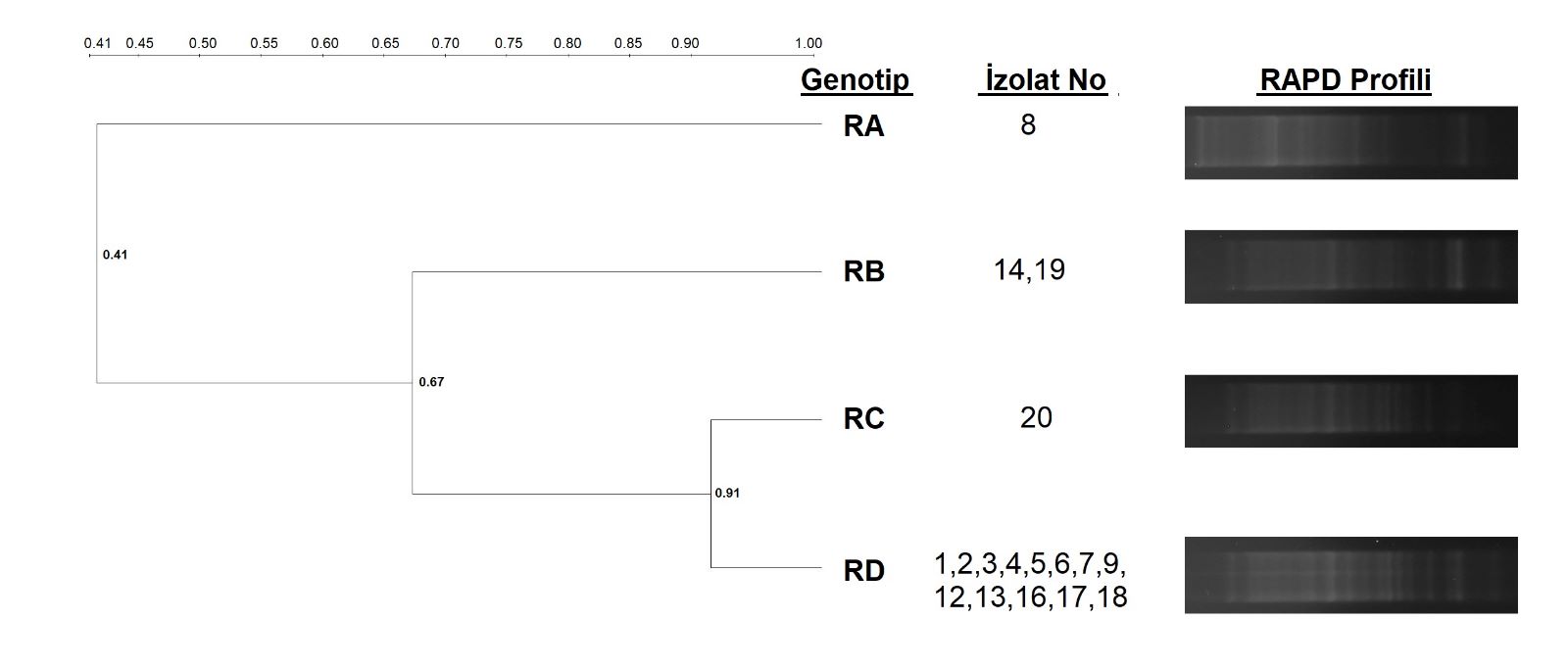
Konvalsiyonel yöntemler ve Vitek 2 Compact sistem *S.aureus* subsp. *anaerobius* olarak tespit edilen 31 adet izolata öncellikle *S. aureus* ait *nuc* gen bölgesi için PCR analizi uygulanıp tamamında nuc geni tespit edilmiştir. *S.aureus subsp, anaerobius* alt türünün tespiti için ise, *S.aureus* subsp*, anaerobius*’e spesifik *kat* geni ile belirlenecektir. Bu amaçla primer olarak cat808F ve cat1583R kullanılarak PCR analizi uygulanıp 771 bp aralağında bant verdiği tespit edilmiştir, ve 31 izolatın tamamı *S.aureus* subsp*. anaerobius* olarak tanımlanmıştır. İzolatların elektroforez işlemi sonucu görüntüleme cihazındaki görüntüsü Şekil 3’ de verilmiştir.



**Şekil 3.** *S.aureus* subsp*. anaerobius* tür spesifik PZR’de elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüleri (771 bp) (M: 100 bp DNA marker; P: *S.aureus* Pozitif Kontrol; N: Negatif Kontrol Diğerleri: *S.aureus* subsp*. anaerobius* izolatları ).

**4.3.4. *C.pseudotuberculosis’*in Genotiplendirme Sonuçları**

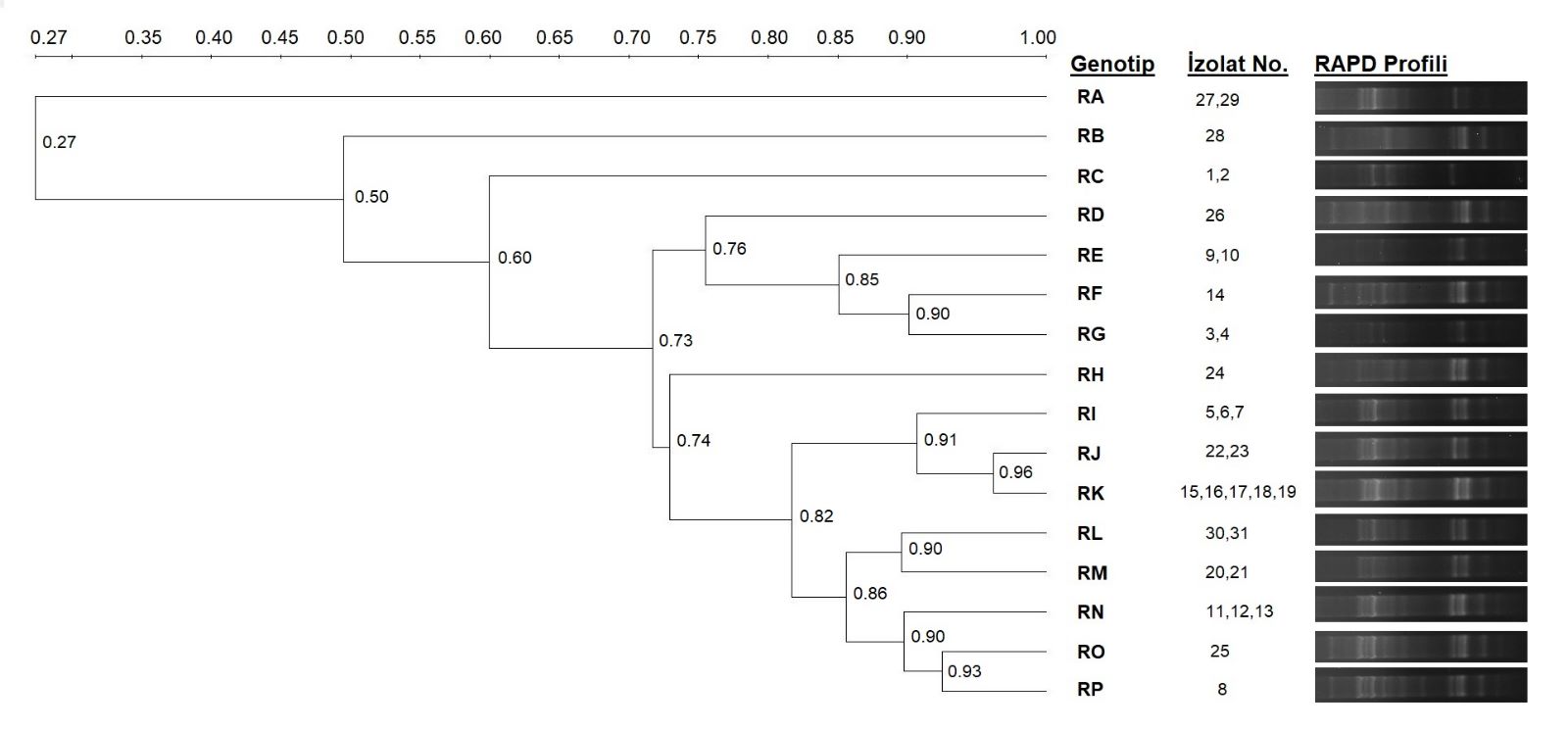
Çalışmada elde edilen *C.pseudotuberculosis* izolatlarının filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan RAPD-PCR ile genotiplendirme sonucunda izolatların % 41 -100 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı (Şekil 4). İzolatların filogenetik analizi ile 4 farklı genotipte (RA, RB, RC, RD) yer aldıkları belirlendi. Baskın genotip olduğu görülen RD kümesinde 13 adet izolatın yer aldığı ve bu izolatların %100 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı. RA ve RC kümelerinin 1’er izolattan oluştuğu ve RB kümesinin ise 2 izolatı içerdiği belirlendi.



