

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**SIĞIRLARDA *MORAXELLA BOVIS*'İN İZOLASYONU VE
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

SEZAR GÜMÜŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Uğur PARIN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17007 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim DalıProgramı çerçevesinde tarafından
hazırlanan “.....” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek
Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (Tez Danışmanı):
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince destek ve yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, ayrıca ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Uğur PARIN'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

En sıkıntılı anlarımda bana anlayış gösteren, her zaman destek olan, ne olursa olsun bana sevgi, şefkat ve güler yüz ile yaklaşan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tarihçe	3
2.2. Etiyoloji	4
2.3. Genel özellikler	5
2.4. Epidemiyoloji	8
2.5. Tür Duyarlılığı	9
2.6. Bulaşma	9
2.7. İnsidens	9
2.8. Patogenezis	10
2.9. Virulans Faktörleri	14
2.9.1. Pili	14
2.9.2. Sitotoksin	15
2.9.3. Plazmid	16
2.10. Seğirme Hareketi	17
2.11. Klinik Görünüm	17
2.12. Tedavi ve Kontrol	18
2.13. Tedavi Stratejileri	19
2.14. Antibiyotik Duyarlılığı	20
2.15. Aşılama	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. İzolasyon Örnekleri	29

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Antibiyotik Diskleri ve Ayıraçlar	33
3.1.2.1. Besiyerleri	33
3.1.2.1.1. İzolasyon Besiyerleri	33
3.1.2.1.1.1. Tryptic Soy Broth (Merck®, 1.09205)	33
3.1.2.1.1.2. Blood Agar (Merck®, 110886)	33
3.1.2.1.2. İdentifikasyon besiyerleri	34
3.1.2.1.2.1. MacConkey Agar (Merck®, 105465)	34
3.1.2.1.2.2. Jelatin Agar (Merck®, 1.04070).....	34
3.1.2.1.2.3. Lassen'in 3'lü tüp besiyerleri	34
3.1.2.1.2.4. Urea Broth (Merck®, 108483)	36
3.1.2.1.2.5. Nitrate Broth (Difco™, 226810)	36
3.1.2.1.3. Antibiyogram Besiyeri	36
3.1.2.1.3.1. Mueller-Hinton Agar (Merck®, 1.05437).....	36
3.1.2.1.4. Antibiyotik Diskleri	36
3.1.2.2. Ayıraçlar	37
3.1.2.2.1. İndol ayıracı	37
3.1.2.2.2. Nitrat ayıracı	37
3.1.3. Pozitif Kontrol	37
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Fenotipik İdentifikasyon	37
3.2.1.1. <i>Moraxella bovis</i> İdentifikasyonu.....	37
3.2.1.2. Jelatin Agarda Üreme	38
3.2.1.3. MacConkey Agarda Üreme	38
3.2.1.4. Biyokimyasal Testler	38
3.2.1.4.1. Katalaz Testi	38
3.2.1.4.2. Oksidaz testi	39
3.2.1.4.3. Nitrat Testi	39
3.2.1.4.4. İndol testi	39
3.2.1.4.5. Karbonhidrat Fermentasyonu	40
3.2.1.4.6. Üreaz Testi	40
3.2.1.4.7. Penisilin G ve Kloksasilin Duyarlılığı	40
3.2.1.4.8. Hemaglutinasyon testi	40
3.2.1.4.9. Otoaglutinasyon testi	41
3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	41

4. BULGULAR	42
4.1. İzolasyon Bulguları	42
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları	45
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
İBK	: İnfeksiyöz Bovine Keratokonjunktivitis
IFA	: Indirect Immunofluorescence Assay
IgM	: İmmunglobülin M
IHA	: Indirect Hemagglutination Assay
IM	: Inner Membran
İm	: İntramuskuler
İv	: İntravenöz
Kg	: Kilogram
LPS	: Lipopolisakkarit
Mg	: Miligram
OM	: Outer Membrane
Osp	: Outer surface protein
P	: Protein
PCR	: Polimeraze Chain Reaction
RNA	: Ribonükleik Asit
Sc	: Subkutan
TMB	:Tetramethylbenzidine

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>M. bovis</i> biyokimyasal yapısı.....	15
Şekil 2. <i>M. bovis</i> 9208 baz uzunluğunda RTX operon haritası.....	16

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>M. bovis</i> genel özellikleri.....	7
Tablo 2. Pink Eye hastalığı gelişim evreleri	12
Tablo 3. Örnek alınan sığırlara ait bilgiler.....	30
Tablo 4. Biyokimyasal identifikasyon sonuçları	42
Tablo 5. Kullanılan antibiyotiklerin zon çapı standartları (mm)	46
Tablo 6. Kullanılan antibiyotiklerin zon çapı standartları (mm)	46
Tablo 7. Elde edilen <i>M. bovis</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sayıları.....	47

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. İnfeksiyöz keratokonjüvitis klinik görünümü.....	6
Resim 2. <i>M. bovis</i> mikroskopik morfolojisi.....	7
Resim 3. <i>Musca autumnalis</i> (yüz sineği)	8
Resim 4. <i>M. bovis</i> tip 4 pili mikroskopik görünümü	15
Resim 5. Bulber konjonktiva enjeksiyonları.....	19
Resim 6. Numune alınan İBK şüpheli hayvanın klinik görünümü	30

ÖZET

SIĞIRLARDA *MORAXELLA BOVIS*'İN İZOLASYONU VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Gümüş S. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.

Araştırmamızda sığırlarda infeksiyöz keratokonjunktivitis olgularından *Moraxella bovis* izolasyon oranının saptanması ve izole edilecek suşların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Araştırmanın hayvan materyalini infeksiyöz keratokonjunktivitis klinik bulguları mevcut olan Aydın ilindeki sığır işletmelerinde bulunan ve çeşitli yaşlardaki 100 adet sığır oluşturmuştur. Sığırların konjuktival keselerinden steril svaplar ile sürüntü numunesi alınarak, etken izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrası yapılan fenotipik identifikasyon sonucunda incelenen 80 adet oküler sürüntü örneğinin 10 (% 12.5) adedinden *M. bovis* identifiye edilmiştir. Ayrıca *M. bovis* dışında 44 *Proteus* sp., 25 *Streptococcus* sp., 16 *Staphylococcus* sp., 8 *Bacillus* sp., 2 *Corynebacterium* sp., 1 *E. coli* ve 1 *Candida* sp. identifiye edilmiştir. *M. bovis* suşlarına yapılan antibiyogram testleri sonucunda *M. bovis* izolatlarının amoksisilin- klavulanik asit'e % 70, florfenikol'e % 80, Sefoperazona % 60, oksitetrasikline ve enrofloksasine % 50, gentamisine % 40 oranlarında duyarlı, klaritromisine % 80 ve eritromisin'e % 100, oranlarına dirençli olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, *M. bovis* etkenine bağlı İBK hastalığının sürülerde erken dönemde teşhis edilmesi ve tedavide etkin antibiyotiklerin kullanımının yaygınlaştırılmasının sağlanması ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sığır, İnfeksiyöz Keratokonjunktivitis, *Moraxella bovis*, İdentifikasyon.

ABSTRACT

ISOLATION OF *MORAXELLA BOVIS* IN CATTLE AND DETECTION OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES

Gümüş S. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, Master Thesis, Aydın, 2017.

The scope of this study was determination of isolation rates of *Moraxella bovis* from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in cattle and antibiotic susceptibility of strains. The animal material of research, consisted of 100 units of existing animals and different age groups with infectious bovine keratoconjunctivitis clinical findings found in the cattle business in Aydın Province. Isolation of the agent was done by taking sterile swab samples from the conjunctival sacs of cattle. Ten (5.12%) *M. bovis* were identified by phenotypic identification in 80 ocular swabs samples. Also 44 *Proteus* sp., 25 *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp 16., 8 *Bacillus* sp., 2 *Corynebacterium* sp., 1 *E. coli* and 1 *Candida* sp. have been identified. Antibiogram test results revealed that *M. bovis* isolates were sensitive to amoxicillin to clavulanic acid in the ratio of 70 %, florfenicol in the ratio of 80 %, cefoperazone in the ratio of 60 % oxytetracycline and enrofloxacin in the ratio of 50 %, gentamicin 40%, resistant to clarithromycin in the ratio of 80%, erythromycin in the ratio of 100%. As a result, it has been revealed that IBK disease due to *M. bovis* etiology should be diagnosed early in the course of the disease and the inducement of the use of effective antibiotics in the treatment.

Keywords: Cattle, Infectious Keratoconjunctivitis, *Moraxella bovis*, Identification.

1. GİRİŞ

Sığırların enzootik ve epizootik nitelikli keratokonjunktivitis ılıman iklime sahip ülkelerde daha yoğun olmak üzere tüm dünyada sığırlarda görülen en yaygın ve önemli göz hastalığıdır. “İnfeksiyöz Bovine Keratokonjunktivitis (IBK)”, “Oftalmia Epizootika”, “Sığırların Enfeksiyöz Göz Yangısı”, “pink eye”, “New Forest” adları verilmektedir. Zoonotik olmamakla birlikte sığırlar dışında koyun, keçi, domuz ve kanatlılarda da gözlenebilir. Hastalık ülkemizde Temmuz ve Eylül aylarında tüm bölgelerde izlenebilmektedir (Işık, 2008; Whittier ve ark, 2009).

Moraxella bovis gram negatif, küt, kalın, uçları yuvarlak, tek veya ikili kokobakteriler şeklindedir. Uç uca eklenerek kısa zincirler oluşturabilirler. Fimbriaları vardır. Aerob, sporsuz, hareketsiz ve aside dirençsizdir. Optimal üreme sıcaklıkları 32-37°C dir. Üreme gereksinimleri komplekstir. Zenginleştirilmiş kanlı veya serumlu besi yerlerinde ürerler. Çeşitli tipte koloniler oluştururlar. Fimbriyalı suşlar kanlı agarda 1-3 mm çapında hemolitik koloniler oluştururlar. Bu koloniler agar yüzeyinden zor kaldırılırlar. Fimbriyalı suşların otoaglutinasyon özellikleri vardır. Litik fajları saptanmıştır. *M. bovis* suşları oksidaz pozitif, glukoz, üreaz ve nitrat negatiftir. MacConkey agarda üreme görülmez. Katalaz testi suşlar arasında farklılık gösterir. Suşların çoğu jelatini ve kazeini hidrolize eder, ayrıca esteraz, lipaz, fosfoamidaz, fosfataz, fibrinolizin ve hiyaluronidaz gibi enzimler salgırlar. Penisiline çok duyarlıdır. *M. bovis*'in fimbriyası, hemolizini, sitotoksini ve hidrolitik enzimi önemli antijenleri arasındadır. İnfekte hayvanlarda bu antijenlere karşı oluşmuş antikorlar bulunur. Agar-jel immundiffüzyon tekniği ile 6 serogrup (A-F) ve bu serogruplar içinde toplam 12 serotip bildirilmiştir (Leppe ve ark, 1992). Hasta hayvanlarda ilk klinik belirtiler gözde ileri ölçüde lakrimasyon, fotofobi, görüş bozukluğu ile ortaya çıkar. Su kıvamındaki gözyaşı akıntısı, kısa zamanda purulent bir görünüm kazanır. Konjunktivitisin ilk belirtileri blefarospazm ön segment inflamasyonu ve lokal ağrıdır. Korneadaki değişiklikler, hastalığın başlamasıyla beraber ilk 3 gün içinde kendisini belli eder. Korneanın merkezi yaklaşık 3 mm çapında bulutlu görünümündedir. Konjunktival alanlar hiperemik ve ödemlidir. Limbus'a (kornea ve skleranın birleşme yeri) ait damarların kornea üzerinde aşırı derecede yayılmasını takiben ilk 7. günde korneal ülserler gelişir. Korneal ülserler epitel ve bazal katmanlardan derin stromal dokuya kadar ilerleyecek şekilde hızla büyür. Korneanın perforasyonu sonucu

desematosel ve panoftalmi görülebilir. Pratikte ölüm olayları görülmemiştir, fakat ileri derecede körlükle sonuçlanan olgulara sıklıkla rastlanılmaktadır (Luke ve ark, 2004).

IBK'da pratikte ölüm olayları görülmemekte, ancak kalıcı körlük ve süt verimi kayıpları nedeniyle ekonomik yönden önemli bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Samsar ve ark, 1993). Göz enfeksiyonlarında gözün yüzeyinde biyofilm oluşturan çeşitli bakteri türlerinin de etkilerinin olduğuna dair artan kanıtlar mevcut olması nedeniyle IBK'nın biyofilm temelli bir hastalık olarak kabul edilmemekte ve *M. bovis*'in biyofilm yaşam tarzına adaptasyon kabiliyeti hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bununla beraber *M. bovis*'in klinik izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin araştırılması, biyofilm oluşumunun farklı cansız yüzeylerde ve kültür koşullarında kıyaslanması ve biyofilm oluşumlarının kalitatif ve kantitatif olarak belirlenerek *in vitro* olarak tip 4 pilinin biyofilm oluşumundaki rolünün belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, MgCl₂'e maruz bırakılan tip 4 pililerin belirgin şekilde hücre yüzeyinden ayrıştıkları bildirilmiştir (Furmanek-Blaszczak ve ark, 2013). Böylece *M. bovis*'in biyofilm oluşturmaya engellenmiş ve aynı zamanda önceden oluşan biyofilm tabakasının da parçalanması sağlanmıştır. *M. bovis*'in sığır gözü ve/veya burun boşluğunda kolonizasyon sürecinin anlaşılmasında yeni bir yaklaşım teşkil edebilecek olan bu sonuçlar, gelecekte IBK'nın kontrolü için yeni antimikrobiyal tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilecek niteliktedir .

Sığırlarda görülen ve bulaşıcı özelliği açısından risk oluşturan IBK hastalığı dünya çapında yaygın olarak bilinmesine karşın ülkemizde veteriner sahada yapılan çalışmalar yeterli düzeyde değildir. Bu çalışma ile Aydın ili ve çevresinde bulunan sığır işletmelerinde etkenin tespiti yapılarak hastalığın bölgedeki varlığının araştırılması, etkenin antibakteriyellere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi sonucunda hastalığın saptandığı çiftliklerde gerekli önlemlerin alınması amacıyla veteriner hekimlere etkene uygun antibiyotik kullanılması için literatür ışığında bölgesel bir veri sunulması ve gelecek çalışmalara yön verilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Sığırların bulaşıcı göz hastalığı çok eski tarihlerden beri bilinmektedir. Veteriner hekimliği ile ilgili en eski belgelerden olan Kahun Papirüsü'nde, göz hastalıkları ve ilgili konular da yer almıştır. Bu papirüste, bir boğada gözlerde akıntı görüldüğünde hayvan için dua edilmesi; gözlerin su kabağı ya da kavun ve karpuzla ovulmasının yanı sıra tütsü uygulanması önerildikten sonra gözler eğer aralanmış ise sıcak ketenle bandaj uygulaması önerilmiştir. IBK ilk kez 1889'da, ABD'de "enfeksiyöz oftalmia", "pink eye", "kontagiyöz oftalmia" isimleriyle tanımlanmıştır. Hastalık etkeni bakteri ilk kez 1915 yılında izole edilmiştir. Hastalık 1976 yılında Bedford tarafından "infectious keratitis" olarak isimlendirmiştir. Bulaşıcı keratit ilk kez Billings tarafından, 1889 yılında rapor edilmiştir. Billings, 1888 yılında yaz ve sonbahar aylarında ortaya çıkan, Lincoln ve Nebraska çevresindeki süt sığırı işletmelerinde görülen hastalığın yeni olmadığını ve muhtemelen tüm Amerika'da görüldüğünü varsaymış ve korneanın bölümlerinde uçları ince kısa basillerin varlığından söz etmiştir. Billings, hastalıklı hayvanların gözlerinden etkeni üreterek sağlıklı hayvanlarda ve tavşan gözlerinde hastalık meydana getirmeyi başaramamış ve bahsettiği bu organizmaları tanımlayamamıştır. Kappeyney ve Ward tarafından, 1917'de tercüme edilen bir makalede, Poels'in 1911 yılında Hollanda'da sığır keratitisi etiyolojik ajanının *Bacillus pyogenes* olduğu iddiası rapor edilmiştir. Ancak Poels etkeni kornea tabakaları arasına enjekte ederek üretememiştir ve ondan başka kimse IBK etkeni olarak *Bacillus pyogenes* etkenini sorumlu tutmamıştır. *M. bovis* identifikasyonu ilk defa 1915'te Mitter tarafından yapılmıştır. Bengal'de bir keratit salgınında diplobasiller izole edilmiş ve etken Morax-Axenfeld'in basili olarak tanımlanmıştır. Morax-Axenfeld diplobasili çubuk şeklinde genellikle hareketsiz ve gram negatifler basil çiftleri olarak tanımlanmış ve *Moraxella lacunata* olarak adlandırılmıştır. İnsanlardaki yaygın kataral konjunktivitleri 1896 yılında İsviçre kökenli Fransız Oftalmolog Victor Morax ve 1897'de Alman Oftalmolog Theodor Aksenfeld tarafından tanımlanmıştır. Hastalık insanlarda "Morax-Aksenfeld konjunktiviti" olarak adlandırılmaktadır. Allen, Kanada'da, 1919 yılında ortaya çıkan bir enfeksiyöz keratit salgınında, enfekte hayvanların gözlerinden direk sürme froti yapıp boyayarak gram negatif kısa ve kalın görünümde diplobasilleri bildirmiştir. Allen hasta hayvanların gözlerinden elde