**Şekil 4.** *C.pseudotuberculosis* izolatlarının RAPD- PCR görüntüsü.

**4.3.5. *S.aureus*** ***subsp, anaerobius’* un Genotiplendirme Sonuçları**

Çalışmada elde edilen *S.aureus subsp, anaerobius* izolatlarının filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan RAPD-PCR ile genotiplendirme sonucunda izolatların % 27 -100 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı (Şekil 5). İzolatların filogenetik analizi ile 16 farklı genotipte (RA - RP) yer aldıkları belirlendi. Baskın genotip olduğu görülen RK kümesinde 5 adet izolatın yer aldığı ve bu izolatların %100 oranında benzerlik gösterdikleri saptandı. RB, RD, RF, RH, RO ve RP kümelerinin 1’er izolatı içerdiği görüldü. Ayrıca, RA, RC, RE, RG, RJ, RL ve RN kümelerinin 2’şer izolat; RI ve RM kümelerinin ise 3 izolatı içerdiği belirlendi.

****

**Şekil 5.** *S.aureus subsp, anaerobius* izolatlarının RAPD- PCR görüntüsü.

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| İl | Koyun | | | Keçi | | |
| Örneği Sayısı | *Corynebacterium pseudotuberculosis* Pozitif Sayısı | *Staphylococcus aureus* subsp*. anaerobius* Pozitif Sayısı | Örneği Sayısı | *Corynebacterium pseudotuberculosis* Pozitif Sayısı | *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* Pozitif Sayısı |
| İzmir | 8 | 2 | 4 | 8 | 2 | 3 |
| Aydın | 6 | 2 | 3 | 6 | 1 | 2 |
| Manisa | 6 | 1 | 1 | 6 | 1 | 2 |
| Muğla | 6 | 1 | 1 | 6 | - | 2 |
| Denizli | 6 | 1 | 2 | 6 | 1 | 1 |
| Uşak | 6 | 1 | - | 6 | 1 | 3 |
| Kütahya | 6 | 1 | 2 | 6 | - | 1 |
| Afyonkarahisar | 6 | 1 | 3 | 6 | 1 | 1 |
| Toplam | 50 | 10 | 16 | 50 | 7 | 15 |

**Tablo 14.** Çalışma genel sonuçları tablosu

**5. TARTIŞMA**

*C.pseudotuberculosis*’in neden olduğu kazeöz lenfadenitis hastalığı dünyanın birçok ülkesinde küçükbaş hayvan endüstrisi için önemli ekonomik kayıplara sebep olduğu bildirilmiştir. Birçok ülkede 19. yüzyılın sonlarında hastalık vakaları bildirilirken, İngiltere’de yetişticiliği yapılan bir keçi sürüsünde ilk kez teşhis 1989 yılında tespit edilmiştir. Hastalık Amerika, Avrupa, Asya, Afrika ve Avusturalya kıtalarında, tüm dünya coğrafyasında küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin önemli bir problemi olarak değerlendirilmiştir (Baird ve Fontaine, 2007).

*C.pseudotuberculosis* izole edilen ülkelerde suşlar arasında genotipik olarak yapılan çalışmalarda şusların birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiş ve bu durumun sebebinin kıtalararası hayvan ticareti ve göçlerinin olabileceği kanaatine varılmıştır (Baird ve Fontaine, 2007). Hastalığın prevelansı dünyadaki yapılan çalışmalarda %8-90 arasında değişmektedir (Al-Gaabary ve diğerleri, 2009; Çetinkaya ve diğerleri, 2002; Erganiş ve diğerleri, 1990; Seyffert ve diğerleri, 2010).

Ülkemizde hastalığın epidemiyolojik durumunun araştırılması için herhangi bir çalışma yapılmamıştır, fakat ülkemizin değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda, özellikle koyun sürülerinde keçi sürülerine göre daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Çetinkaya ve diğerleri, 2002; Erganiş ve diğerleri, 1990; İlhan, 2013; Sakmanoğlu ve diğerleri, 2015). Türkiye’ de hastalığın sebep olduğu ekonomik kayıplar ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Hastalık ülkemizde ihbari mecburi hastalıklar arasında bulunmaması nedeniyle, eradikasyonu ve prevelansının düşürülmesi yönünde çok sayıda çalışma bulunmamaktadır.

*C.pseudotuberculosis* sürüye bulaştığında, infeksiyonun kontrol altına alınması sırasında birçok sorun ortaya çıkmaktadır. Bunların başında bazı olguların sub-klinik seyretmesi, çok sayıda hayvanın hızlı bir şekilde infekte olması ve bakterinin kalın lipid hücre duvar yapısı ve birçok antimikrobiyal ilaç için dirençli olması sayılabilir (Abebe ve Tessema, 2015).

*S.aureus* subps. *anaerobius*, koyun ve keçilerde kronik deri altı bölgesinde ve superfaciel lenf nodüllerinde apselere neden olan Morel hastalığının etkenidir (De la Fuente ve diğerleri, 1985).

Morel hastalığı Asya, Avrupa ve Afrika kıtasında tespit edilip rapor edilmiştir. Avrupa’da Macaristan, İspanya, Danimarka, İtalya ve Polonya gibi birçok ülkede tespit edilmiş ve üzerine çalışmalar yapılmıştır (De la Fuente ve diğerleri, 2011).

Morel hastalığı daha çok genç hayvanlarda tespit edilmiştir (De la Fuente ve diğerleri, 1997). Hastalığın yüksek mortalite oranına sahip olduğu ve endemik olarak seyrettiği bildirilmiştir (Elbir ve diğerleri, 2010).

Çalışmamızda Ege bölgesinde yetiştiriciliği yapılan 50 koyun ve 50 keçi’ye ait apse örnekleri çalışıldı. 100 örnekte 17’sinde *Corynebacterium pseudotuberculosis* izole edildi. 50 koyuna ait apseden 10 adedinde, 50 keçiye ait apse örneğinden ise 7’sinde Corynebacterium pseudotuberculosis izole edildi. 100 örnekte 31’sinde *Staphylococcus aureus* subps. *anaerobius* izole edildi. 50 koyuna ait apseden 16 adedinde, 50 keçiye ait apse örneğinden ise 15’sinde *Staphylococcus aureus* subps. *anaerobius* izole edildi.

Avusturalya’da 1992 yılında koyun kan serumlarından yapılan bir çalışmada kazeöz lenfadenitis hastalığı için prevalans %54 olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda yine Avusturalya da yapılan başka bir çalışmada ise hastalığın koyun endüstrisine 15 ile 17 milyon dolar zarar verdiği belirtilmiştir (Sutherland ve diğerleri, 1993; Paton ve diğerleri, 2003).

Brezilya’da kazeöz lenfadenitis infeksiyonunun koyunlarda prevalansı %70,9 ve sürü prevalansının %95,9 olduğu tespit edilerek kazeöz lenfadenitis infeksiyonuna karşı mücadele için ülke çapında bir program yapılması gerektiğini bildirmiştir (Guimares ve diğerleri, 2009).

Al Gaabary ve diğerleri tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada keçilerde ve koyunlarda kazeöz lenfadenitis infeksiyonu prevalansını klinik ve bakteriyolojik çalışmalara göre sırasıyla %19,23 ve %17,32 olarak bildirmişlerdir. Hastalık prevalansını erkeklere (%12,42) göre dişilerde (%19,67) belirgin olarak daha yüksek ve infeksiyonun en sık görüldüğü yaşı ise %47,3 ile 1-2 yaşlı hayvanlar olarak bildirmişlerdir. Kırkım günü penisilin uygulanan hayvanlar ve kırkım sonrası dezenfeksiyon işlemi yapılan hayvanlarda hastalığın belirtilerinin azaldığı bildirilmiştir.

İnfekte 44 keçi ve 12 koyun ile *C.pseudotuberculosis* varlığı tespiti yönünden yapılan bir çalışmada moleküler yöntem ile klasik bakteriyolojik kültür yöntemi açısından sensitivite ve spesifitesinin karşılaştırılması sonucunda PZR sensitivitesinin koyunlarda %91,7 keçilerde %95,4 olduğu bildirilmiştir (Pacheco ve diğerleri, 2007).

2014 yılında Mısır’da 1206 koyun ve 351 keçi materyali ile yapılan bir çalışmada aşılanmamış hayvanlarda %6,7 oranında *C.pseudotuberculosis* izole edilip raporlanmıştır (Oreiby ve diğerleri, 2014).

Ülkemizde Elazığ ili ve çevresinde yetiştirilen 118 adet koyundaki apseli lenf yumrularından yapılan bir çalışmada %81,4 oranında *C.pseudotuberculosis* etkeninin izolasyonu yapıldığını ve infeksiyon prevalansının %2,2 olduğu bildirilmiştir (Çetinkaya ve diğerleri, 2002).

Siirt Üniversitesi Keçi Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde bulunan Boer Kıl Keçisi melezi bir keçide lenf yumrusunda bir şişlik olduğu tespit edilmiş, şişlik içeriğinden yapılan ekimlerde etkenin *C.pseudotuberculosis* olduğu görülmüş ve ilk kez bir Boer Kıl keçisi melezinde Kazeöz lenfadenitis infeksiyonu raporlanmıştır (Akgül, 2018).

Aydın ilinde yetiştirilen 57’si dişi 43’ü erkek olmak üzere toplam 100 adet sakız cinsi koyununun lenf nodüllerindeki apse örneklerinden yapılan bir çalışmada 17 adet apse örneğinde *C.pseudotuberculosis* tespit edildiği bildirilmiştir (Parın ve diğerleri, 2018).

Brezilya’da 223 koyun sürüsündeki 2638 adet koyundan alınan kan serumları ile ELİSA testi ile yapılan bir çalışmada test edilen 2638 koyundan 996'sı ve değerlendirilen 223 sürüden 210'u *C.pseudotuberculosis* yönünden seropozitif olduğu bildirilmiştir (Alves ve diğerleri, 2020).

2015 yılında ülkemizde yapılan bir çalışmada 1176 adet koyuna ait lenf düğümünden yapılan ekimler sonucunda 72 *C.pseudotuberculosis* etkeni identifiye edildiği bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada elde edilen izolatlarının farklı antibiyotiklere değişik oranlarda duyarlı oldukları, izolatların büyük çoğunluğunun florfenikol (%98,6), novobiosin (%95,8), seftiofur ve telitromisine (%91,6) duyarlı, ampisilin (%62,5), linkomisin (%62,5) ve spiramisine (%41,7) dirençli olduğu belirtilmiştir (Sakmanoğlu ve diğerleri, 2015).

2022 yılında Diyarbakır’da koyunlarda 90 apse örneği ve kan serumu ile yapılan bir çalışmada koyunlarda moleküler olara PCR tekniği ile 26 (%28,9) pozitif, 64 (%71,1) negatif, ELISA analizinde 17 (%18,9) pozitif, 73 (%81,1) negatif ve bakteriyolojik kültürde 12 (%13,3)’sinde *C.pseudotuberculosis* identifikasyonu yapılmıştır (Ekinci ve İçen, 2022).

*Corynebacterium* spp. identifikasyonunda önceki yılarda çeşitli zorluklarla karşılaşılmıştır. Bunların başında yeterli referans bilgi olmaması, referans suşların elde edilememesi ve gerekli identifikasyon kitlerinin geliştirlememesidir (Baird ve Fontaine, 2007). Bu nedenle özellikle *C. diphteria, C. pseudotuberculosis ve C. ulserans* türlerinin morfolojik yapılarının ve hücre duvarı yapılarının birbinine benzer yapıda olması ayrıca bu üç etkenin benzer toksin üretebilme yeteneğinin olması identifikasyonlarını daha fazla zorlaştırmıştır (Çetinkaya ve diğerleri, 2002, Pacheco ve diğerleri, 2007). *C.pseudotuberculosis* oluşturduğu KLA infeksiyonunun teşhisinde, yaygın olarak kültür ve serolojik testler kullanılmaktadır (Çetinkaya ve diğerleri, 2002; İzgür ve diğerleri, 1999; Quinn ve diğerleri, 1984; Shigidi, 1979). Teşhiste kullanılan biyokimyasal testler ve hazır ticari identifikasyon kitleri her ne kadar etkenin adını koymada yardımcı olsa da yetersiz kalabilmektedir (Al-Gaabray ve diğerleri, 2010; Costa ve diğerleri, 1998; Dercksen ve diğerleri, 2000; Erganiş ve diğerleri, 1990; Prescott ve diğerleri, 2002). Bu sebeple elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının PZR ile doğrulanması gerektiği belirtilmektedir (İlhan, 2013; Ter Laak ve diğerleri, 1992).

Dünyada ve ülkemizde *C.pseudotuberculosis* izolasyonu için yapılan çalışmalarda apse örnekleri ve lenf dokusu örnekleri kullanarak koyun kanlı agar ve columbia agara ekimler yapılmış ve 48 saat mikroaerofilik şartlarda 37 °C de inkübe edilerek elde edilen *C.pseudotuberculosis* şüpheli izolatlar elde edilmiştir. Elde edilen izolatlara çeşitli biyokimyasal testler uygulanıp identifikasyonu yapılmıştır. Çetinkaya ve diğerleri (2002) ile Pacheco ve diğerleri (2007) yaptığı çalışmalar sonrası *C.pseudotuberculosis* teşhişinde PCR yöntemi kullanımı artmıştır. Güncel çalışmalarda elde edilen izolatlar genellikle öncelikle biyokimyasal testler veya hazırlanan ticari kitler ile çalışılarak pozitif olarak değerlendirilenlerin PCR ile doğrulamasıyla tanımlanmaktadır.

Kazeöz lenfadenitis hastalığın serolojik yöntemler ile teşhişi için genellikle ELİSA yöntemi kulanılmıştır. Dünyada Brezilya, Norveç, Türkiye, Avustrulya’da yapılan çalışmalarda hastalığın prevalansı % 8-95 arası bulunmuştur (Alves ve diğerleri, 2020; Guimares ve diğerleri, 2009; İlhan, 2003; Lund ve diğerleri, 1982).

*C. pseudotuberculosis* izolatların teşhisi için çeşitli çalışmalarda benzer biyokimyasal testler uygulanmıştır. Özellikle bu çalışmada kullanılan oksidaz ve katalaz testleri izolatların teşhisi için en çok kullanılan biyokimyasal testlerdir (Çetinkaya ve diğerleri, 2002; Ekinci ve İçen, 2022; Pacheco ve diğerleri, 2007; İlhan, 2003). Ayrıca çalışmamızda kullanılan Vitek 2 sistemi izolatların biyokimyasal özelliklerinin Yıldız ve arkadaşlarının çalışmasıyla benzerlik göstermiştir.

*C.pseudotuberculosis* şüpheli izolatların DNA ektrasyonu işlemi için bu çalışmada ve ülkemizde Parın ve diğerleri, İlhan ve Akgül tarafından yapılan çalışmalarda benzer şekilde hazır ticari DNA izolasyon kiti kullanılmıştır (Akgül, 2022; İlhan, 2003; Parın ve diğerleri, 2018).

C.pseudotuberculosis teşhisi için moleküler yöntemler son yıllarda önem kazanmıştır. Pacheco ve diğerleri (2007) yılında yaptığı çalışma, PLD genine ait PLD forward (5’ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA-3’) ve PLD reverse (5’ ATCAGCGGTGATTGTCTTCC-3’) primerleri kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmıştır (Akgül, 2022; Almeida ve diğerleri, 2017; Foley ve diğerleri, 2004; Guerrero diğerleri, 2018; İlhan, 2003; Jung ve diğerleri, 2015; Sakmanoğlu ve diğerleri, 2015; Zamprogna ve diğerleri, 2021).

Yine *C.pseudotuberculosis* moleküler yönünden teşhisi için D’ Alfonseca ve diğerleri (2010) yılında yaptığı çalışmada kullandığı, *PIP* genine ait *PIP* forward (5’-AACTGCGGCTTTCTTTATTC-3’) ve *PIP* reverse (5’-GACAAGTGGGAACGGTATCT-3’) primerleri kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada da aynı primerler kullanılmıştır.

Dünyada moleküler yöntemler ile *C.pseudotuberculosis* teşhisi için gerçekleştirilen çalışmalarda; Brezilya’da %54, Cezayir’ de %53, Portekiz’de %17.24, İran’ da %12.6, Kore’de %7.3, Mısır’da %3 prevalans bildirilmiştir (Chikhaoui ve Khoudja, 2013; Costa ve diğerleri, 2019; Jung ve diğerleri, 2015; Nassar ve diğerleri, 2016; Selim ve diğerleri, 2021; Zavoshti ve diğerleri, 2012). Bu çalışmada PCR yöntemiyle %17 prevalans tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç Nassar ve diğerleri (2016) ile Chikhaoui ve diğerleri (2013) tarafından yapılan çalışmalarından bulgularından düşük olarak değerlendirilirlen, diğer araştırıcıların bulgularından yüksek olarak tespit edilmiştir. Portekiz’ de Costa ve diğerleri, (2019) tarafından yapılan çalışma ile benzer bulgular elde edilmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Elazığ’da %3, Van’ da % 55, Konya’ da %6, Aydın’ da ve %17, Diyarbakır’ da %28 oranında KLA hastalığı için prevalans bildirilmiştir (Çetinkaya ve diğerleri, 2002; Ekinci ve İçen, 2022; İlhan, 2013; Sakmanoğlu ve diğerleri, 2015). Parın ve diğerleri (2018) Aydın ilinde yaptığı çalışma ile bu çalışma bulguları % 17 prevalans oranı ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Çetinkaya ve diğerleri (2002) yaptığı çalışma ile Sakmanoğlu ve diğerleri (2015) yaptığı çalışma bulguları, bu çalışma bulgularına göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Düşük olmasının nedenleri arasında birinin mezbaha lenf dokularının bu çalışmada ise apse örneklerinin çalışılması olduğu düşünülmektedir. İlhan (2013) ile Ekinci ve İçen (2022) yaptığı çalışmaların bulguları bu çalışma bulgularından daha yüksek oranda prevalansa sahip olmasının, bölgesel ve yetiştirme tipi farklılıklarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Morel hastalığı koyun ve keçilerde *S.aureus* subps. *anaerobius*’un sebep olduğu, kronik deri altı bölgesinde ve superfaciel lenf nodüllerinde apseler ile seyreden bir infeksiyondur (De La Fuente ve diğerleri, 1985).

Morel hastalığı sonucu oluşan deri altı apseler visköz beyaz sarı kokusuzdur. Kazeöz lenfadenitis infeksiyonu sonucu lenf dokularında oluşan apselerde kuru katmanlı bir görünüm mevcuttur (Bajmocy ve diğerleri 1984; De La Fuente ve diğerleri, 1985; Moller ve diğerleri, 2003).