ettiği materyaller ile sağlam hayvanları enfekte ederek enfeksiyonu oluşturabilmiştir. Agarda basil izolasyon çalışmalarında ise başarılı olamamıştır. Allen sonraki çalışmalarında, Loeffler kan serumlu agarda kolaylıkla pleomorfik diplobasilleri izole etmiştir. Ancak izole ettiği etkenlerin saf kültürleriyle IBK oluşturmada başarılı olamamıştır. Jones ve Little, 1923 yılında infeksiyöz keratitli sığırlardan, gram-negatif diplobasiller izole etmişlerdir. Duyarlı hayvanların gözlerine *Bacillus* saf kültürlerini damlatarak yeniden enfeksiyon oluşturmuşlardır. Jones ve Little ürettikleri hastalığın belirtilerinin aniden başladığını, dikkat çekici bir fotofobi, görmede azalma, gözde koyu kıvamlı ve sarı renkli akıntı, göz kapaklarında şişme, kojuktivada kızarıklık ve bazen de korneada ülser ve korneal opasite şekillendiğini bildirmişlerdir. Jones ve Little, bu organizmaların kültürel ve biyokimyasal özelliklerini de tanımlamışlardır. At kanı içeren düz agarda üreyen ve hemoliz oluşturan organizma ayrıca eğik serum agarda ve çizilmiş serum agarda da üremiş ve 22°C' de 10 günlük inkübasyondan sonra jelatini sıvılaştırmıştır. Düz buyyonda hafif bulanıklık ve önemli miktarda tortu yaparak yavaş bir üreme gerçekleştirmiştir. Dekstrozlu buyyonda veya diğer karbonhidratlı ortamlarda fermentasyon oluşturmamıştır. 24-48 saatlik kültürlerde 1.5-2 mikron uzunluluğunda, 0,5 mikron genişliğinde kısa, küt ve yuvarlak uçlu basiller tespit edilmiştir. Eksudatta çoğunlukla daha uzun basiller oluşmuştur. Eksudat ve kültür ortamlarında basiller genellikle çiftler halinde kısa zincirler oluşturmuştur. Etken Gram negatif, hareketsiz, sporsuz ve çok iyi gelişmiş kapsüle sahip olarak identifiye edilmiştir. % 8 defibrine at kanı içeren düz agarda, 24 saat boyunca yüzeyde etrafları dar ve şeffaf hemoliz bölgeleri ile çevrili, gri renkte, yuvarlak, yarı saydam koloniler oluşturduğu bildirilmiştir (Lepper ve ark, 1992; Lepper ve ark, 1993; Jacinta ve ark, 2001; Luke ve ark, 2004).

2.2. Etiyoloji

Sığırlarda kataral, yüzeysel ve derin purulent, parenşimatöz, endotelial ve ülseröz tipte keratitler bildirilmiştir. Bu hayvanlarda mekanik, kimyasal ve travmatik kökenli olanlar ile coryza gangrenosa bovum (CGB), A avitaminoz, IBK, bulaşıcıagalaksiya, theleziya ve steria gibi paraziter enfestasyonlardan ileri gelen enfeksiyonlar önem arz etmektedir. Kornea apesinde Streptokok ve Stafilokok gibi gram pozitif koklar ve daha az oranda fungal etkenler izole edilmiştir. Buzağılarda gıda allerjisi, rinderpest, şap, malignant kataral fever, mavidil, skrapie, mavi göz hastalığı, kolera, yalancı kuduz, tromboembolik meningoensefalitis,

tuberküloz, listerioz, borna hastalığı ve neonatal septisemi gibi hastalıkların konjunktivitislere neden olduğu iddia edilmektedir (İşler ve ark, 2008).

IBK'nın etiolojisinde birçok mikroorganizma sorumlu tutulmuş ve değişik görüşler ileri sürülmüştür. Olguların pek çoğunda göz konjunktivasından *Neisseria* spp., *Moraxella* ssp, *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *Pseudomonas* spp. gibi etkenler de saptanmıştır. Ayrıca bir grup virus da izole edilmiştir. Bununla birlikte pek çok kaynakta kabul edilen primer etkenin *M. bovis* olduğu belirtilirken, 2002 yılında IBK'lı buzağuların gözlerinden *M. bovoculi* izole edilmiştir (Angelos, 2010).

Klamidia türlerinin izole edildiği bildirilen keratokonjunktivitlerin zoonoz bir hastalık olarak dikkate alınabilir olması dışında yaygın, şiddetli ve kronik olduklarında ancak dikkate değer bulunacağı bildirilmiştir (Otter ve ark, 2003).

Silaj kökenli *Listeria monocytogenes* etkisiyle de “silaj göz” olarak ta adlandırılan göz iltahaplanmaları da oluşabilmektedir. Silaj kökenli göz hastalığı IBK'dan farklı olarak, korneada yangıya neden olmamakta fakat iris etkilenmektedir. Henson ve Grumbles 1960 yılında Koch postulatları ile IBK'nın etiolojik ajanının *M. bovis* olduğunu göstermişlerdir. *M. bovis*, IBK ile ilişkisi Koch postulatları ile kanıtlanmış bir organizmadır (Angelos ve ark, 2007- 2012).

IBK'nın etiolojisinde hastalığın primer etkeni olarak kabul edilen *M. bovis*'in virulensinin, hemolitik, lökositik, piluslu suşlar ile ilgili olduğu ve bu tür etkenlere yalnızca hasta sığırların gözlerinde rastlanıldığı, pilussuz nonhemolitik suşların ise sağlıklı sığırların konjunktiva florasında buldukları bildirilmektedir. İnfeksiyöz keratokonjunktivitlerin patogenezinde *Moraxella ovis*, *Mycoplasma bovoculi*, İnfeksiyöz bovine rhinotracheitis virüsü ve adenovirüsün de rolü olduğu ileri sürülmüştür. Nebraska Veteriner Tanı Laboratuvarı sistemi verilerine göre, koyun keçi ve geyiklerde keratokonjunktivit vakalarından izole edilen *M. ovis* IBK'nın saptandığı sığırlarda artan sıklıkta izole edilmiştir ve hastalığın patogenezinde rol oynayabileceği kanısına varılmıştır (Cerny ve ark, 2006).

2.3. Genel özellikler

M. bovis gram negatif, küt, kalın, uçları yuvarlak, tek veya ikili çomakçıklar şeklindedir. Uç uca eklenerek kısa zincirler oluşturabilirler. Fimbriaları vardır. Aerob, sporsuz, hareketsiz ve aside dirençsizdir. Optimal üreme sıcaklıkları 32-37°C dir. Üreme gereksinimleri komplekstir ve zenginleştirilmiş kanlı veya serumlu besi yerlerinde ürerler. Çeşitli tipte

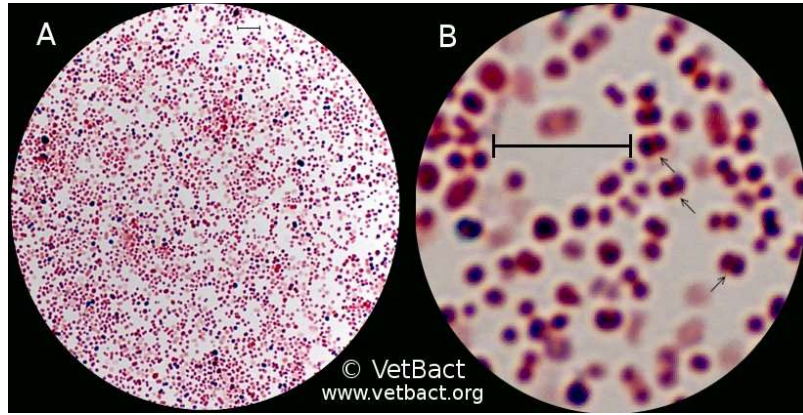
koloniler oluştururlar. Fimbriyalı suşlar kanlı agarda 1-3 mm çapında hemolitik koloniler oluştururlar. Bu koloniler agar yüzeyinden zor kaldırırlar. Fimbriyalı suşların otoaglutinasyon özellikleri vardır. Litik fajları saptanmıştır. *M. bovis* suşları oksidaz pozitif, glukoz, üreaz ve nitrat negatiftir. MacConkey agarda remezler. Katalaz testi suşlar arasında farklılık gösterir. Suşların çoğu jelatini ve kazeini hidrolize eder, ayrıca esteraz, lipaz, fosfoamidaz, fosfataz, fibrinolizin ve hiyaluronidaz gibi enzimler salgırlar. Penisiline çok duyarlıdırlar. *M. bovis*'in fimbriyası, hemolizini, sitotoksini ve hidrolitik enzimi önemli antijenleri arasındadır ve infekte hayvanlarda bunlara karşı oluşmuş antikorlar bulunur. Agar-jel immundiffuzyon tekniği ile 6 serogrup (A-F) ve bu serogruplar içinde toplam 12 serotip bildirilmiştir (De Castro ve ark, 2012).

Moraxella türleri *Moraxella* ve *Branhamella* adı verilen iki alt cinse sahiptir. Bu cinslerin sistematikteki yerleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu bakteriler; 0.8-1.2 ile 1.5-3 m boyda, uçları yuvarlak, ikişer ikişer veya kısa zincirler halinde kok veya kt basiller biçiminde bulunur. Sporsuz, hareketsiz, bazen ince bir kapsüllü olabilir. Gram negatif, zorunlu aerob, oksidaz pozitif, katalaz pozitifler. *Moraxella* türlerinin *M. nonliquefaciens*, *M. atlantae*, *M. phenylpyruvica*, *M. osloensis* suşları bulunmaktadır. *M. bovis*, Pseudomonadales takımı (Order IX) Moraxellaceae familyası *Moraxella* cinsine ait bir bakteridir. *Moraxella* cinsi *Moraxella* ve *Branhamella* adı verilen iki alt cinse sahiptir. *Moraxella bovis* bu alt cinslerden *Moraxella* alt cinsine aittir (Erdeğer ve ark, 1995-1996; Krieg ve ark, 2005).



Resim 1. İnfeksiyöz keratokonjunktivitisin klinik görünümü

Gram negatif küçük, hareketsiz 1.0-1.5 x 1.5-2.5 µm çapında kokoid çubuk formunda, bazen kok şekline yaklaşan 0.6-1.0 µm çapında tek başına veya çiftler halinde ve kısa zincirler şeklinde görünürler (Resim 2). Bazı genel özellikleri Tablo 1’de belirtilmiştir.



Resim 2. *M. bovis* mikroskopik morfolojisi

Tablo 1. *M. bovis* genel özellikleri

Gram boyanma özelliği	Yaşam ortamı	Karbonhidrat Fermentasyon özelliği	Katalaz/ Oksidaz	Diğer Enzimler	Konağı	Taşıyan Vektör	Yaptığı Hastalık
Gram negatif	Oksijenli	Fermente etmezler	Katalaz +/- Oksidaz +	DNaz - indol -	Sığır	<i>Musca autumnalis</i> (Resim 3)	İBK

Katalaz özelliği değişkenlik göstermekte olup bazı araştırmacılara göre pozitif bazı araştırmacılara göre negatif bulunmuştur. Bunun da muhtemelen coğrafik suş farklılıklarından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Çetin ve ark, 1997; Erdeğer ve Aydın, 1991).

M. bovis sığırların konjunktivalarında ve nazal sekresyonlarında bulunan fırsatçı bir patojendir. *M. bovis* antijenik özelliklerindeki farklılıklara göre çapraz reaksiyon göstermeyen 7 seroguruba (A-G) sahiptir. *M. bovis*'in Lipopolisakkarit (LPS) tiplerindeki değişkenlikleri, dış zar proteinlerinin (OMP) profilleri ve DNA parmakizi analizlerinin kombinasyonu ile yapılan değerlendirmede 15 farklı alt gurubu tanımlanmıştır (Postma ve ark, 2008).

16S rRNA analizi ile bakterilerin ve diğer yaşam formlarının filogenetik ilişkisinin, genetik şifrenin değişmeyen bir bölgesinin kıyaslanması ile saptanabilir olduğunu ortaya konmuştur. Bakterilerdeki bu genetik alan için uygunluğu incelenmekte olan kısımlar 5S, 16S

küçük alt ünite ve 23S rRNA'yı şifreleyen genlerden meydana gelmektedir. Bakterilerde taksonomik amaçlar için en çok kullanılan DNA parçası 16S rRNA genidir (Prieto ve ark, 2013). 16S rDNA geni sadece bakteriler arasında değil, aynı zamanda arkebakterilerin 16S rRNA geni ve ökaryotların 18S rRNA geni ile de karşılaştırılabilmektedir (Çetinkaya ve ark, 2012).

Moraxellacea üyelerinin 16 S rRNA diziliş yerlerine göre içlerinde *M. bovis*'inde bulunduğu alt türleri vardır. Bunlar *M. cuniculi*, *M. lacunata*, *M. equi*, *M. nonliquefaciens*, *M. (Branhamella) catarrhalis* ve *M. ovis*'tir (Postma ve ark, 2008).

2.4. Epidemiyoloji

Yüksek seviyede ultraviyole ışığa maruz kalmak gözde bu enfeksiyon için predispoze bir faktördür. *M. bovis* en fazla uçucu vektörler vasıtasıyla taşınır. Sinekler hem gözde tahriş yaparak, hem de enfeksiyonu taşıyarak hastalığın yayılmasında rol oynarlar. Sıcak havaların görüldüğü yaz ve sonbahar ayları da hastalığa yakalanmayı artırır. *M. bovis*'in sineklerle taşındığını ve sineklerin üzerinde 3 günden fazla yaşayabildikleri bildirilmiştir. Hayvanların bakımı ve taşınması esnasında birbirlerine vurmaları ve çarpmaları nedeniyle gözlerinde hasar meydana gelebilir. Rüzgârlı havalarda göze kaçan saman, saman tozu ve kum tanecikleri türünden yabancı cisimler, anızlar, otlama esnasında kurumuş bitkilerin ve çimlerin uzun olan sapları, dikenler, otlama alanlarındaki dikenli teller, korneada sıyrıklar oluşturup korneaya hasar verebilirler. Bunlar gibi ve daha başkaca fiziksel olarak göze zarar veren travmatik etkiler, patojenlerin göze penetre olmasını kolaylaştırır (Alexander, 2010; Whittier, 2009).



Resim 3. *Musca autumnalis* (yüz sineği)

A avitaminozu, sürekli etkiyen irkiltici gazlar ve bulaşıcı hastalıklar hayvanları konjunktivitise predispoze duruma getirmektedir (İşler ve ark, 2008). Yetersiz beslenme sonucunda görülen protein, enerji, bakır ve selenyum başta olmak üzere mineral madde ve A vitamini eksiklikleri birçok hastalıkta olduğu gibi IBK oluşumu ve gelişimi içinde etkileyici faktörler olabilmektedir (Whittier, 2009). Genç hayvanların hastalığa karşı özel bir duyarlılığa sahip olduğu bildirilmektedir (Samsar ve ark, 1993).

2.5. Tür Duyarlılığı

Taurus ırkı sığırlar (avrupa menşeli olanlar) Indicus ırkı sığırlara (zebu ve brahman gibi asya ve afrika kökenli sığırlar) göre ve genç hayvanlar da yetişkin hayvanlara göre hastalığa daha yatkındırlar. IBK'nın herhangi bir ırka özgü olabileceğine dair yayınlar çelişkilidir. Ancak Hereford'larla Jersey ve Aberdeen Angus'ların hastalığa yakalanma oranlarının yüksek olduğu bildirilmektedir. Brahman'ların ise dirençli oldukları belirtilmektedir. Hereford buzağılarında yapılan bir araştırmada göz kapakları ve çevresi pigmentsiz olanlarda enfeksiyonun daha çabuk bulaştığı izlenmiştir (Samsar ve ark, 1993).

Göz kapakları pigmentsiz olan Hereford ve Hereford melezleri, Şarole ve bazı Holstein'ların, güneş ışığına duyarlılıkları artar ve gözlerindeki bağışıklık yanıtında azalma meydana gelir. Bu nedenle hastalığa daha duyarlıdırlar (Whittier, 2009).

2.6. Bulaşma

M. bovis, hayvan bakıcılarıyla hayvanların birbirleriyle temaslarıyla enfekte hayvanların gözyaşları ve burun akıntılarıyla enfekte tozların gözle temaslarıyla ve en çok ta mekanik vektörlerle taşınırlar. Uzun süre UV ışınlarına maruz kalma, sinek yoğunluğundaki artış, sıcak havalarda ve hemolitik *M. bovis* türlerindeki artış bulaşmayı kolaylaştırıcı nedenlerdir (Postma ve ark, 2008). Doğrudan temasla, burun ve göz akıntılarıyla ve aerosol yolla da bulaşma gerçekleşir. Yüksek oranda bulaşıcı olan IBK, hızla yayılma karakteri gösterir. Bu yüzden enfekte ahırlarda yaklaşık 3 hafta içinde, hayvanların hastalığa yakalanma oranının % 80'e ulaştığı, % 20 oranında da progresif nitelikte körlükle sonuçlandığı bildirilmektedir. Yaz ve sonbahara özgü bir hastalık şeklinde seyrettiği bildirilen IBK'nın, kapalı ortamlarda sıkı temas halinde bulunan sığırlarda, kış aylarında da gözlenebileceği vurgulanmaktadır (Samsar ve ark, 1993).

2.7. İnsidens

IBK dünya çapında salgınlara neden olan tüm yaştaki sığırları etkileyen oldukça bulaşıcı bir hastalıktır. Yetişkin sığırlarda koruyucu antikorların gelişmiş olması nedeniyle daha genç hayvanların IBK'ya yakalanma olasılığı daha yüksektir. Hastalık erkek buzağılarda, dişi buzağılara göre daha yüksek oranda seyreder. IBR virüsü, mikoplazma, klamidya, ve *Branhemella ovis* gibi organizmaların varlığı hastalığın insidensini ve şiddetini artırır (Whittier, 2009). IBK yaz ve sonbahar aylarında daha sık görülür (Cerny ve ark, 2006).

Göz hastalıkları ay faktörü açısından analiz edildiğinde veriler arasında anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür ($P<0,01$). Hastalık insidansı % 18,18 oran ile en yüksek nisan ayında ve % 1,88 oran ile en düşük şubat ayında bulunmuştur. Göz hastalıklarına yakalanma riskinin nisan-mayıs aylarında en yüksek olduğu, temmuz-kasım döneminde ise risk oranı açısından bir stabilitenin olduğu bildirilmiştir. Kornea apsesinin IBK'li vakaların % 8,9'unda şekillendiği görülmüştür. Yaz aylarında özellikle de fazla kurak geçen yerlerde, mera döneminde kornea apsesinin insidansının yüksek olduğu saptanmıştır. Kornea apsesinin zamanında tedavi edilmemesi sonucunda apse içeriğinin anterior kameraya açılması ile şekillenen hipofiyon olgusuyla bu çalışmada karşılaşılmamıştır (İşler ve ark, 2008).

2.8. Patogenezis

Kornea epiteli, gözyaşı, fagositik hücreler ve yerel salgılanan antikorlar korneanın savunma mekanizmasını oluşturan sistemlerdir. Konjunktiva ve kornea epitelyumu hastalık etkenine karşı etkili bir savunma bariyeridir. Her 5 ile 7 günde bir kornea epiteli yenilenmektedir. Sürekli devam eden bu yenilenme döngüsü bakteriyel adhezyonu güçleştirmektedir. Göz yüzeyinin nonspesifik savunma mekanizmasının önemli bir bölümünü gözyaşının hem film tabakası özelliğinin hem de kimyasal bileşiminin birlikte oluşturduğu fiziksel yapı temsil eder. Gözyaşını birinci işlevi β -lizinin, komplement, transferrin, lactoferrin gibi antimikrobiyal maddeleri taşımasıdır. Bu antibakteriyel proteinler sığırlar için önemlidir çünkü sığır gözyaşı antibakteriyel lizozim maddesinden yoksundur. Bu komplement sistemi kanda mevcuttur. Bu sistemin harekete geçirilmesiyle "membrane attack complex (MAC)" oluşur ve bunun sonucunda hedef hücrenin ozmotik lizisine neden olan bir transmembran kanalı açılır. İnflamasyon bölgesinde toplanan nötrofil ve monositler patojeni tahrip etmeye başlayarak spesifik olmayan immun yanıt gelişmeye başlamasında görev alırlar. Makrofajlar

da immun yanıt sonucunda oluşan hücresel artıkların temizlenmesinde kritik rol üstlenirler. Korneanın vasküler olmayan yapısı ve lenfatik drenajdan yoksun olması nedeniyle korneaya antikor ve/veya sitotoksik lenfositlerin girişi sınırlı olur. Gözde lenfoid aktivitenin primer merkezi uvea ve konjunktivadır. Konjunktivada bulunan ve “conjunctival-associated lymphoid tissue” (CALT) olarak adlandırılan özel bir bölgede spesifik olarak antijeni fagosite eden makrofajlar bulunur. Antijen uyarılmasına cevaben, yerel olarak antikor üretimi meydana gelir. Okular yüzeyde ve gözyaşındaki önemli antikor IgA'dır. Bununla birlikte sığır gözyaşında İndirek Floresan Antikor ve ELISA testleri ile IgM ve IgG (IgG1 ve IgG2) antikorlarının varlıkları saptanmıştır. Enfeksiyonun oluşması için ilk adım *M. bovis*'in korneal epitelyuma yapışmasıdır. Durmadan salgılanan gözyaşı ve göz kapaklarının sürekli açılıp kapanması adhezyonu engeller. Çeşitli çalışmalarda *in vivo* ve *in vitro* olarak virüent *M. bovis* türlerinin sığır kornea epitelyumuna ilk baştaki bağlanma aracı elektron mikroskobunda gösterilmiştir. Elektron mikroskobunda sığır kornea epitelinde koyu ve açık hücrelerin olduğu görülmüştür. Açık renli hücreler microplicae'da daha küçük ve yoğun olmaktadır. Koyu bölgelerdeki hücreler gelişimlerinin son aşamasında olan ve nispeten micropilikadan yoksun epitel hücrelerini içermektedir. Koyu hücrelerde görülen çöküntüler çok sayıda bakterinin bulunduğu yerlerdir (Postma ve ark, 2008).

M. bovis'in patogeneğinde korneal epitelyumda hasara ve ülserasyona yol açan hemolitik veya sitolitik etkili sitotoksin ve korneanın yüzeyine yapışmayı sağlayan pilinler rol oynamaktadır (Angelos ve ark, 2014). Clinkenbeard ve Thiessen 1991'de *M. bovis*'in salgıladığı sitotoksini bildirmiş, Beard ve Moore ise 1994'de bu sitotoksinin kornea epitel hücrelerini eritmesi nedeniyle İBK'nın patogeneğinde rolü olduğunu ifade etmişlerdir (Angelos ve ark, 2010). Hastalığın gelişebilmesi için gözün tahriş olması şarttır. Bakteriler 4 gün boyunca sineklerin üzerinde yaşayabildiklerinden çok sayıda hayvana taşınabilirler ve enfeksiyon meydana getirirler (Whittier, 2009).

Türkiye'de ve ABD'de İBK'lı sığırlardan izole edilen *M. bovis* suşlarının protein profilleri birbirlerine yakındır ve bu suşlar antijenik olarak benzerlikler göstermektedir. İzolatların fiziksel karakterleri ile ortak antijenleri arasındaki immunolojik olarak homojenite derecesi aşı hazırlamada kullanılan suşların seçiminde önemli bir özelliktir (Erdeğer ve ark, 1996). Hastalığın gelişim evreleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Pink Eye hastalığı gelişim evreleri

Evre I: Sığırdan ışığa karşı duyarlılık vardır. Göz kapakları sık sık açılır kapanır ve göz kapakları boyunca kızarıklık vardır. Sığırın otlama süresi azalır ve gölge yer arar. Ağrı nedeniyle yem tüketimini azaltır. Kornea merkezinde küçük bir ülser başlar ve korneada küçük beyaz bir nokta görünür. Kornea inflamasyona bağlı bir hafif bulanık gri bir görünüme sahiptir. Bir veya iki göz de etkilenebilir.



Evre II: Klinik belirtiler devam eder. Ülser kornea üzerinde yayılır. Daha fazla inflamasyon meydana geldiği gibi, kornea giderek bulanıklaşır. Bu noktada, iris koyu renkli bir kısım olarak görülebilmektedir. Kan damarları iyileşmeyi sağlamak için korneanın dış kısmından başlayarak kornea genelinde büyümeye başlar. Bu kan damarları korneaya hastalığın adını aldığı pembe rengi verir.



Evre III: Ülser korneanın çoğunu kapsar ve iltihap gözün iç bölümüne yayılmaya devam ediyor. Bu aşamada göz içi, göze sarı bir görünüm veren irin benzeri bir madde olan, fibrin ile doldurur.



Evre IV: Ülser korneadan irise uzanır ve iris ülserden çıkıntı yapabilir. İyileşme olsa bile iris korneada sıkışık olarak kalır. Glokom ya da gözün sürekli şişmesine neden olabilir. Bu göz kısmen veya tamamen kör olur. Göz tamamen kopup büzülmüş görünüm alabilir veya glokom (yüksek göz tansiyonu) varsa büyük bir görünüm alabilir. Bu gözde kalıcı körlük oluşur



İnaktif skar: Evre IV haricinde göz bulutlu mavi renk olmaya devam edebilir. Mavi görünüm daha sonra geçebilir ve göz daha net görünebilir. Diğer durumlarda, hastalığın şiddetine bağlı olarak, hastalık tam iyileşse bile kalıcı beyaz bir skar mevcuttur.



IBK etkeni *M. bovis*'in, patogenezinde ana virulans faktörlerinden biri olan ve aşı denemelerinde immünejik özelliklere sahip olduğu bilinen (Angelos ve ark, 2007) RTX proteininin (tekrarlayan toksin yapıları) bir elemanı olan sitotoksin A'yı kodlayan gen gibi (*MbxA*), *M. ovis* (*Mova*) ve *M. bovoculi* (*Mbva*) de kodlayan gen bulunduğundan dolayı bu bakterilerin koyun ve sığırlarda IBK ile ilişkileri olmaktadır (Farias, 2015).

RTX proteini; *M. bovis*'in patojenik izolatlarının “*mbxA*” genleri tarafından kodlanan kalsiyum bağımlı transmembran por oluşturan bir sitotoksini ifade eder. Hemolitik *M. bovis*'lerin sahip olduğu tipik RTX operonu (gen bölgesi) *mbxCABD* şeklinde sıralanan dört geni kapsar. Ayrıca dış zar proteinini kodlayan bakteriyel *tolC* genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. *M. bovis*'in hemolitik olmayan türleri klasik RTX operonu barındırmamaktadır (Angelos ve ark, 2003).

M. bovis'in otoaglutinasyon ve hemaglutinasyon aktivitesi ile patojenitesi arasında ilişki araştırılmış ve otoaglutinasyon ve hemaglutinasyon özelliğine sahip *M. bovis* suşlarının patojen olduğu ifade edilmiştir. *M. bovis*'in hemaglutinasyon, otoaglutinasyon özelliği ve $MgCl_2$ 'ün etkisiyle otoaglutinasyon ve hemaglutinasyonun oluşmaması, patojen *M. bovis*'lerin en önemli identifikasyon kriterlerinden biridir. Pilusa sahip *M. bovis* suşları tuzlu suda süspanse edildiğinde otoaglutinasyon göstermektedir. Bakterilerin bu özelliği % 10'luk $MgCl_2$ solüsyonunda giderilmektedir. Otoaglutinasyon gösteren *M. bovis* suşları tavuk eritrositlerini aglutine etmekte, $MgCl_2$ süspanسیونları ile HA özelliği de inhibe olmakta ve dolayısıyla pilus varlığı ortadan kaldırılmaktadır. IBK'nın klinik bulguları deney hayvanlarına piluslu suşlar verildiğinde şekillenmektedir, ancak $MgCl_2$ ile muamele edilmiş ve pilusuz suşların inokule edildiği hayvanlarda hastalık belirlenmemiştir. Bu denemelerle, *M. bovis*'in virulensi ve hemaglutinasyon arasında var olan ilişki ortaya konulabilmiştir (Erdeğer ve ark, 1995).

M. bovis'in hemolizin üreten virulent suşları, virulan olmayan suşlarından farklı plasmid profilleri sergilemektedir. Konak, çevre, vektör, mevsim gibi faktörlerin aralarında etkileşmeleri ile birleşen infeksiyon etkisi IBK prevalansını etkiler. *Mycoplasma* spp. veya infeksiyöz bovine rinotrakeitis (IBR) hastalık sürecini artırıcı ya da hızlandırıcı etki yapar. IBK belirtileri hafif konjunktivitten körlüğe neden olan korneada şiddetli ülserasyon ve perforasyona kadar değişebilir (Brown ve ark, 1998).

2.9. Virulans Faktörleri

Fırsatçı bir bakteri olan *M. bovis*'in virülansı konağa ve çevresel faktörlere göre değişir. Bilinen iki bakteriyel virulans faktörüne sahiptir. Bunlar bakteriyel hareketliliği sağlayan tip 4 pili ve sürekli salgılanarak hemolitik etkisi nedeniyle gözde hasara neden olan protein tabiatındaki RTX toksinidir. Bunların dışında potansiyel hastalık oluşturma faktörleri olarak siderofor (bakteri tarafından ortama salınan ve yüksek affinite ile demire bağlanan bileşiklerdir ve bakteri membran proteinlerini düzenledikleri kabul edilir), fosfolipaz, lipaz ve proteaz enzimleri gösterilebilir. Tip 4 pili ve sitotoksin dışında potansiyel virulans faktörleri fosfolipazlar, demir bağlama sistemleri, hidrolitik ve proteolitik enzimleridir. *M. bovis*'in farklı türleri hem de farklı izolatlardaki benzer türler virulans değişimini mümkün kılmaktadır (Luke ve ark, 2004; Postma ve ark, 2008).