Morel hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle koyun ve keçi sürülerinde meydana gelen salgınlar ile raporlanmıştır. 1984 yılında Macaristan’ta koyun sürüsünde, 2007 yılında Polonya’da bir keçi sürüsünde ve 1993 yılında ise Suudi Arabistan da bir keçi sürüsünde meydan gelen salgınlardan izole edilip raporlanmıştır (Alhendi ve diğerleri,1993; Bajmocy ve diğerleri 1984; Kaba ve diğerleri, 2007).

Avrupa’da yapılan koyun ithalatında Fransa’dan Danimarka’ya 104 adet Lacaune cinsi koyunda 2 adedinde *S.aureus* subps*. anaerobius* izole edilip raporlanmıştır (Moller ve diğerleri, 2000). Bu duruma göre hastalığın Avrupa’ya ve diğer Kıtalara yayılmasında küçükbaş hayvan ticaretinin etkili olduğu düşünülmektedir.

Morel hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalarda koyunların keçilere göre daha duyarlı olduğu bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Khadeega ve diğerleri, 2020). Bu çalışmada da benzer şekilde koyunların Morel hastalığına yakalanma oranı, keçilerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Suudi Arabistan’daki bir keçi sürüsünde meydana gelen salgında 225 adet keçide semptom gösteren 61(36,8) adedinde *S.aureus* subps. *anaerobius* izole edilerek raporlanmıştır. Bu çalışmada ise *S.aureus* subps. *anaerobius* oranı koyun ve keçilerde %31 olarak belirlenmiştir (Alhendi ve diğerleri, 1993).

Sudan’ da yapılan bir çalışmada 24 adet koyunda ve 25 adet keçide yüzeysel lenf düğümlerindeki apselerden yapılan ekimler sonucunda 18 (%75) adet koyunda ve 14(%56 ) adet keçide *S.aureus* subps. *anaerobius* fenotipik olarakizole edilerek raporlanmıştır. Aynı çalışma sonucunda koyunlarda %4,1 keçilerde %2,3 prevalans oranı tespit edilmiştir (Khadeega ve diğerleri, 2020).

1985 Yılında De La Fuente tarafından bakteri tanımlaması yapılarak biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Danimarka, Suudi Arabistan, Macaristan ve Sudan gibi ülkelerde yapılan çalışmalarda bu biyokimyasal özellikler dikkate alınarak etken raporlanmıştır (Alhendi ve diğerleri, 1993; De La Fuente ve diğerleri, 1985; Kaba ve diğerleri, 2007; Khadeega ve diğerleri,2020).

2019 yılında Çek Cumhuriyeti’nde yapılan bir çalışmada yeni bir *S.aureus* subps. *anaerobius* tipi raporlanmıştır. Teşhisinde ise *arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi*, ve *yqiL* gen bölgeleri ile Multilocus sequence Typing (MLST) yöntemi kullanılmıştır (Slorsarkova ve diğerleri, 2019).

*S.aureus* subps. *anaerobius* teşhisinde biyokimyasal yöntemler dışında MALDI-TOF MS cihazı ile identifikasyonu yapılan çalışmalarda vardır (Perez- Sancho ve diğerleri, 2018; Slorsarkova ve diğerleri, 2019).

Sanz ve diğerlerinin (2000) yaptığı çalışmada *S.aureus* subps. *anaerobius’* un katalaz geni mutasyonları üzerine yaptığı çalışmada *cat808F*: 5´ CTCCATTTTAGAACGCAACAA 3´, *cat1583R*: 5´ TGGGTCAGCTTTGTAACA 3´) gen bölgelerinin hastalığın teşhisinde kullanılabileceği belirtilmiştir ( Sanz ve diğerleri, 2000).

Musa ve ark 2012 yılında 137 apse örneği ile yaptığı çalışmada 60 (%43) örnekten *S.aureus* subps*. anaerobius* izole etmiştir. Yapılan çalışmada öncelikle *S.aureus* tanımlaması için *nuc* geni bakılmış sonrasında ise *cat808F* ve *cat1583R* primerleri kullanılarak PCR çalışması yapılmıştır. Musa ve diğerlerinin yaptığı çalışma ile bu çalışma yöntemi birebir aynı şekilde olup bu çalışmada % 31 ile daha düşük bir prevalans elde edilmiştir (Musa ve diğerleri, 2012).

Çalışmamız Morel hastalığı konusunda ülkemizde rapor edilen ilk çalışmadır. Hastalığın teshişinin zor oluşu, kazeöz lenfadenitis hastalığı ile semptomlarının benzerliği, moleküler yöntemlerin ve hastalık konusunda çok az etkili olduğu düşünülmektedir.

**6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Küçükbaş hayvancılık dünyada ve ülkemizde hayvansal protein temininde önemli yer tutmaktadır. *C.pseudotuberculosis* ve *S.aureus* subps*. anaerobius* kaynaklıinfeksiyonlar küçükbaş hayvancılık sektörü açısından ciddi ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir. Özellikle hastalığa yakalanan hayvanların tedavilerinde kullanılan antibiyotiklerin etkili olmaması sebebiyle hastalık ile mücadele konusunda zorluklar ile karşılaşılmaktadır. Bu sebeplerden dolayı *C.pseudotuberculosis* ve *S.aureus* subps. *anaerobius* kaynaklı infeksiyonlarda aşı uygulamaları oldukça değerlidir*.*

Çalışmamızda Ege bölgesinde yetiştirilen küçükbaş hayvanlardaki apse örneklerinden 17 *C. pseudotuberculosis* suşu ile 31 adet *S. aureus* subps. *anaerobius* suşu izole edildi. RAPD-PCR tekniği kullanılarak suşların filogenetik yakınlığına bakıldı. *C. pseudotuberculosis* suşları % 41 -100 oranında, *S. aureus* subps. *anaerobius* suşları arasında % 27 -100 oranında genotipik benzerlik gösterdiği belirlendi.

Bu tez çalışmasında Ege bölgesinde yetiştirilen koyun ve keçilerde deri altı ve lenf düğümlerinde meydana gelen apselerde *C.pseudotuberculosis* kaynaklı kazeöz lenfadenitis hastalığı ve *S.aureus* subps*. anaerobius* kaynaklı morel hastalığı varlığı araştırıldı. Çalışmamızda Ege bölgesi, Aydın ili haricindeki illerde ilk kez kazeöz lenfadenitis varlığı tespit edildi. Aynı zamanda *S.aureus* subps. *anaerobius* kaynaklı morel hastalığı varlığının ortaya konulması yönünden ülkemizde yapılan ilk çalışma olması açısından oldukça önemlidir. Bu sonuç ile diğer bölgelerimizde de varlığının tespiti yönünde yapılacak çalışmalara temel olabileceği düşünülmüştür.

Küçükbaş hayvanlarda oluşan apselerde her iki etkeninde varlığı bu çalışma ile belirlenmiştir. Ege bölgesindeki küçükbaş apse olguları tedavisinde ve korumasında hem *C.pseudotuberculosis* hem de *S.aureus* subps. *anaerobius* etkenlerinin neden olabileceği düşünülüp gerekli araştırmaların bu doğrultuda yapılmasının daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

**KAYNAKLAR**

Abebe, D., & Sisay Tessema, T. (2015). Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. *Letters in Applied Microbiology*, *61*(5), 469-476.

Akgül, G. (2018). *Corynebacterium pseudotuberculosis* Case in a Boer Goat X Turkish Hair Goat Crossbred. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *15*(1), 82-85.

Akman, M., Gülmezoğlu, E., (1980). *Tıbbi mikrobiyoloji* (3. Baskı). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

Al-Gaabary, M. H., Osman, S. A., & Oreiby, A. F. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Ruminant Research*, *87*(1-3), 116-121.

Alhendi, A. B., El‐Sanhousi, S. M., Al‐Ghasnawi, Y. A., & Madawi, M. (1993). An outbreak of abscess disease in goats in Saudi Arabia. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, *40*(1‐10), 646-651.

Almeida, S., Dorneles, E. M., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J., ... & Azevedo, V. (2017). Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar Ovis and Equi. *BMC Veterinary Research*, *13*, 1-8.

Alonso, J. L., Simon, M. C., Girones, O., Muzquiz, J. L., Ortega, C., & Garcia, J. (1992). The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. *Research in Veterinary Science*, *52*(3), 267-272.

Alves, J. R. A., de Farias, A. E. M., da Silva, J. D., Viana, M. P., Lima, A. M. C., Faccioli-Martins, P. Y., ... & Alves, C. J. (2020). Factors associated with the seroprevalence of caseous lymphadenitis in sheep from Northeastern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, *182*, 105098.

Anderson, M., & Nairn, M. E. (1984). Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. *Colloques de LINRA*, *28*, 605-609.

Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker KS. (1997). *Özel mikrobiyoloji* (4. Baskı). Ankara: Medisan Yayınları.

Aydın, N. (1977). *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* suşlarının ve ekzotoksinlerinin antijenik özellikleri üzerinde araştırmalar. *PhD, Ankara University, Ankara, Turkey*.

Ayers, J. L. (1977). Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *171*(12), 1251-1254.

Aynaud, M. (1922). La botryomycose du mouton. *CR Acad. Sci*, *175*(11761), 172.

Baird, G. J., & Fontaine, M. C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*, *137*(4), 179-210.

Bajmocy, E., Fazekas, B., & Tanyi, J. (1984). An outbreak of Morel's disease (a contagious sheep disease accompanied by abscess formation) in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, *32*(1-2), 9-13.