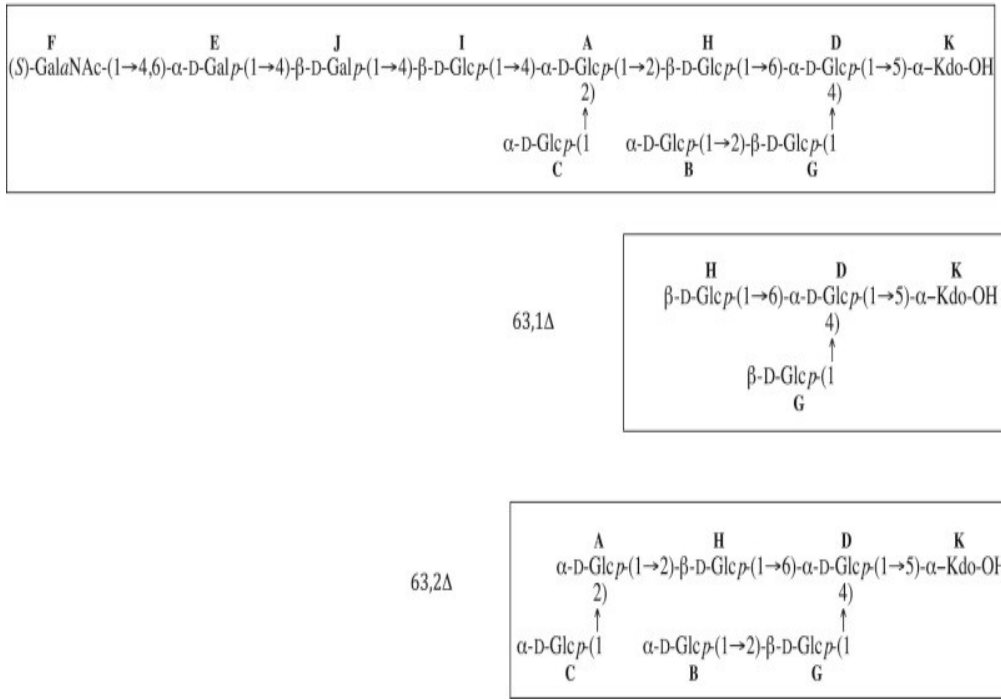
2.9.1. Pili

M. bovis'in patojenitesini başlıca iki virülans faktörü belirler. Tip 4 pili (TFP) (Resim 4), yüzeye adaptasyon sağlayan ipliksi uzantılardır ve korneaya zarar veren sitotoksin (hemolizin ve sitolizin) salgılar. TFP *Neisseria* spp., *Pseudomonas* spp., ve *Moraxella catarrhalis* gibi gram negatif bakterilerde epitel hücrelerin yüzeylerine bağlanmalarını sağlar (Prieto ve ark, 2013).

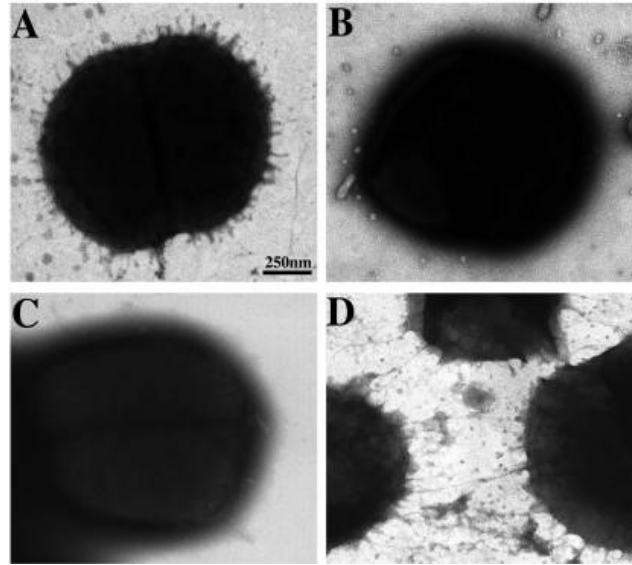
Deneyssel inokulasyonlarla *M. bovis*'in sadece pilili türlerinin IBK'lı klinik tablo ve göz enfeksiyonuna neden olukları kanıtlanmıştır. Q ve I pili olarak adlandırılan fonksiyonel olarak iki farklı pili tipi tanımlanmıştır. Q pili bakterinin korneaya tutunmasını, I pili ise bakterinin kalıcılığını ve korunmasını sağlayarak enfeksiyonun yerleşmesine imkân sağlamaktadır. Pili sadece tür farklılığını belirlemez, aynı zamanda türler arası antijenik farklılığı belirler. Tek bir tür her iki pili tipini üretme kapasitesine sahiptir. Pili tipleri arasındaki değişkenliğin 2.1 kilobaz'lık pili (2100 baz çiftinden oluşan bölge) sentezleyen kromozomal DNA bölgesindeki bir değişiklik sonucunda olduğu bulunmuştur. Bir başka ifadeyle *M. bovis*'in pili kodlayan gen bölgesinde revers hale gelebilir, böylelikle DNA segmentinde pilinin I veya Q tipinde olması sağlanır (Postma ve ark, 2008).

Rough fenotipteki *M. bovis* EPP63 suşunun, 10 şeker içeren dallı oligosakkarit yapısının, yakın zamanda aydınlatıldığı bildirilmiştir. EPP63' ün oligosakkarit yapısı, haptoz'dan yoksun, sıra dışı bir yapı sergilemektedir (De Castro ve ark, 2014).

M. bovis Epp63 OS



Şekil 1. *M. bovis* biyokimyasal yapısı



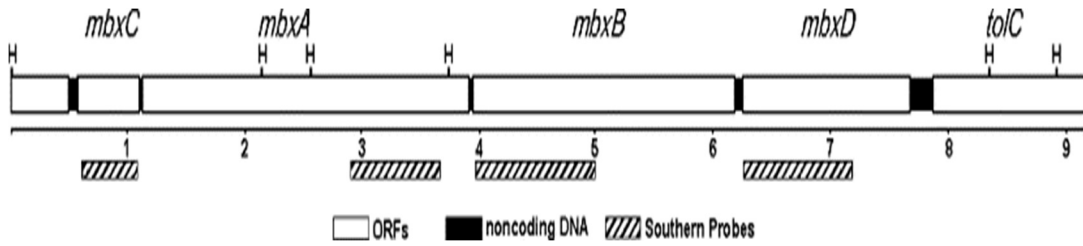
Resim 4. *M. bovis* tip 4 pili mikroskobik görünümü

2.9.2. Sitotoksin

M. bovis'in, kanlı agarda hemoliz yapan türlerinin enfeksiyon yapma kabiliyeti vardır. Hemolitik olmayan türleri, sığırlarda patojen değildir. Hemolitik *M. bovis* suşları, gözenek

oluşturan bir sitotoksin üretir. Bu sitotoksin kornea epitelinde erozyona ve korneal ülser neden olur. Nötrofil enzimleri ile kollojen fibrin yığınlarının oluşması iyileşmeyi geciktirir (Postma ve ark, 2008).

Angelos ve arkadaşları 2001 yılında *M. bovis*'in ürettiği hemolitik ve sitolitik etkili olarak nitelendirdikleri RTX toksin yapısının (Şekil 2) *MbxA* olarak isimlendirdikleri gen bölgesi tarafından kodlandıklarını belirlemişlerdir. *M. bovis*'in hemolitik olan 2 suşunda 700 bp uzunluğunda birbirine komşu *MbxA* bölgesinin *tolC* geni de içerdiği ve kusurlu tekrarlayan *mbxCABDtolC* şeklinde dizilimin olduğu gösterilmiştir (Angelos ve ark, 2007a).



Şekil 2. *M. bovis* 9208 baz uzunluğunda RTX operon haritası

2.9.3. Plazmid

Plazmidler patojen bakterilerin hayatta kalmalarını veya virülensini artıran çeşitli faktörleri belirleyebilirler. Antibiyotik direnci, adezyonlar, hemolizinler ve ekzotoksinleri içeren faktörlere aracılık yaparlar. *M. bovis* türlerinin çoğunluğunun sıralı halde olan ve büyüklüğü 4 ila 45 kb arasında değişen çok sayıda plazmid içerdiği bilinmektedir. Plazmid sayıları ile virülent arasında bir ilişki bulunmamaktadır. 2012 yılına kadar *M. bovis*'den sadece 1 plazmid (pMBO-1) tanımlandığı bilinmektedir. 2006 yılında Kakuda ve ark. *M. bovis* Epp63 suşunda 44.2-kb uzunluğa sahip *Bordetella pertussis*'in (Boğmaca etkeni) lifli hemaglutinin'e (yüzeye yapışmayı sağlayan protein) benzer flpA ve flpB proteinlerini (FNR-fumorat nitrat redüktaz benzeri proteinler) kodlayan plazmid (pMBO-1) ihtiva ettiğini göstermişlerdir. Bu suş aynı zamanda 27-kb büyüklüğünde plazmidlerin konjugasyonel aktarımında görevli birkaç protein kodlayan bir plazmidi de (pMBO-2) bulundurur. Konjugatif ve/veya hareketli plazmidler dizisini tam olarak belirlenmesi, hücreden hücreye taşınma kabiliyetlerine sahip olabilmelerinin keşfi; bu grup bakterilerde belirgin bir adaptasyon potansiyeli için diğer önemli bir faktör olabilmektedir. Bu büyük plazmidlerin bazı benzer yapıları ortak bölgelerinin olması aralarındaki rekombinasyonel değişikliklerin mümkün olabileceğini gösterdi. Ancak, *Moraxella* türleri arasında dönüşüme karşı güçlü bir

genetik bariyer bulunmaktadır. *M. bovis*'in ATCC 10900 suşunun farklı boyutlarda iki plasmid bulundurduğunun keşfedildiği, büyük plazmidin yaklaşık 20 kb olduğu, pMbo20 olarak adlandırıldığı ve henüz tanımlanmadığı küçük olan plazmidin 4658 bp büyüklüğünde olduğu 2012 yılında ortaya konulmuştur (Furmanek ve ark, 2013).

2.10. Seğirme Hareketi

Moraxella bovis'in de aralarında olduğu Polar pili ve/veya tip IV pili (TFP) kodlayan genlere sahip *Aeromonas hydrophila*, *Azoarcus* sp., *Bacteroides ureolyticus*, *Branhamella catarrhalis*, *Comomonas testosteroni*, *Dichelobacter nodosus*, *Eikenella corrodens*, *Kingella denitrificans*, *K. kingae*, *Legionella pneumophila*, *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, *M. kingii*, *N. meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas stutzeri*, *P. putida*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Shewanella putrefaciens*, *Suttonella indologenes*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Vibrio cholerae*, ve *Wolinella* sp. gibi gram negatif bakterilerde seğirme hareketinin şekli belirgindir. Seğirme hareketi flagelladan bağımsız nemli yüzeyler üzerinde gerçekleşen bakteriyel lokasyon hareketi olarak tanımlanır. Bu hareket, bakterinin Tip 4 pili (TFP)'yi gererek uzatması, yüzeye bağlanması ve içeri çekilmesi şeklinde sanki kanca ile tutunuyormuş gibi gerçekleşir. Güçlü bir genetik ve genomik analiz geçmişi olan ve kolaylıkla kültüre edilebilen *P. aeruginosa*, seğirme hareketinin genetik ve fonksiyonel analizine temel model olmuştur. *P. aeruginosa* tip 4 pili oluşumu ve fonksiyonu yaklaşık 40 kadar gen tarafından kontrol edildiği ve motilite seğirmesinin karmaşık bir kimyasal duyu sistemi ve bir dizi sinyal transdüksiyon sistemleri tarafından kontrol edildiği belirtilmiştir (Mattick, 2002).

Genelde prokaryot hücrelerde pili hareketten sorumlu değil iken *P. aeruginosa*'da pili seğirme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Kirpik gibi pilus da kolonizasyonun adhezyon fazında epitel hücre membranlarının asialo-GM1 bölgesine bağlanarak patogeneizde kritik önem taşır (Karatuna ve ark, 2008).

2.11. Klinik Görünüm

Hasta hayvanlarda ilk klinik belirtiler gözde ileri ölçüde lakrimasyon, fotofobi, görüş bozukluğu ile ortaya çıkar. Su kıvamındaki gözyaşı akıntısı, kısa zamanda purulent bir

görünüm kazanır. Konjunktivitisin ilk belirtileri blefarospazm ön segment initasyonu ve lokal ağrıdır. Korneadaki değişiklikler, hastalığın başlamasıyla beraber ilk 3 gün içinde kendisini belli eder. Korneanın merkezi yaklaşık 3 mm. çapında bulutlu görünümündedir. Konjunktival alanlar hiperemik ve ödemlidir. Limbus'a (kornea ve skleranın birleşme yeri) ait damarların kornea üzerinde aşırı derecede yayılmasını takiben ilk 7. günde korneal ülserler gelişir. Korneal ülserler epitel ve bazal katmanlardan derin stromal dokuya kadar ilerleyecek şekilde hızla büyür. Korneanın perfore olması sonucu desmatosel ve panoftalmi görülebilir. Pratikte ölüm olayları görülmemiştir; fakat ileri derecede körlükle sonuçlanan olgulara sıklıkla rastlanılmaktadır. IBK'da pratikte ölüm olayları görülmemekte, ancak kalıcı körlük ve süt verimi kayıpları nedeniyle ekonomik yönden önemli bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Samsar ve ark, 1993).

2.12. Tedavi ve Kontrol

IBK tedavisi hayvanlarda ekonomik değerlendirmeler dikkate alınarak uygulanır. Gözyaşında yeterli ilaç yoğunluğuna veya minimum inhibitör konsantrasyon sınırına ulaşma amacıyla antibiyotik tedavisi uygulanır. IBK kolay önlenemez bir hastalık değildir. IBK ile etkilenmiş hayvanlar sürüden ayrılmalıdır. Hızlı şekilde vektör kontrolüne başlanmalıdır. Hastalık taşıyan hayvanlar belirlenip sürüden uzaklaştırılmalıdır. Pili antijeninin çapraz reaksiyonu, suşların değişkenliği ve kontrol edilemeyen çevresel faktörlerden dolayı daha önceki aşılama çalışmalarında başarılı olunamamıştır. Son araştırmalarda *M. bovis*'in üreme amacıyla sideroforları ve demir bağlayıcı dış zar proteinleri ile konağa ait demir kaynaklarını kullanabildiği belirlenmiştir. Sığır gözünün normal savunma mekanizmalarının aydınlatılması, *M. bovis*'e karşı bağışıklık tepkisini artırmak için yeni stratejiler geliştirmeye imkan tanıyabilecektir (Brown ve ark, 1998).

Erken tedavi ile gözde kalıcı hasar oluşumu an az düzeye iner. Geç tedavi edilen olgularda, skar (yara izi), glaucoma, şişkin balon göz hatta gözün tamamıyla kaybına varan komplikasyonlar meydana gelmektedir. Göz küresini kaplayan tabakanın altına yapılacak olan enjeksiyonların iyileşmeye yardımcı olabileceği bildirilmiştir. Ancak enjeksiyonun doğru bir şekilde yapılması gerekir, aksi takdirde gözde hasar oluşabilir. Gözkapağı içine veya altına enjeksiyon yapmanın iyileşmeye katkısı yoktur. Antibiyotikli merhem pomat ve damlalar gözde uzun süre kalmadıklarından dolayı tedavi edici etkileri oldukça sınırlıdır. Tuz gibi tahriş edici maddeler kesinlikle tedavide kullanılmamalıdır. Tedavi boyunca gözün gazlı bez

ile kapatılması tavsiye edilir. Bu sayede göz sineklerden ve güneş ışığından korunur. Sinek kontrolünün yapılamadığı durumlarda tedavide sinekleri hayvanların yüzünden uzaklaştırmak için ilave uygulamalar yapılması tavsiye edilmektedir (Whittier, 2007).

2.13. Tedavi Stratejileri

Uzun etkili tetrasiklinler enfeksiyonun bir ve ikinci evresinde etkilidir. Önerilen dozun 48 ile 72 saat sonra ikinci bir enjeksiyon tedavisi de başarı yüzdesini artırabilir. Başka bir seçenek de konjunktiva içine penisilin ve deksametazon enjekte edilmesidir. Bulber konjunktiva gözün sklera tabakasını kaplayan ince bir zarıdır. Enjeksiyon doğru yapılırsa, konjunktiva şişer ve bir tümsek bu alanda görülür. Yanlış yere yapılan enjeksiyonlar pink eye tedavisinde etkisiz kalacağı gibi göze de zarar verebilir. İlerlemiş olgularda tetrasiklin ve bulber konjunktiva enjeksiyonları ile üçüncü göz kapağının gözünün üzerine dikilmesi ve göz kapaklarına örtü birlikte uygulanır. Bu daha fazla tahrişi azaltır ve korneaya destek olarak korneda yırtılma azalmasına ve bakteri dökülmesine sebep olarak gözde rahatlamayı sağlar. Günde üç dört kez kullanılması gerektiğinden spreyle ve merhemler yalnız başlarına etkili değildir (Whittier, 2007).