Barksdale, L., Linder, R., Sulea, I. T., & Pollice, M. (1981). Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus Corynebacterium. *Journal of Clinical Microbiology*, *13*(2), 335-343.

Bastos, B. L., Portela, R. D., Dorella, F. A., Ribeiro, D., Seyffert, N., Castro, T. L. D. P., ... & Azevedo, V. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. *J Clin Cell Immunol S*, *4*(005), 10-4172.

Batey, R. G. (1986). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, *63*(9), 269-272.

Bayan, N., Houssin, C., Chami, M., & Leblon, G. (2003). Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *Journal of Biotechnology*, *104*(1-3), 55-67.

Ben Said D, M. S., Ben Maitiguie, H., Benzarti, M., Messadi, L., Rejeb, A., & Amara, A. (2002). Contribution a l'étude épidemiologique et clinique de la lymphadenite caseeuse chez les ovins. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, *79*(1-4), 51-57.

Bernheimer, A. W., Linder, R., & Avigad, L. S. (1980). Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. *Infection and Immunity*, *29*(1), 123-131.

Biberstein, E. L., Knight, H. D., & Jang, S. (1971). Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis.* *The Veterinary Record*, *89*(26), 691-692.

Bilgehan, H. (1995). *Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyoloji Tanı* İzmir: Barış Yayınları.

Billington, S. J., Esmay, P. A., Songer, J. G., & Jost, B. H. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, *208*(1), 41-45.

Binns, S. H., Green, L. E., & Bailey, M. (2007). Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary Microbiology*, *123*(1-3), 169-179.

Bocckino, S. B., Wilson, P. B., & Exton, J. H. (1991). Phosphatidate-dependent protein phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(14), 6210-6213.

Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(7), 1654-1660.

Braverman, Y., Chizov-Ginzburg, A., Saran, A., & Winkler, M. (1999). The role of houseflies (Musca domestica) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *18*(3), 681-690.

Brock, T.D., ve Madigan, M.T. (2006). *Biology of Microorganisms (*11. Edition) New Jersey: Pearsen Prentice Hall.

Brogden, K. A., Cutlip, R. C., & Lehmkuhl, H. D. (1984). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *American Journal of Veterinary Research*, *45*(8), 1532-1534.

Brown, C. C. (1987). Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. *Vet. Bull.*, *57*, 1-12.

Brown, C. C., Olander, H. J., Biberstein, E. L., & Morse, S. M. (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis.* *American journal of Veterinary Research*, *47*(5), 1116-1119.

Burrell, D. H. (1980). A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Research in Veterinary Science*, *28*(2), 190-194.

Cameron, C. M., Minnaar, J. L., Engelbrecht, M. M., & Purdom, M. R. (1972). Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research,* 39.

Carne, H. R. (1939). A bacteriological study of 134 strains of *Corynebacterium ovis*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *49*(2), 313-328.

Carne, H. R., Wickham, N., & Kater, J. C. (1956). A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*. *Nature*, *178*(4535), 701-702.

Cetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T., & Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, *88*(1), 75-83.

Chikhaoui, M., & Khoudja, F. B. (2013). Clinicopathological investigation on caseous lymphadenitis in local breed sheep in Algeria. *Tropical animal health and production*, *45*, 1641-1643.

Collins, M. D., Goodfellow, M., & Minnikin, D. E. (1982). Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *Microbiology*, *128*(11), 2503-2509.

Connor, K. M., Quirie, M. M., Baird, G., & Donachie, W. (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(7), 2633-2637.

Costa, L. R., Spier, S. J., & Hirsh, D. C. (1998). Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Veterinary Microbiology*, *62*(2), 135-143.

Costa, L., Maldonado, A., Huerta, B., & Almeida, A. (2019). Optimization of a conventional PCR Assay for the identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pyogenic lesions. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, *7*(2), 201.

Crawford, P. A., Hand, M. F., Richards, S. J., & Masterton, R. G. (1994). Septicaemia caused by a catalase-negative *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Hospital İnfection*, *27*(4), 320-322.

Cretenet, M., Even, S., & Le Loir, Y. (2011). Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science & Technology*, *91*(2), 127-150.

Cross, M. J., Roberts, S., Ridley, A. J., Hodgkin, M. N., Stewart, A., Claesson-Welsh, L., & Wakelam, M. J. (1996). Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. *Current Biology*, *6*(5), 588-597.

Çapakçıoğlu, H. (2019). *Deve (Camelus dromedarius)* Mastitislerinden Patojen Bakterilerin İdentifikasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması (Master's thesis, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Çukur, F., & Saner, G. (2005). Konvansiyonel Ve Ekolojik Hayvancılık Sistemlerinin Sürdürülebilirliği Ve Türkiye Üzerine Bir Değerlendirme. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *2*(1), 39-44.

D’Afonseca, V., Prosdocimi, F., Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Moraes, P. M., Pena, I., ... & Azevedo, V. (2010). Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis.* *Microbiological Research*, *165*(4), 312-320.

Dallal, M. M. S., Khoramizadeh, M. R., Amiri, S. A., Yaraghi, A. A. S., & Fard, R. M. N. (2016). Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates: A study on dairy food products and other foods in Tehran, Iran. *Food Science and Human Wellness*, *5*(4), 186-190.

De la Fuente, R., Ballesteros, C., Bautista, V., Medina, A., Orden, J. A., Domínguez-Bernal, G., & Vindel, A. (2011). *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* isolates from different countries are clonal in nature. *Veterinary Microbiology*, *150*(1-2), 198-202.

De la Fuente, R., Cid, D., Sanz, R., & Ruiz-Santa-Quiteria, J. A. (1997). An outbreak of abscess disease associated with shearing. *Small Ruminant Research*, *26*(3), 283-286.

De la Fuente, R., Suarez, G., & Schleifer, K. H. (1985). *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius subsp. nov.,* the causal agent of abscess disease of sheep. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *35*(1), 99-102.

de Oliveira Zamprogna, T., Ribeiro, D., Azevedo, V. A., Lara, G. H. B., Motta, R. G., da Silva, R. C., ... & Ribeiro, M. G. (2021). Bacteriological, cytological, and molecular investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mycobacteria, and other bacteria in caseous lymphadenitis and healthy lymph nodes of slaughtered sheep. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*, 431-438.

Demiroluk, S. (2000). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen S. aureus Kökenlerinin Antibiyotik Duyarlılık, Faj Tipleme ve Kapsül, Polisakkarit Tipleme Yöntemleriyle İncelenmesi, Uzmanlık Tezi. *Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mirobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*.

Dercksen, D. P., Brinkhof, J. M., Dekker-Nooren, T., van Maanen, K., Bode, C. F., Baird, G., & Kamp, E. M. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, *75*(2), 167-175.

Dhalla, N. S., Xu, Y. J., Sheu, S. S., Tappia, P. S., & Panagia, V. (1997). Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *29*(11), 2865-2871.

Dorella, F., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2006). Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, *37*(2), 201-218.

Egen, N. B., Cuevas, W. A., McNamara, P. J., Sammons, D. W., Humphreys, R., & Songer, J. G. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *American Journal of Veterinary Research*, *50*(8), 1319-1322.

Eggleton, D. G., Doidge, C. V., Middleton, H. D., & Minty, D. W. (1991). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial‐corynebacterial vaccines. *Australian Veterinary Journal*, *68*(10), 320-321.

Ekinci, A. Y., & İçen, H. (2022). Koyunlarda Kazeöz Lenfadenitisin Moleküler ve ELISA Yöntemiyle Karşılaştırmalı Teşhisi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(2), 104-109.

El Sanousi, S. M., Hamad, A. A., & Gameel, A. A. (1989). Abscess disease in goats in the Sudan. *Revue d’élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, *42*(3), 379-382.

Elbir, H., Feil, E. J., Drancourt, M., Roux, V., El Sanousi, S. M., Eshag, M., ... & Flock, J. I. (2010). Ovine clone ST1464: a predominant genotype of *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* isolated from sheep in Sudan. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *4*(04), 235-238.

Elhaj, M. O., Böhnel, H., & El Sanousi, S. M. (2009). Production of abscess (Morel’s) disease vaccine by the IBT bioreactor technology. *Sudan J. Vet. Res*, *24*, 11-15.

Ellis, J. A., Campos, M., Snyder, M., Chelak, B., & Haines, D. M. (1995). Local production of tumor necrosis factor-α in corynebacterial pulmonary lesions in sheep. *Veterinary Pathology*, *32*(1), 68-71.

Erganiș, O., Kaya, O., Ateș, M., & Istanbulluoğlu, E. (1990). Microbiological studies on purulent lymph nodes of sheep slaughtered at the abattoir of the Konya Meat and Fish Organization and a serological survey. *Veterinarium*, *1*(1), 8-11.

Erganiş, O., Hadimli, H. H., Kürşat, K. A. V., Sakmanoğlu, A., Sayın, Z., Pınarkaya, Y. (2012). Efficacies of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines against caseous lymphadenitis in mice and sheep. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, *30*(2), 72-79.

European statistics [Eurostat].(2022). <https://ec.europa.eu/eurostat/en/> adresinden erişildi.

Felmingham, D., & Brown, D. F. (2001). Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *48*(suppl\_1), 81-85.

Foley, J. E., Spier, S. J., Mihalyi, J., Drazenovich, N., & Leutenegger, C. M. (2004). Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. *American journal of Veterinary Research*, *65*(12), 1734-1737.