Resim 5. Bulber konjunktiva enjeksiyonları

Göz enfeksiyonlarında gözün yüzeyinde biyofilm oluşturan çeşitli bakteri türlerinin paylarının olduğuna dair artan kanıtlar mevcut olması nedeniyle IBK'nın biyofilm temelli bir hastalık olarak kabul edilmemesine ve hatta *M. bovis*'in biyofilm yaşam tarzına adaptasyon kabiliyeti hakkında geçerli bilgi bulunmamasına rağmen *M. bovis*'in klinik izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin araştırılması, biyofilm oluşumunun farklı cansız yüzeylerde ve kültür koşullarında kıyaslanması ve biyofilm oluşumlarının ve büyümelerinin

kalitatif ve kantitatif yönden bilgi edinilmesi ve hem de *in vitro* olarak tip 4 pilinin biyofilm oluşumunda kritik bir rolünün olup olmadığının gösterilmesi amacıyla yapılan bir araştırma 2013 yılında yayımlanmıştır. Araştırmada MgCl₂'e maruz bırakılan Tip 4 pililer'in belirgin şekilde hücre yüzeyinden ayrıştıkları görülmüştür. Böylece *M. bovis*'in biyofilm oluşturması engellenmiştir. Aynı zamanda önceden oluşan biyofilm tabakasının da parçalanması sağlanmıştır. *M. bovis*'in sığırgözü ve/veya burun boşluğunda kolonizasyon sürecinin anlaşılmasında yeni bir yaklaşım teşkil edebilecek olan bu sonuçlar gelecekte IBK'nın kontrolü için yeni antimikrobiyal tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilecek niteliktedir (Prieto ve ark, 2013).

Samsar ve arkadaşları tarafından 1993 yılında alfakimotripsin ve kloramfenikol kombinasyonunun sığır keratokonjunktivitislerinde de etkin olabileceği kanıtlanmıştır. Kloramfenikolün humor aqueous-kan bariyerini kolayca aşma özelliğinin etkisiyle de tedavi edilen hayvanlarda panoftalmitis ya da endoftalmitis olgusuyla karşılaşılmasıdır. Çalışmada alfakimotripsin enzimi proteolitik ve iyileşmeyi uyarıcı etkisi, kloramfenikol ise humor aqueous-kan bariyerini kolayca aşma özelliği nedeniyle seçilmişlerdir. Fakat günümüzde sığırlarda kloramfenikol kullanımı terk edilmiş bir uygulamadır.

Oftalmik preparatların topikal uygulamalarının etkili olması için, günde en az üç kez uygulanması gerektiğinden, sürülerde ekonomik ve pratik değildir. Topikal oftalmik kullanım için etkili merhemler; gentamisin, oksitetrasiklin ve polimiksin B kombinasyonunu içerir. Ağrılı keratokonjunktivit ile ileri dercede üveit bulunan hayvanlarda, günde 1-3 kez, % 1'lik atropin merhemini, topikal oftalmik uygulamasından yararlanılabilir. Bu, göz yaşı akıntısını, siliyer kaslardaki spazmlarını önleyecek ve miyoz ile ortaya çıkan posterior sineşi oluşumunu (lens ve irisin birbirine yapışması) azaltacaktır. Atropinin neden olduğu midriasis nedeniyle, tedavi edilen hayvanların gözüne maske takılmalıdır. İkincil üveitten kurtulmak için, sistemik olarak, nonsteroid antiinflamatuvar ilaç tedavisi uygulanabilir (Angelos, 2014).

2.14. Antibiyotik Duyarlılığı

M. bovis birçok antibiyotiğe karşı duyarlıdır. Antibiyotik duyarlılığı farklı coğrafik bölgelerde değişkenlik gösterebileceğinden, bakteri kültürü ve duyarlılık testleri yerinde olur. ABD'de, uzun etkili oksitetrasiklin (48 ila 72 saat aralıklarla, IM veya SC yolla, 20 mg/kg dozda) ve tulatromisin (günde bir kez, SC yolla 2.5 mg/kg dozda) sığırlarda IBK tedavisi için onaylanmış antibiyotiklerdendir. Diğer etkin antibiyotikler, seftiofur, kristalin serbest asidi

(kulak tabanında 6.6 mg / kg dozda, SC yolla) ve florfenikol'dür (20 mg/kg, IM, 2 günlük aralıkta iki doz). Yonca peletleri ile birlikte oral olarak verilen oksitetrasiklin (10 gün boyunca 2 g / gün / günde) ile birlikte enjekte edilen tek doz uzun etkili oksitetrasiklinin (20 mg / kg, IM), IBK salgınının şiddetinin azaltılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Angelos, 2014).

M. bovis'in antibiyotiklere duyarlılığı konusunda birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda, *M. bovis*'in ampisilin, basitrasin, kloramfenikol, gentamisin, kanamisin, nitrofurazon, oksitetrasiklin, penisilin G polimiksin B, sefalosporin, trimetophrim ve sulfonamid'e duyarlı oldukları, streptomisin, linkomisin, eritromisin, kloksasilin ve tilosin'in bakteriye etkilerinin oldukça düşük oldukları bildirilmiştir (Samsar ve ark 1993). Geç kalınmış ve göz hasarı iyice ilerlemiş olgularda göz ekstirpasyonu tek seçenektir. (Alexander, 2010)

2.15. Aşılama

Dünya genelinde önemli dercede ekonomik etkiye sahip olan IBK nedeni olan *Moraxella* genusu üyelerine karşı tedavi edici ve koruyucu tedbirler sınırlı başarıya sahiptir. Aşılar çoğu kimyasalların bakterinleri inaktive etmelerinden ötürü sınırlı bir koruma sağlayabilmektedir (Sosa ve ark, 2013).

Pilus bazlı aşılar IBK görülme sıklığını ve hastalığın şiddetini azaltmaktadırlar. Ancak çok sayıda pilus serogurubunun olması pili geni inversiyon potansiyeli ile birleşince antijenik değişkenliğin artacağı ve hayvanların pili ile aşılınmaları, *M. bovis*'ten korunmak için konakta bir immun yanıtı imkân verecek antijenik uyarılmayla sonuçlanabilecektir. Pilus antijenlerinin aksine *M. bovis* sitotoksini (MbxA) tüm izolatlar arasında daha yüksek koruma sağlamaktadır. İBK'lı sığıllarda gelişen sistemik immun yanıt ile *M. bovis*'in farklı türlerinden hemolizinleri nötralize eden antikorların oluştuğu, bir *M. bovis* türünde de antisitotoksin ve anti hemolizin antikorları oluştuğu gösterilmiştir. Kısmi saflaştırılmış doğal *M. bovis* sitotoksin aşısı ile aşılınmış buzağılarda İBK'e karşı koruma oluştuğu gözlenmiştir. Derialtı yolla uygulanan subünit rekombinant *M. bovis* sitotoksin aşısının doğal İBK oluşumuna etkisinin değerlendirildiği çalışmalarda immunizasyonun meydana gelmediği bildirilmiştir. Sonraki çalışmalarda *M. bovis* pilin fragmentleri içeren antijen ilave edilerek daha geliştirilmiş rekombinant *M. bovis* sitotoksin aşısı ve *M. bovoculi* sitotoksin aşıları kullanılmıştır. İBK'e karşı yapılan aşı çalışmalarında genellikle parenteral yollar

kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda mukozal aşılama denemiş ve bu amaçla *M. bovis* bakterin aşısı aerosol yolla, native *M. bovis* pilus antijen aşısı intranasal yolla, bir *M. bovis* bakterin aşısı da intraoküler yolla verilmiştir. Poliakrilic asit ile adjuvantlanmış rekombinant *M. bovis* sitotoksin aşılılarıyla intranasal yol ile aşılaman sığırların gözlerindeki antijen-spesifik IgA konsantrasyonundaki değışiklikler, sığırlarda İBK'e karşı immünoprofilaksi için parenteral aşılama alternatif olabileceğini düşündürmektedir (Angelos ve ark, 2007b-2014).

1992 yılında yayınlanan bir çalışmada yağlı aliminyum hidrojeni ile adjuvantlanmış, Avustralya'daki pilus serotiplerine göre sınıflandırılmış guruplardan serogrup A içerisinde yer alan *M. bovis* 4L ve S276R suşlarından ve serogrup F içerisinde yer alan Maff1 suşundan hazırlanan monovalan aşılaların 10'ar buzağıdan oluşan 3 aşı gurubu ve bir aşısız kontrol gurubu üzerinde denendiği ve aşılaman guruplarda; 4L suşunda formalinle öldürülerek hazırlanan pilili hücrelerin kullanıldığı aglutinasyon testi ile her 3 suşa karşı spesifik antikor geliştiğinin görüldüğü; ayrıca ELISA testiyle de ölçümler yapılarak antikor titrelerinin belirlendiği ve çapraz reaksiyona dair bazı kanıtlar bulunduğ, çalışmanın devamında; ikinci aşılama 14 gün sonra 40 buzağıya virulent *M. bovis* S276R suşu ile okuler yolla nakledildiğinde aşılamanların hepsinde İBK oluştuğ, 4L suşu ile aşılamanlarda % 60, S276R suşu ile aşılamanlarda % 80, Maff1 ile aşılamanlarda sadece % 30 koruma geliştiği bildirilmiştir. Mevcut bulgular daha önceki kanıtlarla birlikte değerlendirildiğinde İBK'ya sebep olan *M. bovis*'in en sık karşılaşılan Avusturalya'da 7 serogrubundan ve Birleşik Krallık'taki sık karşılaşılan türlerinden yapılacak olan pili içeren polivalan subünit aşılaman hayvanların çoğunluğunu İBK'e karşı koruyabileceğini düşündürmüştür (Lepper ve ark, 1992).

1993 yılında yayınlanan bir çalışmada, Dal2d ye benzer pili üreten spesifik serogruplar ve Plazmid kaynaklı Dalton 2d (Dal2d) pilin geni içeren *P. aeruginosa* K/2Pfs'nin bir türevinden elde edilen Dal2d ve pilus serotipine göre tanımlanmış ve *M. bovis*'in 25 Avusturalya suşundan birisi olan Dal2d suşundan pili antijeni hazırlanmıştır. Yağlı adjuvan kullanılarak hazırlanmış otojenik *M. bovis* Dal2d pili aşısı ile 9 buzağı her biri 2 kez olmak üzere 30 mikrogram dozda aşılammıştır. 10 buzağı da aynı dozda *P. aeruginosa* ile türetilen Dal2d pili ile aşılammıştır. Tamamı 19 buzağılı aşılu grup ve 10 da aşılammamış buzağılardan oluşan kontrol grubunun bulunduğu çalışmada deneysel olarak İBK oluşturmak için buzağıların konjunktival keseleri hücrelerine virulent *M. bovis* suşu verildi. Otentik *M. bovis* Dal2d ile aşılamanlarda İBK gelişmezken *P. aeruginosa*'dan derive edilen Dal2d pili ile aşılaman iki hayvanda lezyon gelişmiştir. Aşısız gurupta ise 9 buzağıda İBK meydana

gelmiştir. Bu sonuçlar İBK'e karşı etkili bir aşı geliştirmek için rekombinant DNA teknolojisi ile pili üretiminin nispeten düşük bir doz potansiyeli olduğunu göstermektedir (Lepper ve ark, 1993).

Polonya'nın Wolin adasında *M. bovis*'in fimbriyalı suşlarından hazırlanan aşı ile yapılan bir çalışmada aerojenik bağışıklamanın etkili olduğu bildirilmiştir (Misiura, 1994).

Pili, İBK'nın etyolojik ajanı olan *M. bovis*'in temel antijenleri ve virülens faktörlerinden biridir. İBK'ya karşı tüm hücre aşlarının düşük etkinliğinin temel nedeni, karıştırılmış biyoreaktörlerde bakteri üremesi sırasında, *M. bovis*'in hücresele dayanıklılık düzeyinin korunamamasıdır. Yapılan bir çalışmada, karıştırılmış ve/veya yayılmış biyoreaktörlerde üretilen ve büyüyen *M. bovis* kültüründe, büyümenin sonunda, hücrelerin yaklaşık % 15'inin, pilili görünümünden pilisiz görünüme dönüştüğünün görülmesi nedeniyle, karıştırılmış ve/veya yayılmış biyoreaktörlerde büyüyen *M. bovis* bakterilerindeki piliyi, mekanik hasar etkilerinden korumak için, kabarcık kolon (sütun) biyoreaktörlerin kullanımı test edilmiş ve aşılama daha uygun olduğu görülmüştür. Bu biyoreaktörler, hücresele dayanıklılığı % 1 den, % 25 seviyesine getirmiştir. Kültür ortamına %0.10 (w/v) karboksimetilselüloz (CMC) ilavesinin, hücresele dayanıklılık seviyesini artırmak için uygun olduğu, FT-IR spektroskopisi ve ELISA tekniğiyle, bu kimyasal katkı maddesinin hücrelerle etkileşime giren ancak pili antijenik özelliklerini etkilemeksizin koruyucu bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmayla, 0.0065 m/s'de havalandırılmış kabarcık kolon biyoreaktörlerin kullanımı ve CMC ilavesi, İBK'ya karşı bir aşı üretiminde çözüme yönelik olarak uygulanabilen etkili bir yöntem olduğu ortaya konmuştur (Prieto ve ark, 2008).

Kısmi saflaştırılmış doğal *M. bovis* sitotoksininden veya rekombinant *M. bovis* sitotoksininden hazırlanan aşların İBK'ya karşı koruyucu etkileri birçok çalışmada incelenmiştir. George ve ark 2005 yılında, Quil A ile adjuvanlanmış kısmi saflaştırılmış *M. bovis* sitotoksininden hazırlanan aşı ile aşılanmış buzağılarda İBK gelişiminin yavaşladığını göstermişlerdir. Kısmi saflaştırılmış *M. bovis* sitotoksin aşlarının imalatlarının geniş ölçüde kısıtlanmış olmaları, araştırmaları daha çok rekombinant *M. bovis* sitotoksin aşları üzerine yönlendirmiştir.

Angelos ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada MbxA'daki karboksi terminali aşı antijeni olarak kullanılmıştır. 2007'deki müteakip çalışmalarında MbxA'nın aynı karboksi terminali (ucu) *M. bovis* pilinin amino ucu ile bir füzyon proteini olarak ifade edilmiştir. Bu çalışmada aşılananlarla kontrol buzağıları kıyas edildiğinde aşıları olanların arasında İBK gelişiminin yavaş olduğu ancak bu farkın anlamlı ve önemli olmadığı rapor

edilmiştir. 2007 yılındaki bu çalışmada İBK'e yakalanmış buzağuların gözlerinde *M. bovoculi* varlığı belirlenmiş, sürüde hem *M. bovis* hem de *M. bovoculi* varlığı göz önüne alındığında aşı etkinliği negatif etkilenmiş olabileceği ortaya çıkmıştır.

Rekombinant *M. bovoculi* MbvA aşısının İBK'ya karşı etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla Kaliforniya Üniversitesi'nde bir çalışma tasarlanmıştır. Deneme 2 Mayıs ve 15 Ağustos 2006 tarihleri arasında 127 buzağı üzerinde yapılmıştır. Buzağular aşı ve kontrol gurubu olmak üzere 2 guruba ayrılmışlardır. Kontrol grubunda bulunan hayvanlara 0. ve 21. günlerde ISCOM matrix (immune stimulating complex) adjuvant, aşı grubundakilerine ise ISCOM matrix ile adjuvantlanmış rekombinant *M. bovoculi* sitotoksik karboksi terminus aşısı 2 ml miktarında boyun bölgesine derialtı yol ile verilmiştir. Haftada bir kez olmak üzere 15 hafta süresince buzağuların gözleri kontrol edilmiştir. Ülserli gözlere sahip buzağulardan *M. bovis* ve *M. bovoculi* izole edilmiştir. Sekizinci haftada kornea ülserli buzağuların kümülatif oranı kontrol ve aşı guruplarında sırasıyla 0.4 (25/62) ve 0.37 (24/65), 15. haftada bu oranlar sırasıyla 0.52 (32/62) ve 0.45 (29/65) olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında ülserli buzağuların kümülatif oranlarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Kontrol grubu buzağularıyla karşılaştırıldığında 0. ve 6. haftalar arasında aşı grubu buzağularda serum nötralizasyon titresinin belirgin bir şekilde yükseldiği görülmüştür. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MbvA ile aşıl原因an ülserli gözlere sahip buzağuların gözlerinde daha yaygın *M. bovis* izole edilmiştir. *M. bovoculi* RTX toksin karboksi terminus aşısı ile aşıl原因an buzağularda önemli ölçüde serum hemolysin nötralizasyon titrelerinde artışlar olmuş ve *M. bovis*'in ve *M. bovoculi*'nin birlikte buldukları sürülerde ülserli gözlere sahip buzağulardan zayıflatılmış organizma tipleri üretmek mümkün olabileceği ortaya konmuştur. *M. bovoculi* ve *M. bovis*'in birlikte buldukları sürülerde İBK'yı önlemek için aşılarında yalnız *M. bovoculi* antijenlerin kullanılması yeterli olmayabileceği saptanmıştır (Angelos ve ark, 2010).