Foster, T. (1996). Chapter 12: staphylococcus. *Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas*, 199-205.

Freney, J., Duperron, M. T., Courtier, C., Hansen, W., Allard, F., Boeufgras, J. M., ... & Fleurette, J. (1991). Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, *29*(1), 38-41.

Friedberg, B., Hauer, E., Belkhirat, M., Watine, J., & Le Coustumier, A. (2003). Catalase-negative *Staphylococcus aureus*: a rare cause of catheter-related bacteremia. *Clinical Microbiology and Infection*, *9*(12), 1253-1255.

Frohman, M. A., & Morris, A. J. (1999). Phospholipase D structure and regulation. *Chemistry and Physics of Lipids*, *98*(1-2), 127-140.

Funke, G., Lawson, P. A., & Collins, M. D. (1995). Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris sp. nov*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *45*(4), 735-739.

Garg, D. N., Nain, S. P. S., & Chandiramani, N. K. (1985). Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats. *Indian Veterinary Journal*.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. *New York*.

Gates, N. L., Everson, D. O., & Hulet, C. V. (1977). Effects of thin ewe syndrome on reproductive efficiency. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *171*(12), 1266-1267.

Gavin, S. E., Leonard, R. B., Briselden, A. M., & Coyle, M. B. (1992). Evaluation of the rapid Coryne identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(7), 1692-1695.

Goldberger, A. C., Lipsky, B. A., & Plorde, J. J. (1981). Suppurative Granulomatous Lymphadenitis Caused by *Corynebacterlum ovis* (Pseudotuberculosis). *American Journal of Clinical Pathology*, *76*(4), 486-490.

Guerrero, J. A. V., de Oca Jiménez, R. M., Dibarrat, J. A., León, F. H., Morales-Erasto, V., Salazar, H. G. M. (2018). Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. *Microbial Pathogenesis*, *117*, 304-309.

Habrun, B., Lestes, E., Kompes, G., & Cvetnic, Z. Mitak (2004) Caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Vet Stanica*, *35*, 139-144.

Hammond, S. M., Altshuller, Y. M., Sung, T. C., Rudge, S. A., Rose, K., Engebrecht, J., Frohman, M. A. (1995). Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(50), 29640-29643.

Hard, G. C. (1972). Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and Corynebacterium ovis. *Journal of Medical Microbiology*, *5*(4), 483-491.

Hard, G. C. (1975). Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*, *12*(6), 1439-1449.

Hata, D. J., Hall, L., Fothergill, A. W., Larone, D. H., & Wengenack, N. L. (2007). Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. Journal of Clinical Microbiology, 45(4), 1087-1092.

Hemond, V., Rosenstingl, S., Auriault, M. L., Galanti, M. J., & Gatfosse, M. (2008). Axillary lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a 63-year-old patient. *Medecine et Maladies Infectieuses*, *39*(2), 136-139.

Henry, R. A., Boyce, S. Y., Kurz, T. H. O. M. A. S., & Wolf, R. A. (1995). Stimulation and binding of myocardial phospholipase C by phosphatidic acid. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *269*(2), C349-C358.

Hodgson, A. L., Tachedjian, M., Corner, L. A., & Radford, A. J. (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and İmmunity*, *62*(12), 5275-5280.

Holstad, G. (1986). Corynebacterium Pseudotuberculosis Infection in Goats IV.: Course of the Infection in Two Recently Infected Goat Herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *27*(4), 609.

Hsu, T. Y., Renshaw, H. W., Livingston Jr, C. W., Augustine, J. L., Zink, D. L., & Gauer, B. B. (1985). *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxin: fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. *American Journal of Veterinary Research*, *46*(5), 1206-1211.

Ilhan, Z. (2003). Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis'* in ELISA ve Dot-Blot ELISA ile Teşhisi. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *27*(6).

Ilhan, Z. (2013). Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. *Revue de Medecine Veterinaire*, *164*(2), 60-66.

İlhan, Z. (2020). Kazeöz lenfadenitisli koyunlardan i̇zole edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* suşlarının in-vitro antibiyotik duyarlılıkları. *Kocatepe Veterinary Journal*, *13*(3), 267-271.

İzgür, M. (1999). Koyunlarda Kazeöz Lenfadenitis Olgularından İzole Edilen Etkenler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *46*(01).

Join-Lambert, O. F., Ouache, M., Canioni, D., Beretti, J. L., Blanche, S., Berche, P., & Kayal, S. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *The Pediatric İnfectious Disease Journal*, *25*(9), 848-851.

Jones, D., Collins, M.D. (1986). Irregular, nonsporing Gram-positive rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1261-1434.

Jung, B. Y., Lee, S. H., Kim, H. Y., Byun, J. W., Shin, D. H., Kim, D., & Kwak, D. (2015). Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (Capra hircus coreanae). *Tropical Animal Health and Production*, *47*, 657-661.

Kaba, J., Szaluś, O., Rzewuska, M., Stefańska, I., Binek, M., & Frymus, T. (2007). An outbreak of Morel’s disease in a goat flock. *Mag Weter*, *16*, 46-48.

Kaba, J., Szaluś, O., Rzewuska, M., Stefańska, I., Binek, M., & Frymus, T. (2007). An outbreak of Morel’s disease in a goat flock. *Mag Weter*, *16*, 46-48.

Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans, Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, *56*(2).

Kaymakçı, M., Eliçin, A., Tuncel, E., Pekel, E., Karaca, O., Işın, F., ... & Sönmez, R. (2000). Türkiye’de küçükbaş hayvan yetiştiriciliği. *Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi*, *2*, 765-793.

Khadeega YHS, El Sanousi SM, Mohamed AEM (2020). Prevalence of *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* in Sheep and Goats abscesses in Nyala, South Darfur State, Sudan. Epidemiol Sci 10: 380 DOI: 10.4172/2161-1165.1000380

Khamis, A., Raoult, D., & La Scola, B. (2004). rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(9), 3925-3931.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Procop G, Woods G (2005). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. *Sixth edition*. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers,* 700-711.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (1997). Diagnostic microbiology. *The nonfermentative gram-negative bacilli. Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers*, 253-320.

Kusner, D. J., Hall, C. F., & Schlesinger, L. S. (1996). Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis or opsonized zymosan by human macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, *184*(2), 585-595.

Kuyucuoğlu Y, Erganiş O, 1999. Konya Bölgesindeki Koyunlardan İzole Edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Suşların Bazı Biyokimyasal Özellikleri ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Veterinerium*, 1 (10), 27-30.

LeaMaster, B. R., Shen, D. T., Gorham, J. R., Leathers, C. W., & Wells, H. D. (1987). Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. *American Journal of Veterinary Research*, *48*(5), 869-872.

Li, H., Yang, H., Zhou, Z., Li, X., Yi, W., Xu, Y., ... & Hu, S. (2018). Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of Corynebacterium pseudotuberculosis from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*, *168*, 69-75.

Liu, H., Li, S., Meng, L., Dong, L., Zhao, S., Lan, X., ... & Zheng, N. (2017). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from dairy herds in northern China. *Journal of Dairy Science*, *100*(11), 8796-8803.

Lloyd, S., Lindsay, H. J., Slater, J. D., & Jackson, P. G. G. (1990). Caseous lymphadenitis in goats in England. *Veterinary Record*, *127*(19).

Lund, A., Almlid, T., Larsen, H. J., & Steine, T. (1982). Antibodies to Corynebacterium pseudotuberculosis in adult goats from a naturally infected herd. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *23*(4), 473.

Magdy Selim, A., Atwa, S. M., El Gedawy, A. A., & Younis, E. E. (2022). Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in sheep of Dakhlia, Egypt. *Animal Biotechnology*, *33*(7), 1655-1660.

Meldrum, K. C. (1990). Caseous lymphadenitis outbreak. *Veterinary Record*, *126*(15).

Menzies, P. I., Muckle, C. A., Hwang, Y. T., & Songer, J. G. (1994). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an Escherichia coli recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of Corynebacterium pseudotuberculosis infection. *Small Ruminant Research*, *13*(2), 193-198.

Merchant, I. A., & Packer, R. A. (1967). The genus corynebacterium. *Veterinary Bacteriology and Virology. The Iowa State University Press, IA, USA*, 425-440.

Miers, K. C., & Ley, W. B. (1980). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in the horse: study of 117 clinical cases and consideration of etiopathogenesis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *177*(3), 250-253.

Møller, K., Agerholm, J. S., Ahrens, P., Jensen, N. E., & Nielsen, T. K. (2000). Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *47*(1), 55-62.

Muckle, C. A., & Gyles, C. L. (1986). Exotoxic activities of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Current Microbiology*, *13*, 57-60.

Musa, N. O., Babiker, A., Eltom, K., Rodwan, K., & El Sanousi, S. M. (2012). Prevalence of *Staphylococcus aureus subsp. Anaerobius* in sub-clinical abscess cases of sheep. British Microbiology Research Journal, 2(3), 131.

Musa, N. O., Babiker, A., Eltom, K., Rodwan, K., & El Sanousi, S. M. (2012). Prevalence of Staphylococcus aureus subsp. Anaerobius in sub-clinical abscess cases of sheep. *British Microbiology Research Journal*, *2*(3), 131.