New South Wales, Tasmania ve Victoria eyaletlerinden elde edilen izolatların homolog pilus antijeni içeren FLA64 suşu ile benzer sıklıkta olması daha önceki küçük çaplı serolojik çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında Avusturalya'daki *M. bovis* izolatlarında ortak pilus antijenlerinin son yılda nisbeten karalı hale geldiğini ortaya koymuştur. *M. bovis*'in pilus antijenlerinin kısıtlı sayıda olmasından dolayı EPP63, FLA64 ve SAH38 suşlarını içeren aşı uygulamalarının Avusturalya'da İBK'dan kaynaklanan üretim kayıplarını azaltabilecek yararlı bir uygulama olabileceği kanaatine varılmıştır (Mc Connel ve ark, 2008; Zbrun ve ark, 2012).

Onbeş hafta boyunca 4 ila 8 aylık arasında 104 buzağıda, amacı Quil A adjuvantı ile birleştirilen zenginleştirilmiş *M. bovis* sitolizin aşısının İBK'ya karşı etkinliğinin belirlenmesi

olan, bir çalışmanın sonuçları 2005 yılında bildirilmiştir. Aşı moleküler ağırlığı 65 ile 90 kd arasında değişen miktarlarda 4 protein içermiştir. Sitolizin aşısıyla aşılanan buzağılarda kontrol gurubuna göre daha az İBK olgusu görülmüştür. Her iki kontrol grubu kıyaslandığında, İBK gelişen sitolizin aşısı ile aşılananlarda kornea ülseri başlama zamanının geciktiği saptanmıştır. Endotoksin içeren sitolizin Quil A aşısı ile aşılanan buzağılarda hastalığın klinik belirtileri gözlenmemiştir. Sonuçta zenginleştirilmiş sitolizin aşısı ile aşılanan bazı buzağılarda İBK'ya karşı direnç görülmüş ve aşının buzağıları koruyabileceği kanaatine varılmıştır (George ve ark, 2005; Zbrun ve ark, 2012).

Kaliforniya'nın kuzeyindeki sığır sürülerinde doğal İBK oluşmasına karşı rekombinant *M. bovis* pilin-subunit *M. bovis* sitotoksin aşılarda koruyucu etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla 2005 yılı yazında tesadüfi örnekleme yöntemiyle bir çalışma yürütülmüştür. 100 adet sığır kontrol gurubu ISCOM matrix (adjuvant kontrol) ile, diğerleri rekombinant *M. bovis* sitotoksin karboksi terminus + ISCOM matrix (MbxA), veya rekombinant *M. bovis* pilin- sitotoksin karboksi terminus + ISCOM matrix (pilin-MbxA) ile aşılanmışlardır. Buzağılar 21 gün sonra ikinci kez aşılanmışlardır. 18 hafta boyunca haftada bir buzağılarda İBK'ya bağlı olarak kornea ülseri gelişimi görülmüştür. Tüm gruplar içinde, Pilin-MbxA ile aşılanan grup, kornea ülserli buzağılar içerisinde, en düşük kümülatif orana sahip olarak belirlenmiştir. Pilin-MbxA ile veya yalnız MbxA ile aşılananların *M. bovis* sitotoksik serum nötralizasyon titrelerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında belirgin olarak yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki buzağuların gözlerinden, Pilin-MbxA ile veya yalnız MbxA ile aşılanana göre daha fazla *M. bovis* üretilmiştir. Oküler kültür sonuçları *M. bovis* antijeni ile aşılama gerekliliğini ortaya koymuştur. İlave olarak oküler kültürlerde, MbxA ve pilin-MbxA ile aşılanan buzağılarda daha yüksek oranda *M. bovoculi* izole edilmiştir. Sonuç olarak *M. bovoculi* izole edilen sürülerde *M. bovis* aşısının etkinliğinin düşebileceği kanısına varılmıştır (Angelos ve ark, 2007a).

ISCOM matrix ile adjuvantlanmış subünit *M. bovis* pilin-sitotoksin-*M. bovoculi* aşılarda İBK'ya karşı koruyucu etkisinin olmadığı görülmüştür. Uygun antijenlerin ilave edilmesiyle oluşacak subünit rekombinant *Moraxella* spp. aşılılarıyla, İBK'ya karşı etkili bir bağışıklığın oluşması için kullanılabilir ürün elde etmek mümkün olabilecektir (Angelos ve ark, 2012).

Quilla jasaponaria bir Güney Amerika ağacı olan *Quillaja saponaria* Molina'nın kabuğundan elde edilen öz suyudur. Uzun yıllardan beri veteriner hekimlikte kullanılmaktadır. Bu ağaç kabuğu ekstresinin çoğu komponenti adjuvan etki göstermektedir. Genel olarak immün hücre proliferasyonuna ve artmış antikör oluşumuna yol açmaktadır. Quillaja

saponinlerinin mitojenik etkiye sahip olduklarını ve bu yolla T ve B hücre proliferasyonuna neden olduklarını gösteren çalışmalar vardır. Quil A, Quillaja saponaria'dan elde edilen doğal bir üründür ve 23 çeşitten fazla saponin içerir. Uzun zamandır veteriner hekimlikte başarıyla kullanılmasına karşılık insanlar için oldukça toksik bir maddedir. Ağır yerel reaksiyonlar ve granülom oluşturmalarının yanı sıra eritrosit membranındaki kolesterollere etki ederek ağır hemolize yol açar. QS21, Quil A'dan ters faz kromatografi yöntemi ile damıtılarak elde edilir. QS-21 alüminyum adjuvanlarına alternatif olarak güçlü sellüler yanıt oluşturmak için geliştirilmiştir. Th1 sitokinlerini (IL-2, IFN- γ) ve IgG2a antikörlerini stimüle eder. HIV ve DNA aşılı için adjuvan olarak denenmiştir. Hem mukozal hem de sistemik immünite oluşturmak için kullanılmıştır. Sonuç olarak toksisitesinin yüksek olması, hemolitik etkileri ve kararlı bir kimyasal yapı göstermemeleri nedeniyle tüm Quillaja saponinleri halen insanlarda kullanım için uygun değildir. Ancak kanser aşılı gibi yüksek toksisitenin kabul edilebileceği durumlarda, düşük dozlarda ya da diğer adjuvanlarla birlikte kullanılmaları yönünde çalışmalar devam etmektedir (Yurdakök ve ark, 2008).

Oküler mukozal salgı tepkisini uyarak hastalığı önlemek için kullanılan parenteral immunojenler, tam koruma sağlayamamaktadır. Çünkü bunların oküler mukozal salgıyı teşviklerine verilen yanıt zayıf kalmaktadır. Yerel olarak salgılanan IgA bağışıklığın ana bileşenlerinden biridir. 2012 yılında yayınlanan ve temel amacı, *M. bovis*'in saflaştırılarak pili antijeninin birkaç farklı adjuvantla (QuilA, Marcol Arlacel, Marcol Span, PLGA polimerleriyle mikrokapsüle edilmiş pili) kullanıldığı deneysel amaçla hazırlanmış aşının intranasal uygulanmasından sonra oluşan oküler mukozal IgA yanıtının ELISA testiyle değerlendirilmesi olan bir çalışmada; doğal İBK olgularında salgılanan IgA ile deneysel aşılama yanıt olarak salgılanan IgA karşılaştırıldığında, aşılama yapılan grupta kontrol grubundaki buzağılara nisbeten önemli ölçüde pili antijenine karşı verilen immun yanıt neticesinde salgılanan IgA'nın yüksek olduğunun görülmesine rağmen *M. bovis* enfeksiyonlarına veya tipik İBK lezyonlarının gelişmesine karşı koruyucu spesifik bir immun yanıt olarak görülmemiştir (Zbrun ve ark, 2012)

Iowa ve Wisconsin Üniversiteleri'nde buzağılarda infeksiyöz keratokonjunktiviti önlemek için otojen aşı etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla 2008 yılında random yöntemiyle birbirine paralel iki çalışması yürütülmüştür. Deneme 2008 yılı kasım ve mayıs ayları arasında Iowa ve Wisconsin üniversitelerine ait çiftliklerde yapılmıştır. Iowa'daki sürülerde *M. bovoculi*'den üretilen aşılı, Wisconsin'deki sürülerde ise *M. ovis* olarak yeniden adlandırılan *Branhamella ovis*'ten üretilen aşılı kullanılmıştır. Otojen aşı veya placebo aşı

yapmak için 2008 yılının ocak ve mayıs aylarında doğan ve gözle görünür korneal lezyon taşımayan buzağular bilgisayarda rasgele sıralanarak seçimler yapılmıştır. Derialtı yol ile 21-28 gün arayla iki ayrı doz verilmiştir. Çalışma süresi boyunca elde edilen birinci sonuç İBK kümülatif insidensi olmuştur. İkinci sonuç ise süten kesim ağırlığı olmuştur. Sadece Iowa sürüsünde aşılammış buzağularda sürü risk kriterini aşan (% 15'in üzerinde) oranda İBK görülmüş ve buzağulardan *M. bovoculi* izole edilmiştir. Kümülatif insidens aşılamanın buzağularda 47/105, aşılammayan buzağularda 49/109 olarak saptanmıştır. Süten kesme ağırlıkları kıyaslandığında fark görülmemiştir. Aşısız grupta süten kesilme ağırlığı 146 kg, aşıllı grupta 148 kg olarak belirlenmiştir. Bu sürüdeki veriler otojen aşılamanın başarısız olduğunu göstermiştir (Funk ve ark, 2009).

Iowa Üniversitesi'ne ait çiftlikte Mayıs ve Kasım 2009 ve 2010 yılları arasında doğal İBK meydana getiren *M. bovis*'e karşı buzağularda otojen aşı etkinliğini değerlendirmek amacıyla yürütülen bir çalışmada, eldeki verilerin önceki çalışmalardaki verilerle birlikte değerlendirilmesiyle, otojen *M. bovis* aşlarının genellikle doğal İBK kontrolünde etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır (O'Connor ve ark, 2011).

Arjantin'de 1999 yılında yayınlanan bir çalışmada 3 yıl boyunca İBK'lı sığırlardan toplanan *M. bovis* izolatlarının DNA parmak izi analizleri, dış zar proteinleri (OMP) ve lipopolisakkarit (LPS) analizleri ile organizmanın spesifik çeşitliliği incelenmiştir. LPS ve OMP profilleri SDS-PAGE analizi ile incelenmiş ve PCR-DNA fingerprint analiziyle genotipleri belirlenmiştir. Genotipik tanımlamada 5 DNA tipi belirlenirken aralarında toplanan 3 türde içeren 60 *M. bovis* izolatının LPS ve OMP profillerinin analizinde 3 kaba LPS tipi ve 3 OMP tipi belirlenmiştir. Bu 3 metodun hiçbiri yalnız başına grupları değerlendirmek için kullanılmamıştır, çünkü yüzey yapıları sınırlı her bir grubun heterojenitesi farklı olmasına rağmen veriler, her bir yazım metoduyla birleşince 15 farklı altgrup belirlenmiştir. Bu alt grup oluşumu benzer genotipli izolatların kolayca birbirlerinden ayırt edilmesini sağlamıştır. Bu metodun hastalık salgınlarında etkenin takip edilmesinde, aşı programlarının izlenmesinde, virulans çalışmalarında ve epidemi durumlarında *M. bovis*'in popülasyonundaki farklılıklarda olduğu gibi hastalığın farklı yönlerini değerlendirmede yararlı olacağı belirtilmiştir (Prieto ve ark, 1999).

Uruguay'da 2013 yılında yayınlanan bir çalışmada *M. bovis* ve *M. bovoculi*'nin klinik izolatlarındaki genetik çeşitlilik RAPD-PCR, ERIC-PCR ve BOX-PCR parmak izi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca disk diffüzyon yöntemiyle *Moraxella* türlerinin antibiyotik dirençlilikleri değerlendirilmiştir. İBK salgınlarında moleküler çeşitlilik belirlenmiştir. Hatta

tek bir salgın içinde farklı genotipte *Moraxella* türlerinin bir arada bulunduğu ve antibiyotik direnci *M. bovis* ve *M. bovoculi* arasında önemli farklılıklar göstermiştir. Ticari aşuların neden kısmi koruma sağladığı izolatlardaki olağanüstü varyasyonlar ile izah edilebilmektedir. Araştırmacılar elde ettikleri tüm bu sonuçların İBK'ya karşı korunma veya tedavi stratejilerinin tasarımı için önemli olabileceği kanısına varmışlardır (Sosa ve ark, 2013).

2012 yılında yayınlanan bir araştırmada, İBK etiyolojik ajanı olan patojen *M. bovis*'e immun yanıt oluşturmak için iki sitokin ve inaktif bakteriden (bakterin) hazırlanan aşı test edilmiştir. Bakterin ile interleukin-2 ve interferon- α kombine edilerek oluşturulan aşı bir gruba, yalnız bakterin aşısı başka bir gruba uygulanmıştır. Kontrol grubu yerine deneysel olarak kornea *M. bovis* ile enfekte edilerek oluşturulan tedavi grubu ile değerlendirme yapılmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçların *M. bovis*'e sitokinlerin ilave edilerek hazırlanan aşuların sadece İBK'dan kaynaklanan göz hasarlarına değil, aynı zamanda hastalıklı hayvanların sayısını azaltabileceğini bildirmişlerdir (Di Girolamo ve ark, 2012).

Güncel olarak ABD'de Addison Biyolojik Laboratuvarında *M. bovis* ve *M. bovoculi*'ye karşı hazırlanan otojen ticari aşular MAXI/GUARD ismiyle kullanıma sunulmaktadır. Boehringer Ingelheim'in ürettiği aşı ise Ocu-Guard MB-1 ismiyle kullanıma sunulmaktadır. Merck firmasının EPP63 FLA 64 ve SAK 38 suşlarından hazırlanan *M. bovis* bakterin aşısı bulunmaktadır (Angelo ve ark, 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırmamız Mart-Eylül 2017 tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan 16 farklı mahalledeki 21 adet sığır işletmesi ziyaret edilerek gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın hayvan materyalini söz konusu işletmelerden bulunan ve konjunktivitis, aşırı lakrimasyon, korneada opasite klinik semptomları (Şekil 2, Resim6) gözlenen 80 (51 hayvanda unilateral, 29 hayvanda bilateral seyreden semptomlar olmak üzere) adet sığır oluşturmuştur. Söz konusu 80 adet svap numunesi alınmıştır. Örnekleme yapılan hayvanlara ait bilgiler Tablo 1’de verilmiştir.

Örnekler, hayvanların konjunktival dokusundan taşıma solusyonlu svaplara alınmıştır ve soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarı’na ulaştırılmıştır. Bu örnekler, *M. bovis* varlığı ve izole edilecek olan *M. bovis* saha suşlarının antibiyotik dirençli olup olmadığı yönünden araştırılmıştır. Araştırmanın yapılmasında Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ADÜ-HADYEK)’nun 25.08.2016 tarih ve 64583101/2016/139 sayılı kararı ile herhangi bir sakınca görülmemiştir.