Musa, N. O., Eltom, K., Gessler, F., Boehnel, H., Babiker, A., & El Sanousi, S. M. (2010). The catalase gene differentiates between some strains of *Staphylococcus aureus ssp anaerobius.*

Musa, N. O., Eltom, K., Gessler, F., Bohnel, H., Babiker, A., Elhaj, M. O., & El-Sanousi, S. M. (2009). Characterization of some *Staphylococcus aureus subspecies anaerobius* isolates by spa and coa genes. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *8*(11), 2272-2275.

Nalça, A., & Gülhan, T. (2021). Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Virülens Gen Profillerinin Belirlenmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *10*(2), 144-152.

Nassar, A. F. D. C., Daniel, G. T., Ruiz, R., Miyashiro, S., Scannapieco, E. M., Souza, J. D., & Gregory, L. (2016). Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. *Arquivos do Instituto Biológico*, *82*, 01-06.

Navas, J. (1996). Genetic tools in pathogenic nocardioform actinomycetes. *Microbiologia (Madrid, Spain)*, *12*(2), 297-304.

Oliveira, L. C. D., Leite, C. A. L., Brilhante, R. S. N., & Carvalho, C. B. M. (2006). Etiology of canine otitis media and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* in Fortaleza city, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *37*, 144-147.

Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *66*(2), 86.

Onon, E. O. (1979). Purification and partial characterization of the exotoxin of Corynebacterium ovis. *Biochemical Journal*, *177*(1), 181-186.

Oreiby, A. F., Hegazy, Y. M., Osman, S. A., Ghanem, Y. M., & Al-Gaabary, M. H. (2014). Caseous lymphadenitis in small ruminants in Egypt. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere*, *42*(05), 271-277.

Över, U., Tüç, Y., & Söyletir, G. (2000). Catalase-negative *Staphylococcus aureus*: a rare isolate of human infection. *Clinical Microbiology and İnfection*, *6*(12), 681-682.

Öztürk, D., & Karkacier, O. (2008). Süt sığırcılığı yapan işletmelerin ekonomik analizi (Tokat ili Yeşilyurt ilçesi örneği). *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *2008*(1), 15-22.

Pacheco, L. G., Pena, R. R., Castro, T. L., Dorella, F. A., Bahia, R. C., Carminati, R., ... & Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(4), 480-486.

Paksoy, M. (2007). Kahramanmaraş ilinde süt üretimine yönelik keçi yetiştiriciliğine yer veren tarım işletmelerinin ekonomik analizi. *Journal of Agricultural Sciences*, *14*(04).

Parin, U., Kirkan, S., Ural, K., Savasan, S., Erbas, G., Gultekin, M., ... & Balikci, C. (2018). Molecular identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Acta Veterinaria Brno*, *87*(1), 3-8.

Park, J. B., Kim, J. H., Kim, Y., Ha, S. H., Kim, J. H., Yoo, J. S., ... & Ryu, S. H. (2000). Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by α-actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(28), 21295-21301.

Pathirana, H. N. K. S., Cho, H. S., Cho, Y. I., Kim, C. L., Wimalasena, S. H. M. P., Rajapaksha, L. G. T. G., ... & Shin, G. W. (2022). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from skin abscesses of native Korean goats (Capra hircus coreanae). *Journal of Applied Microbiology*, *133*(3), 2074-2082.

Paton, M. W. (2000). Applying the experience of CLA in the Southern Hemisphere. In *Proceedings of the Moredun Research Institute/Scottish Agricultural College Workshop on Caseous Lymphadenitis* (pp. 3-15).

Paton, M. W., Rose, I. R., Hart, R. A., Sutherland, S. S., Mercy, A. R., Ellis, T. M., & Dhaliwal, J. A. (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Australian Veterinary Journal*, *71*(2), 47-49.

Paton, M. W., Sutherland, S. S., Rose, I. R., Hart, R. A., Mercy, A. R., & Ellis, T. M. (1995). The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. *Australian Veterinary Journal*, *72*(7), 266-269.

Paton, M. W., Walker, S. B., Rose, I. R., & Watt, G. F. (2003). Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Veterinary Journal*, *81*(1‐2), 91-95.

Paule, B. J. A., Meyer, R., Moura-Costa, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Regis, L. F., ... & Azevedo, V. (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, *34*(2), 311-316.

Peake, S. L., Peter, J. V., Chan, L., Wise, R. P., Butcher, A. R., & Grove, D. I. (2006). First report of septicemia caused by an obligately anaerobic *Staphylococcus aureus* infection in a human. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(6), 2311-2313.

Peel, M. M., Palmer, G. G., Stacpoole, A. M., & Kerr, T. G. (1997). Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clinical Infectious Diseases*, *24*(2), 185-191.

Pegram, R. G. (1973). unusual form of lymphadenitis in sheep and goats in the Somali Democratic Republic. *Trop Anim Health and Prod*.

Pépin, M., Fontaine, J. J., Pardon, P., Marly, J., & Parodi, A. (1991). Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Veterinary Microbiology*, *29*(2), 123-134.

Pepin, M., Paton, M., & Hodgson, A. L. M. (1994). Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Curr. Top. Vet. Res*, *1*, 63-82.

Pérez-Sancho, M., Vela, A. I., Horcajo, P., Ugarte-Ruiz, M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J. F., & de la Fuente, R. (2018). Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* subspecies based on MALDI-TOF MS profiles. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *30*(6), 813-820.

Pilla, R., Snel, G. G., Malvisi, M., & Piccinini, R. (2013). Duplex real-time PCR assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cow milk. Journal of Dairy Research, 80(2), 223-226.

Pincus, D. H. (2006). Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 2006, 1-32.

Piontkowski, M. D., & Shivvers, D. W. (1998). Evaluation of a commercially available vaccine against Corynebacterium pseudotuberculosis for use in sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *212*(11), 1765-1768.

Prescott, J. F., Menzies, P. I., & Hwang, Y. T. (2002). An interferon-gamma assay for diagnosis of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in adult sheep from a research flock. *Veterinary microbiology*, *88*(3), 287-297.

Quinn, J. P., Arnow, P. M., Weil, D., & Rosenbluth, J. (1984). Outbreak of JK diphtheroid infections associated with environmental contamination. *Journal of clinical microbiology*, *19*(5), 668-671.

Reich, R., Blumenthal, M., & Liscovitch, M. (1995). Role of phospholipase D in laminin-induced production of gelatinase A (MMP-2) in metastatic cells. *Clinical & experimental metastasis*, *13*, 134-140.

Rizvi, S., Green, L. E., & Glover, M. J. (1997). Gaseous lymphadenitis: An increasing cause for concern [1]. *Veterinary Record*, *140*(22), 586-587.

Rodwan, K. (1996). *Vaccination trails against Morel's disease in sheep* (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis, University of Khartoum, Sudan).

Romero-Perez, J. C., Suner-Machado, M., & Batista-Diaz, N. (2004). *Corynebacterium pseudotuberculosis* lymphadenitis in a young patient. *Revista Clinica Espanola*, *204*(7), 388-389.

Sá, M. D. C. A. D., Gouveia, G. V., Krewer, C. D. C., Veschi, J. L. A., Mattos-Guaraldi, A. L. D., & Costa, M. M. D. (2013). Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*, *36*, 265-268.

Sakmanoğlu, A., Hadimli, H. H., Erganiş, E., Pınarkara, Y., Sayın, Z., & Kav, K. (2015). Koyunlardan izole edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Eurasian J Vet Sci*, *31*(2), 116-121.

Sandel, M. K., & McKillip, J. L. (2004). Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*, *15*(1), 5-10.

Santa Quiteria, J. R., Cid, D., Sanz, R., Garcia, S., & De la Fuente, R. (1996). Influence of age of the donor sheep on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* subspecies *anaerobius* and *S aureus* by neutrophils. *Research in Veterinary Science*, *61*(3), 231-233.

Sanz, R., Marı́n, I., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Orden, J. A., Cid, D., Diez, R. M., ... & de la Fuente, R. (2000). Catalase deficiency in *Staphylococcus aureus* subsp*. anaerobius* is associated with natural loss-of-function mutations within the structural gene. *Microbiology*, *146*(2), 465-475.

Schreuder, B. E., Ter Laak, E. A., & Dercksen, D. P. (1994). Eradication of caseous lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed ELISA technique. *The Veterinary Record*, *135*(8), 174-176.

Semerci, A., & Çelik, A. D. (2016). Türkiye’de Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin Genel Durumu. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2).

Seyffert, N., Guimarães, A. S., Pacheco, L. G. C., Portela, R. W., Bastos, B. L., Dorella, F. A., ... & Azevedo, V. (2010). High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Research in Veterinary Science*, *88*(1), 50-55.

Sezgin, Y. (2006). Bitlis ilinde göçer ailelerin küçükbaş hayvancılık faaliyetleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Van*.

Shigidi, M. T. A. (1979). A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *British Veterinary Journal*, *135*(2), 172-177.

Shirlaw, J. F., & Ashford, W. A. (1962). The occurrence of caseous lymphadenitis and Morel’s disease in a sheep flock in Kenya. *Vet. Rec*, *74*, 1025-1026.

Slosarkova, S., Bzdil, J., Nedbalcova, K., Matiasovic, J., Fleischer, P., & Stanek, S. (2019). New sequence type ST3756 of *Staphylococcus aureus* subspecies *anaerobius* as the causative agent of abscessing lymphadenitis in sheep. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *63*, 112-116.