Resim 6. Numune alınan İBK şüpheli hayvanın klinik görünümü

Tablo 3. Örnek alınan sığırlara ait bilgiler

NO	BULUNDUĞU YER	YAŞ	CİNSİYET	IRK	KLİNİK GÖRÜNÜM
1	BALTAKÖY	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
2	BALTAKÖY	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
3	BALTAKÖY	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
4	BALTAKÖY	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
5	BALTAKÖY	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
6	BALTAKÖY	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
7	PINARDERE	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
8	PINARDERE	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
9	PINARDERE	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
10	PINARDERE	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
11	PINARDERE	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
12	KARAHAYIT	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
13	KARAHAYIT	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
14	KARAHAYIT	2	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
15	KARAHAYIT	2	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
16	KARAHAYIT	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
17	KARAHAYIT	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
18	KARAHAYIT	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
19	DALAMAN	5	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
20	DALAMAN	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
21	DALAMAN	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
22	ARMUTLU	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
23	ARMUTLU	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
24	ARMUTLU	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
25	ARMUTLU	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL
26	ARMUTLU	5 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
27	ARMUTLU	5 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
28	KOCAGÜR	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL

29	KOCAGÜR	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
30	KOCAGÜR	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
31	KOCAGÜR	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
32	KOCAGÜR	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
33	KOCAGÜR	2	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
34	KOCAGÜR	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
35	KOCAGÜR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
36	KOCAGÜR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
37	KOCAGÜR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
38	KOCAGÜR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
39	KOCAGÜR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
40	KOCAGÜR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
41	KOCAGÜR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
42	MESUTLU	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
43	MESUTLU	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
44	MESUTLU	7 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	BİLATERAL
45	MESUTLU	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
46	MESUTLU	6 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	UNİLATERAL
47	ATÇA	5 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
48	KARDEŞKÖY	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
49	EFELER	8 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	UNİLATERAL
50	GÖLHİSAR	7 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
51	GÖLHİSAR	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
52	GÖLHİSAR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
53	GÖLHİSAR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL
54	GÖLHİSAR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
55	GÖLHİSAR	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
56	MUSLUCA	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
57	MUSLUCA	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
58	SAVRANDERE	2	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
59	SAVRANDERE	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL

60	UMURLU	7 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	UNİLATERAL
61	UMURLU	7 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	BİLATERAL
62	UMURLU	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
63	UMURLU	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL
64	UMURLU	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
65	UMURLU	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
66	KOZALAKLI	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
67	KOZALAKLI	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
68	KOZALAKLI	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
69	KOZALAKLI	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
70	KOZALAKLI	5	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
71	KOZALAKLI	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
72	KOZALAKLI	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
73	KOZALAKLI	8 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL
74	KOZALAKLI	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
75	ŞAHNALI	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL
76	ŞAHNALI	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
77	ŞAHNALI	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
78	ŞAHNALI	3	İNEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL
79	ŞAHNALI	4	İNEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL
80	ŞAHNALI	4	İNEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Antibiyotik Diskleri ve Ayıraçlar

3.1.2.1. Besiyerleri

3.1.2.1.1. İzolasyon Besiyerleri

3.1.2.1.1.1. Tryptic Soy Broth (Merck®, 1.09205)

Pepton(kazein)

17 g

Pepton(soya unu)	3 g
NaCl	5 g
Safra tuzları No. 3	1.5 g
D(+)-glukoz	2.5 g
Di-potasyumhidrojenfosfat	4 g
Novobiocin	0.02 g
Distile su	1000 ml

Araştırmamız için alınan svap örneklerinde bulunan bakterinin zenginleştirilmesinde Tryptic Soy Broth (TSB) kullanılmıştır. TSB besiyeri 1000 ml distile suda eritilerek hazırlanmış ve tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra erlenlerdeki besi yerleri otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.1.2.1.1.2. Blood Agar (Merck®, 110886)

Blood Agar	40 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH’sı 7,2–7,4’e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C’ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında steril koyun kanı ilave edilmiştir.

3.1.2.1.2. İdentifikasyon besiyerleri

3.1.2.1.2.1. MacConkey Agar (Merck®, 105465)

Pepton	20 g
NaCl	5 g
Safra tuzları No. 3	1.5 g
Kristal violet	0.001 g
Nötralred	0.03 g
Agar-agar	15 g
Distile su	1000 ml

Sorbitol MacConkey agardan 50 g/l oranı ile 500 ml distile su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrasında 45 °C’ye kadar soğutulan 500 ml agara aseptik şartlarda petri kaplarına 12,5 ml/petri olacak şekilde dökülmüştür.

3.1.2.1.2.2. Jelatin Agar (Merck®, 1.04070)

Pepton	5 g
Sığır et ekstraktı	3 g
Agar	15 g
Jelatin	4 g
Distile su	1000 ml

Jelatin agar, 10 g/l oranı ile 500 ml distile su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrasında 45 °C’ye kadar soğutulan 500 ml agara, aseptik şartlarda petri kaplarına 12,5 ml/petri olacak şekilde dökülmüştür.

3.1.2.1.2.3. Lassen’in 3’lü tüp besiyerleri

Tüp I

Peptone	20 g
Lactose	10 g
Glucose	1g
Sodium thiosulphate	0.2 g
Ferric ammonium sulphate	0.3 g
NaCl	6 g
Agar	17 g
Phenol red (0.2’lik)	12.5 ml
Distile su	1000 ml

Karışımın pH’sı 7.6’ya ayarlandı ve 121 °C’de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

Tüp II

Peptone	5 g
Neopeptone	5 g
Mannitol	2 g
Agar	2.5 g
Potassiumnitrate	1.7 g

Phenol red (% 0.2'lik)	20 ml
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

Tüp III

L- Tryptophan	0.3 g
PotassiumDihydrogenphosphate	0.1 g
PotassiumHydrognephosphate	0.1 g
Üre	2 g
Ethanol (% 95'lik)	1 g
Phenol red (% 0.2'lik)	20 ml
NaCl	0.5 g
Distile su	1000 ml

Besiyerinin sterilizasyonu milipore (0.2 µ) filtreden süzülerek yapıldı (Koneman ve ark, 1997).

3.1.2.1.2.4. Urea Broth (Merck®, 108483)

Maya ekstraktı	0,1 g
KH ₂ PO ₄	9,1 g
Na ₂ HPO ₄	9,5 g
Fenol red	0,01 g
Urea	20 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 6,8-7,00'a ayarlandı. Broth tamamen eritildikten sonra membran filtre yöntemi ile 3 ml olarak tüplere dağıtılmıştır.

3.1.2.1.2.5. Nitrate Broth (Difco™, 226810)

Beef Extract	3.0 g
Pepton	4.0 g
Proteose Pepton No. 3	1.0 g

Potasyum Nitrat	1.0 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 6,8-7,00'a ayarlandı. Broth tamamen eritildikten sonra 3 ml olarak tüplere dağıtılıp 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

3.1.2.1.3. Antibiyogram Besiyeri

3.1.2.1.3.1. Mueller-Hinton Agar (Merck®, 1.05437)

Meat infusion	2,0 g/L
Casein Hydrolysate	17,5 g/L
Starch	1,5 g/L
Agar-agar	13,0 g/L

Dehidre besiyeri, 34,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritildi, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilip, steril petri kutularına 12,5'er ml döküldü.

3.1.2.1.4. Antibiyotik Diskleri

Antibiyotik duyarlılık testlerinde Enrofloksasin G (10 U), Sefoperazon (30 µg), Klaritromisin (30 µg), Gentamisin (25 µg), Eritromisin (5 µg), Amoksisilin-Klavulanik asit (30 µg), Florfenikol (30 µg) ve Oksitetrasiklin (30 µg) (Oxoid®) antimikrobiyal ajanlarını ihtiva eden diskler kullanılmıştır.

3.1.2.2. Ayıraçlar

3.1.2.2.1. İndol ayıracı

P-Dimethylaminobenzaldehyde	10 g
Isoamylalcohol	150 ml
HCl (konsantre)	50 ml

3.1.2.2.2. Nitrat ayıracı

Ayıraç A:

Sulfanilic acid	8 g
Acetic acid 5N,30%	1 lt,

Ayıraç B:

α -Naphthylamine	5 g
Acetic acid (5 N),30%	1 lt

3.1.3. Pozitif Kontrol

Araştırmamızda pozitif kontrol olarak üretici firmadan temin edilen *Moraxella bovis* ATCC® (10900) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fenotipik İdentifikasyon

3.2.1.1. *Moraxella bovis* İdentifikasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden *M. bovis*'in saf olarak elde edilmesi amaçlandı. Bunun için, svap örnekleri TSB'de zenginleştirilerek ve 37 °C'de 24 saat inkube edildi. TSB'de yapılan ön inkubasyondan sonra her bir sıvı besiyerinden bir öze dolusu süspansiyon alınarak % 7 koyun kanı ilaveli kanlı agara ekimi yapıldı, 37°C'de 48 saat aerobik koşul altında inkube edildi. İnkübasyon süresi sonunda petrilere gri-beyaz, ortası düğmeli radyal üreme zonu gösteren *M. bovis* şüpheli kolonilere gram boyama yapıldı. Gram boyama sonucunda mikroskop altında Gram negatif, diplobasil ve kokobasil olarak görülen kolonilerden etkenler saflaştırıldıktan sonra, MacConkey agara ekim yapıldı. MacConkey agarda üreme görülmemesi *M. bovis* şüpheli olarak değerlendirildi. *M. bovis* şüpheli koloniler makroskopik morfoloji, hemoliz özelliği, katalaz, oksidaz, üreaz, jelatinaz ve nitrat redüktaz aktivitesi, hareket yeteneği ile penisilin duyarlılığı, kloksasilin dirençliliği ve karbonhidrat fermentasyonu, hemaglutinasyon ve otoaglutinasyon gibi özellikleri belirlenerek identifikasyonlar değerlendirildi.

3.2.1.2. Jelatin Agarda Üreme

Jelatinaz testi, jelatinli besiyerinde üreyen bakterinin jelatinaz enzimi varsa kolonisi etrafında sıvı kıvamında bir zon gelişmesi esasına dayanmaktadır. İncelen bakteri kolonisinden iğne öze ile agar yüzeyine batırılarak ekim yapıldı. 24. ve 48. saatlerde petrilere kontrol edildi. Koloninin etrafında jelatinin dekompoze olarak likefaksiyon alanı içeren zon oluşması jelatinaz aktivitesi açısından pozitif olarak değerlendirildi (Holt ve ark, 1994; Koneman ve ark, 1997).

3.2.1.3. MacConkey Agarda Üreme

Gram negatif diplobasil ve kokobasil olan kolonilerden MacConkey agara öze ile ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonunda üreme görülmemesi laktoz negatif olarak değerlendirilmiştir (Arda, 2000; Bilgehan, 2009).

3.2.1.4. Biyokimyasal Testler

M. bovis şüpheli kolonilerin kanlı agarlara pasajları yapılarak saf kültürleri elde edildi. Saf kültürlere gram boyama yapıldı. Gram negatif diplobasil ve kokobasil kolonilerden Lassen'in üçlü tüp besiyerlerine ekimler yapıldı. Lassen üçlü tüp besiyerleri 37 °C'de 24 saat inkube edildi. İnkubasyondan sonra tüpler değerlendirildi ve *M. bovis* suşlarının identifikasyonları gerçekleştirildi (Arda, 2000; Bilgehan, 2009).

3.2.1.4.1. Katalaz Testi

Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1–2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlenmiştir. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Murray ve Patrick, 2003). Katalaz testipozitif olan izolatlar şüpheli olarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.4.2. Oksidaz testi

İzolasyonu yapılan bakterilerin oksidaz aktiviteleri, oksidaz diski (Bacto) ile ölçüldü. Şüpheli bakterilerin 24 saatlik saf kültüründen öze ile alınan birkaç koloni oksidaz diskine yayılarak sürüldü. 25-30 saniye içinde diskin pembe mor bir renk alması pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirildi (Arda, 2000; Bilgehan, 2009).

3.2.1.4.3. Nitrat Testi

İçinde nitratlı buyyon bulunan tüplere, şüpheli mikroorganizmaların saf kültüründen birkaç koloni ekildi ve 37°C'de 5 gün inkube edildi. Daha sonra buyyonun üzerine nitrat

ayıracılarından (Solusyon A, Solusyon B), 1'er ml dökülerek besiyerinin renginin kırmızı veya kiremit kırmızısı olması pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak kabul edildi (Arda, 2000; Bilgehan, 2009).

3.2.1.4.4. İndol testi

İndol bir benzyl pyrrole olup, fosfopenolpiruvattan sentezlenen indolgliserolfosfat'ın aldehite bağlanmasıyla ortaya çıkar. Aromatik bir aminoasittir. Typtophanase enzimine sahip olan bakteriler triptofanı önce deamine, sonra hidrolize ederek indol oluştururlar. İndol, p-dimetilaminobenzaldehit (Kovac's ayıracı) 'nın aldehit kökü ile reaksiyona girmeye isteklidir. Bu reaksiyon gerçekleşirse besiyeri kırmızı renk alır. Üre besiyerinde *M. bovis* şüpheli kolonilerin 18-20 saatlik kültürü yapıldı. *Kovac's* ayıracı kullanılarak 5 damla ayıraç tütün iç duvarından yavaşça akıtıldı ve renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi. Renk değişimi olmaması negatif olarak değerlendirildi (Arda, 2000; Bilgehan, 2009).

3.2.1.4.5. Karbonhidrat Fermentasyonu

Glukoz, ksiloz, arabinoz, fuktoz, galaktoz, sukroz, laktoz, mannitol, dulcitol, inositol ve salisin içeren sıvı besiyerlerine *M. bovis* şüpheli kolonilerinden ekimler yapıldı. 37 °C'de 24 saatlik inkubasyondan sonra besiyerlerinde üremenin olmaması *M. bovis* açısından pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2000; Bilgehan, 2009).

3.2.1.4.6. Üreaz Testi

Sıvı üre besiyerine *M. bovis* şüpheli kolonilerden ekim yapıldı. 37 °C'de 24 saatlik inkubasyondan sonra besiyerlerinde renk değişikliğinin olmaması ile *M. bovis* açısından pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2000; Bilgehan, 2009).

3.2.1.4.7. Penisilin G ve Kloksasilin Duyarlılığı

Katalaz ve oksidaz pozitif, gram negatif diplobasil olan ve *M. bovis* şüpheli suşlardan tek bir koloni Triptik Soy Broth'da üretildikten sonra Mueller Hinton Agara ekim yapılmıştır ve ekim hattı üzerine Penisilin diski (Oxoid 15 µg) ve Kloksasilin diski (Oxoid 25 µg) yerleştirilmiştir. 37°C'de 24 saat inkube edildikten sonra kloksasiline dirençli, penisilin G'ye duyarlı suşlar *M. bovis* olarak ayrılmıştır (Arda, 2000; Bilgehan, 2009).

3.2.1.4.8. Hemaglutinasyon testi

Hemoliz özelliği gösteren *M. bovis* suşlarının patojen olup olmadığının belirlenmesi için uygulandı. Sıvı üre besiyerine *M. bovis* kolonilerinden ekim yapıldı. 37 °C’de 24 saatlik inkubasyondan sonra besiyerinin turbiditesi 0.5 McFarland derecine ayarlandı. Her kuyucuğunda 100 µl yıkanmış % 1’lik yıkanmış tavuk eritrositi içeren V tabanlı mikropleytlere eşit hacimde bakteri süspansiyonları eklendi. 1 dakika hafif şekilde oda sıcaklığında pleyt çalkalandı. Eritrositlerin 37 °C’de 40 dakika çökmesi beklendi. Süre sonunda mikropleyt yukarı aşağı eğilerek eritrositlerin damla şeklinde akışının olup olmadığı gözlemlendi. Akışkanlığın olmaması tam bir HA olarak değerlendirildi (Krieg ve ark, 2005).

3.2.1.4.9. Otoaglutinasyon testi

M. bovis suşlarının patojen olup olmadığının belirlenmesi için uygulandı. Katı kültürden bir öze dolusu alınan hemolitik *M. bovis* suşları 100 µl % 0.85’lik tuz süspansiyonu ile birlikte karıştırıldı. Karışım içinde görülen kümeleşmeler otoaglutinasyon olarak değerlendirildi. Otoaglutinasyonun inhibisyonu için % 10’luk MgCl₂ çözeltisi 100 µl oranında ilave edilince otoaglutinasyonun kaybolduğu görüldü (Krieg ve ark, 2005).