Solanet, J. J., Malena, R., Estein, S. M., & Paolicchi, F. A. (2011). Development of an ELISA test to detect antibodies in vaccinated sheep or infected Corynebacterium pseudotuberculosis. *Revista Argentina de Microbiologia*, *43*(1), 9-17.

Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*, *5*(4), 156-161.

Songer, J. G., Beckenbach, K., Marshall, M. M., Olson, G. B., & Kelley, L. (1988). Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, *49*(2), 223-226.

Stanford, K., Brogden, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C., & Audibert, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *62*(1), 38.

Stapleton, S., Bradshaw, B., & O’Kennedy, R. (2009). Development of a surface plasmon resonance-based assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Analytica Chimica Acta*, *651*(1), 98-104.

Stefanska, I., Gierynska, M., Rzewuska, M., & Binek, M. (2010). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *13*(1), 143.

Sutherland, S. S., Hart, R. A., & Buller, N. B. (1993). Ribotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, *70*(12), 454-456.

Szaluś-Jordanow, O., Kaba, J., Czopowicz, M., Witkowski, L., Nowicki, M., Nowicka, D., ... & Frymus, T. (2010). Epidemiological features of Morel’s disease in goats. *Pol J Vet Sci*, *13*, 437-445.

Szaluś-Jordanow, O., Krysztopa-Grzybowska, K., Czopowicz, M., Moroz, A., Mickiewicz, M., Lutyńska, A., ... & Frymus, T. (2018). MLST and RAPD molecular analysis of *Staphylococcus aureus* subsp*. anaerobius* isolated from goats in Poland. *Archives of Microbiology*, *200*, 1407-1410.

Tashjian, J. J., & Campbell, S. G. (1983). Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopic study. *American Journal of Veterinary Research*, *44*(4), 690-693.

Ter Laak, E. A., Bosch, J., Bijl, G. C., & Schreuder, B. E. (1992). Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *American Journal of Veterinary Research*, *53*(7), 1125-1132.

Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK]. (2022). Türkiye İstatistik Kurumu. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2022-49682>

Ünlütürk, A., Turantaş, F. (1998). *Gıda Mikrobiolojisi.* İzmir: Pınar Yayınları.

van Dijk, M. C., Postma, F., Hilkmann, H., Jalink, K., van Blitterswijk, W. J., & Moolenaar, W. H. (1998). Exogenous phospholipase D generates Iysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca2+ signaling pathways. *Current Biology*, *8*(7), 386-392.

Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. *Nucleic Acids Research*, *19*(24), 6823-6831.

Waite, K. A., Wallin, R., Qualliotine-Mann, D., & McPhail, L. C. (1997). Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox: evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(24), 15569-15578.

Walker, J., Jackson, H. J., Eggleton, D. G., Meeusen, E. N., Wilson, M. J., & Brandon, M. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infection and İmmunity*, *62*(6), 2562-2567.

Watts, J. L., Lowery, D. E., Teel, J. F., & Rossbach, S. (2000). Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, *83*(10), 2373-2379.

Welsh, C. J., Yeh, G. C., & Phang, J. M. (1994). Increased Phospholipase D Activity in Multidrug-Resistant Breast Cancer Cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *202*(1), 211-217.

Williamson, L. H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *17*(2), 359-371.

Wilson, M. J., Brandon, M. R., & Walker, J. (1995). Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and İmmunity*, *63*(1), 206-211.

Xu, J., Tan, X., Zhang, X., Xia, X., & Sun, H. (2015). The diversities of *staphylococcal* species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microbial Pathogenesis*, *88*, 29-38.

Xu, Y. J., Botsford, M. W., Panagia, V., & Dhalla, N. S. (1996). Responses of heart function and intracellular free Ca2+ to phosphatidic acid in chronic diabetes. *The Canadian Journal of Cardiology*, *12*(10), 1092-1098.

Xu, Y. J., Panagia, V. I. N. C. E. N. Z. O., Shao, Q. I. M. I. N. G., Wang, X., & Dhalla, N. S. (1996). Phosphatidic acid increases intracellular free Ca2+ and cardiac contractile force. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *271*(2), H651-H659.

Yeruham, I., Elad, D., Van‐Ham, M., Shpigel, N. Y., & Perl, S. (1997). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. *Veterinary Record*, *140*(16), 423-427.

Yıldız, A., Aygün, T. (2021). Van ili Merkez ilçede küçükbaş hayvancılık faaliyetleri ve genel sorunlar: II. İşletmelerde yetiştirme işleri. *Hayvan Bilimi ve Ürünleri Dergisi*, *4*(1), 37-53.

Yozwiak, M. L., & Songer, J. G. (1993). Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *American Journal of Veterinary Research*, *54*(3), 392-397.

Zaitoun, A. M., & Bayoumi, A. H. (1994). Some epidemiological studies on ovine pseudotuberculosis. *Assiut Veterinary Medical Journal*, *31*(61), 238-250.

Zasada, A. A., & Mosiej, E. (2018). Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. *Letters in Applied Microbiology*, *66*(6), 472-483.

Zavoshti, F. R., Khoojine, A. B. S., Helan, J. A., Hassanzadeh, B., & Heydari, A. A. (2012). Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Comparative clinical pathology*, *21*, 667-671.

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# BİLİMSEL ETİK BEYANI

# “Ege Bölgesinde Yetiştirilen Koyun Ve Keçilerde Apselerden İzole Edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Ve *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı tezimdeki bütün bilgileri etik davranışlar ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Çağatay NUHAY

# ÖZ GEÇMİŞ

# Soyadı, Adı : Çağatay NUHAY

# Uyruk : T.C

# Doğum tarihi ve yeri : 23.08.1988/ Karşıyaka

# Telefon : 0544 933 64 67

# E-mail : cnuhay@gmail.com

# Yabancı dil : İngilizce

# EĞİTİM

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Derece** | **Kurum** | **Mezuniyet Tarihi** |
| Yüksek Lisans | Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji | Temmuz 2017 |
| Lisans | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi | Ocak 2012 |

# 

# İŞ DENEYİMİ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Yıl** | **Yer/Kurum** | **Ünvan** |
| 2018- | İzmir/ Bornova Veteriner Kontrol Ensititüsü | Veteriner Hekim |
| 2016-2018 | Konya Veteriner Kontrol Ensititüsü | Veteriner Hekim |
| 2013-2016 | Samsun/ Vezirköprü İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü | Veteriner Hekim |

# 

# AKADEMİK YAYINLAR

# MAKALELER

Samsun ili ve ilçelerinde yetiştirelen Anadolu Mandalarının dışkı örneklerinde Esherichia coli O157:H7’nin tespiti Etlik Mikrobiyoloji Dergisi 2017 s39-46

Investigation of Escherichia coli septicemia and antibiotic susceptibility in neonatal lamb deaths in the Aegean region. Journal of Advances in VetBio Science and Techniques, 7(3), 305-312. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1135125>

EGE BÖLGESİNDE KOYUN VE KUZU PNÖMONİSİ OLGULARINDA PASTEURELLA MULTOCİDA VE MANNHEİMİA HAEMOLYTİCA İZOLASYONU VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLERİNİN TESPİTİ. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 33 (2) , 59-63. DOI: 10.35864/evmd.1133898

Genotyping of Brucella isolates from animals and humans by Multiple-Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA),

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases,

Volume 96,

2023,101981,ISSN 0147-9571,https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.101981.

Parasitological, Bacteriological and Virological Research of Carp (Cyprinus carpio) in a Case in Hirfanlı Dam Lake in Türkiye Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi

2023-04-16 | Journal article

DOI: 10.35864/evmd.1216910

Determination of Biofilm Formation, Antibacterial Resistance and Genotypes of Bacillus cereus Isolates from Raw Milk Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2023 (Article in Press). DOI: 10.9775/kvfd.2023.29162

Intense exercise stress may trigger Corynebacterium kutscheri infection in Sprague-Dawley rats . Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University , 8 (2) , 136-144 . DOI: 10.24880/maeuvfd.1249794

# PROJELER

TAGEM (2017/2021)

Hayvanlardan ve İnsanlardan İzole Edilen Brucella İzolatlarının Multiple- Locus

Variable Number Tandem Repeat Analysis ile Genotiplendirilmesi ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Araştırılması

Ondokuz Mayıs Üniversitesi (2015/2017)

Samsun ili ve ilçelerinde yetiştirelen Anadolu Mandalarının dışkı örneklerinde

Esherichia coli O157:H7’nin tespiti

TAGEM

Koyun ve Keçilerin Kazeöz Lenfadenitis Enfeksiyonlarına karşı Kombine Aşı

Hazırlanması

TÜBİTAK

Sığırların Mastitis Enfeksiyonları Karşı Ulusal Suşlar ile Kombine Aşı Üretimi

# BİLDİRİLER

Akdeniz Fokunda Edwardsiella tarda Olgusu Poster Sunumu XV. ULUSAL VETERİNER MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ ULUSLARARASI KATILIMLI 26-28 EKİM 2022 NEVALİ OTEL- ŞANLIURFA.

Ege Bölgesi Deney Hayvanı Tesislerinde Yetiştirilen Farelerde Corynebacterium kutscheri Varlığının Araştırılması 5. Ulusal Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi( Sözlü Bildiri) 14-16 Eylül 2023

Helicobacter spp. Enfeksiyonunun Fare ve Ratlarda Bazı Kan Parametreleri Üzerindeki Etkisi 5. Ulusal Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi ( Sözlü Bildiri) 14-16 Eylül 2023