3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

İdentifiye edilen *M. bovis* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla Mueller-Hinton Agar (Merck®) kullanılarak Disk Diffüzyon yöntemi uygulanmıştır. Hazırlanan Müeller-Hinton besiyeri 10 cm çapındaki petrilere 4 mm kalınlığında olacak şekilde döküldükten sonra katılaşmaya bırakılmıştır. *M. bovis* suşlarının 0.5 Mc Farland değerindeki buyyon kültürlerinden plak besiyerinin yüzeyine 0,1 ml ya da svap ile her tarafa yaydırılarak ekimleri yapılmıştır. Ekim yüzeyinin kuruması için birkaç dakika beklenildikten sonra diskler ucu alevden geçirilerek steril edilmiş pensetle kenardan 1.5 cm, birbirlerinden 1.5 cm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Araştırmamızda enrofloksasin, eritromisin, gentamisin, amoksisilin-klavulanik asit, oksitetrasiklin, florfenikol, klaritromisin, ve sefaperazon antibiyotikleri kullanılmıştır (CLSI, 2012).

Besiyerleri 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiş, disk çevresindeki inhibisyon zon sınırları ölçülerek Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI, 2012) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017) standartlarına göre yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon Bulguları

Araştırmamızda yapılan fenotipik identifikasyon sonucunda incelenen 80 adet oküler svap örneğinin 10 (% 12.5) adedinden *M. bovis* identifiye edilmiştir. İdentifiye edilen *M. bovis* suşlarından 8 (% 80)'i hemolitik, 2 (% 20)'si ise nonhemolitik özellikte tespit edilmiştir. Ayrıca *M. bovis* dışında üreyen bakteriyel izolatlarla yapılan biyokimyasal testler sonucunda 44 *Proteus* sp., 25 *Streptococcus* sp., 16 *Staphylococcus* sp., 8 *Bacillus* sp., 2 *Corynebacterium* sp., 1 *E. coli* ve 1 *Candida* sp. identifiye edilmiştir. Biyokimyasal identifikasyon sonuçları Tablo 4'de verilmektedir.

Tablo 4. Biyokimyasal identifikasyon sonuçları

NO	BULUNDUĞU YER	YAŞ	CİNSİYET	IRK	KLİNİK GÖRÜNÜM	İDENTİFİKASYON
1	BALTAKÖY	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
2	BALTAKÖY	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
3	BALTAKÖY	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
4	BALTAKÖY	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Staphylococcus</i> sp.
5	BALTAKÖY	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.
6	BALTAKÖY	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
7	PINARDERE	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
8	PINARDERE	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
9	PINARDERE	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
10	PINARDERE	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Staphylococcus</i> sp.
11	PINARDERE	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
12	KARAHAYIT	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
13	KARAHAYIT	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
14	KARAHAYIT	2	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
15	KARAHAYIT	2	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.

16	KARAHAYIT	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Nonhemolitik M. bovis Streptococcus sp. Staphylococcus sp.
17	KARAHAYIT	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.
18	KARAHAYIT	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.
19	DALAMAN	5	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.
20	DALAMAN	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Nonhemolitik M. bovis Bacillus sp. Streptococcus sp.
21	DALAMAN	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Streptococcus sp.
22	ARMUTLU	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.
23	ARMUTLU	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	Proteus sp.
24	ARMUTLU	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.
25	ARMUTLU	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL	Proteus sp.
26	ARMUTLU	5 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	Streptococcus sp. Staphylococcus sp.
27	ARMUTLU	5 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Streptococcus sp. Staphylococcus sp.
28	KOCAGÜR	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Hemolitik M. bovis Streptococcus sp.
29	KOCAGÜR	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.
30	KOCAGÜR	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Hemolitik M. bovis Streptococcus sp.
31	KOCAGÜR	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	Hemolitik M. bovis Streptococcus sp.
32	KOCAGÜR	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.
33	KOCAGÜR	2	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	Streptococcus sp. Corynebacterium sp.
34	KOCAGÜR	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	Streptococcus sp. Staphylococcus sp. Corynebacterium sp.
35	KOCAGÜR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.
36	KOCAGÜR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Proteus sp.

37	KOCAGÜR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.
38	KOCAGÜR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.
39	KOCAGÜR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp.
40	KOCAGÜR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
41	KOCAGÜR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
42	MESUTLU	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Serratia</i> sp.
43	MESUTLU	1	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
44	MESUTLU	7 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	BİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp.
45	MESUTLU	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
46	MESUTLU	6 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
47	ATÇA	5 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
48	KARDEŞKÖY	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
49	EFELER	8 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	UNİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.
50	GÖLHİSAR	7 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
51	GÖLHİSAR	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp.
52	GÖLHİSAR	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Bacillus</i> sp.
53	GÖLHİSAR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Staphylococcus</i> sp.
54	GÖLHİSAR	7 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
55	GÖLHİSAR	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
56	MUSLUCA	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
57	MUSLUCA	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
58	SAVRANDERE	2	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
59	SAVRANDERE	3	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
60	UMURLU	7 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	UNİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp.
61	UMURLU	7 AYLIK	ERKEK	SİMENTAL	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
62	UMURLU	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp.
63	UMURLU	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.

64	UMURLU	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
65	UMURLU	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>E. coli</i> <i>Bacillus</i> sp.
66	KOZALAKLI	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	Hemolitik <i>M. bovis</i> <i>Streptococcus</i> sp.
67	KOZALAKLI	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	Hemolitik <i>M. bovis</i> <i>Staphylococcus</i> sp.
68	KOZALAKLI	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Bacillus</i> sp.
69	KOZALAKLI	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
70	KOZALAKLI	5	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Hemolitik <i>M. bovis</i> <i>Staphylococcus</i> sp.
71	KOZALAKLI	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Hemolitik <i>M. bovis</i> <i>Streptococcus</i> sp.
72	KOZALAKLI	4	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	Hemolitik <i>M. bovis</i> <i>Staphylococcus</i> sp.
73	KOZALAKLI	8 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Candida</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp.
74	KOZALAKLI	8 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp.
75	ŞAHNALI	6 AYLIK	DİŞİ	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
76	ŞAHNALI	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp.
77	ŞAHNALI	6 AYLIK	ERKEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp.
78	ŞAHNALI	3	İNEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Streptococcus</i> sp.
79	ŞAHNALI	4	İNEK	HOLŞTAYN	BİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.
80	ŞAHNALI	4	İNEK	HOLŞTAYN	UNİLATERAL	<i>Proteus</i> sp.

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları

Araştırmamızda identifiye edilen *M. bovis* suşlarının disk difüzyon tekniği ile antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde enrofloksasin, eritromisin, gentamisin, amoksisilin-klavulanik asit, oksitetrasiklin, florfenikol, klaritromisin, ve sefaperazon antimikrobiyel ajanlarını ihtiva eden diskler kullanılmıştır

Antibiyoqram testleri sonucunda *M. bovis* izolatlarının amoksisilin- klavulanik asit'e % 70, florfenikol'e % 80, Sefoperazona % 60, oksitetrasikline ve enrofloksasine % 50, gentamisine % 40 oranlarında duyarlı, klaritromisine % 80 ve eritromisin'e % 100, oranlarına dirençli olduğu saptanmıştır. Kullanılan antibiyotiklerin zon çapı standartları Tablo 5 ve 6'de, *M. bovis* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sayıları Tablo 7'de sunulmuştur.

Tablo 5. Kullanılan antibiyotiklerin zon çapı standartları (mm) (CLSI 2012)

Antibiyotik	S	I	R
Amoksisilin-Klavulanik Asit	≥18	14-17	≤13
Sefoperazon	≥21	16-20	≤15
Gentamisin	≥15	13-14	≤12
Oksitetrasiklin	≥15	12-14	≤11
Klaritromisin	≥26	23-25	≤22
Enrofloksasin	≥26	23-25	≤22
Eritromisin	≥20	17-19	≤16
Florfenikol	≥21	18-20	≤17

Tablo 6. Kullanılan antibiyotiklerin zon çapı standartları (mm) (EUCAST 2017)

Antibiyotik	S	I	R
Amoksisilin-Klavulanik Asit	≥19	-	<19
Sefoperazon	≥22	19-21	<19
Gentamisin	≥17	14-16	<14
Oksitetrasiklin	≥22	19-21	<19
Klaritromisin	≥14	11-13	<11
Enrofloksasin	≥18	-	<18
Eritromisin	≥21	18-20	<18
Florfenikol	EUCAST veritabanında bulunamamıştır.		

Tablo 7. Elde edilen *M. bovis* suşlarının antibiyotik duyarlılık sayıları (n=10)

Antibiyotik	S	I	R
Amoksisilin-Klavulanik Asit	7	-	3
Sefoperazon	6	-	4
Gentamisin	4	3	3
Oksitetrasiklin	5	2	3
Klaritromisin	2	-	8
Enrofloksasin	5	-	5
Eritromisin	-	-	10
Florfenikol	8	-	2

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresinde bulunan sığır işletmelerinde etkenin tespiti yapılarak *M. bovis* etkenini bölgedeki hayvanlarda varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonucu 10 adet *M. bovis* suşu morfolojik, gram boyama özelliği ve biyokimyasal testler ile identifiye edilmiş, identifiye edilen tüm suşların antibiyotik duyarlılıkları disk diffüzyon yöntemi ile incelenmiştir.

Dünyada İBK semptomlu hayvanlardan *M. bovis* izolasyonuna ilişkin sonuçlar mevcuttur. Jones ve Little, 1924'de hastalığın sineklerle bulaştığını kanıtlamak için deneyler yaptılar ancak kullandıkları materyal ve metodun yanlış olmasından dolayı başarısız olmuşlardır. Diplobasillerin sineklerin sindirim sistemlerinde hızlıca tahrip olduklarını ve dış ortamlarda sadece 3 saat yaşayabildiklerini buldular. 1965 yılında Steve ve Lilly bu diplobasillerin *M. bovis* olduklarını ve enfekte hayvanların gözlerindeki akıntılardan kolayca elde edilebileceklerini belirtmişlerdir. Laboratuvarında üretilmiş olan *M. bovis* ile temas ettirilen ve çalışma sahası içindeki enfekte sığırların gözyaşı akıntısı ile temas eden sineklerin kanatları ve bacaklarından bakteriyi kolayca elde edilebileceklerini, bakterilerin sineklerin üzerinde 3 günden fazla yaşamlarını sürdürebileceklerini ve de bakterilerin sineklerin sindirim sistemlerinde kolayca tahrip olduklarını rapor etmişlerdir. Reid ve Anigstein, 1944 yılında yaz ayları boyunca Teksas Körfezi kıyılarında keratitis konusunda araştırma yaptılar. Hasta hayvanların gözlerindeki eksudatı duyarlı hayvanların konjunktivalarına nakledip kolayca hastalık oluşturarak, hastalığın bulaşıcı olduğunu göstermişlerdir. Nazal eksudatın da hastalık etkeni içerdiğini ortaya koymuşlardır. Keratokonjunktivitli vakalardan kanlı agar kullanarak tanımladıkları bakterinin *M. bovis* olduğunu ve bu etkenin kanlı agardaki temel morfolojik özelliklerinin ve patojenik ve kültürel özelliklerinin, Jones ve Little'm diplobasilleri ile aynı olduğunu bildirmişlerdir. Koyun ve keçilerde hastalık oluşturmaya çalışmışlardır. İntraabdominal enjeksiyonlar sonucunda etkenin beyaz farelerde ölümlere yol açtığını görmüşlerdir. Deneysel ve doğal olarak hastalığa yakalanıp iyileşen hayvanların kan serumlarında *M. bovis*'e karşı spesifik aglutininler bulunduğunu ortaya koymuşlar ve ileride hastalığa karşı koruyucu aşı geliştirilmesine ışık tutmuşlardır. Baldwin, 1945 yılında infeksiyöz keratitli sığırlardan, *M. bovis* izole etmeyi başarmıştır. Baldwin hastalığın oluşumu için kornea veya konjunktivanın yaralı veya zedelenmiş olmasının gerekmediğini ortaya koymuştur. Baldwin yaptığı çalışmalar sonucunda koyun, fare, kobay ve tavşanların *M.*

bovis'e duyarlı olmadığını bildirmiştir. Deneysel olarak hastalık oluşturduğu buzağuların kan serumlarında, hastalıktan önce ve sonra presipitasyon ve komplement fizkasyon testleriyle antikor varlığını gösterememiştir. 1951 yılında Watt tarafından, İskoçya'daki bir sığır keratit salgınında 4 hayvandan *M. bovis* izole edilmesi, Büyük Britanya'dan bildirilen ilk rapordur. 1947 yılında Blakemore tarafından, infeksiyöz keratokonjunktivit salgınlarında inkluzyon cisimcikleri identifiye edilmiştir. 1952 yılında Barner, hastalığın görüldüğü yerlerdeki sığırlardan izole ederek saf kültürlerde çoğalttığı *M. bovis*'i sağlıklı sığırlara bulaştırarak, yeniden keratokonjunktivit oluşturmayı başarmakla birlikte, tavşan, kobay ve koyunların gözlerinde hastalık oluşturamamıştır. 1953 yılında Jackson, *M. bovis*'in maksimum olarak üreyip gelişmesi için X ve V faktörlerine gereksinim duyduğunu ve deneysel olarak aşılama ve antikor üretme çalışmalarından önce kültürlerde virüent olan ve düzgün (smooth) tipte üreyen koloniler ile virüent olmayan ve düzgün tipte üremeyen (rough) kolonilerin birbirlerinden ayrılması gerektiğini belirtmiştir. Jackson deneysel olarak hastalık oluşturduğu hayvanların enfeksiyondan 14 ve 20 gün sonra kan serumlarında yüksek oranda (1:320) antikor titresi olduğunu görmüştür. 1954 yılında Gallagher, Avusturalya'da hastalıklı sığırların gözlerinden kapsüllü ve smooth tipte üreme gösteren *M. bovis* izolasyonunu bildirmiştir. Organizmanın biyokimyasal ve morfolojik özellikleri daha önceki araştırmacıların bildirdikleri ile aynı olmuştur. İzole edip ürettiği bakterileri 4 buzağıya inokule ederek 3 gün sonra hastalık oluşturmuştur. Gallagher hastalıktan kurtulan hayvanların iyileştikleri halde bakteriyi gözlerinde en az 139 gün süreyle barındırabileceklerini ve duyarlı hayvanlar için bulaşma kaynağı olacaklarını bildirmiştir. Gallagher ayrıca *M. bovis*'in farelerde patojenik olduğunu, ürettiği organizmayı konjunktival kesye damlatıp hastalık oluşturarak göstermiştir. Koyun, tavşan ve kobaylarda ise patojenik olmadığını bildirmiştir. 1954 yılında Faull ve Hawksley, Büyük Britanya'da sığırlarda 7 adet infeksiyöz keratitis salgını bildirmişler ve 24 olgunun 16'sından *M. bovis* izole etmişlerdir. Daha önceki araştırmacıların sonuçlarına ilave olarak Faull ve Hawksley, *M. bovis*'in katalaz testinde pozitif reaksiyon verdiğini belirtmişlerdir. 1954 yılında Formston, Büyük Britanya'da 1952 ve 1953 yıllarında sığırlarda gerçekleşen 5 adet infeksiyöz keratitis salgınında etkenin *M. bovis* olduğunu ve hastalığın yaz aylarında, sıcak ve nemli havalarda geliştiğini bildirmiştir. 1956 yılında Holffman, Arjantin'de infeksiyöz keratitli sığırlardan *M. bovis* izole ettiğini ve elde ettiği izolatu göz içine verdiği 19 buzağının şiddetli olmasa da 12'sinde klinik tablo geliştiğini, hastalıklı sığırların gözlerindeki enfekte materyal ile hastalığı sağlıklı buzağulara bulaştırdığını bildirmiştir. 1956 yılında Ahmet ve Rao tarafından, Hindistan'ın Parbhani

İlçesinde sığır ve bufalo sürülerini etkileyen infeksiyöz keratitis salgınında 134 olguda *M. bovis* izole edilmiştir. 1957 yılında Hindistanda Seth ve Chandrasekariah, IBK üzerine *M. bovis*'in morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özelliklerini, deney hayvanlarındaki ve sığırlardaki patojeniesini açıklayan çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalardaki sonuçlar öncekilere benzemesine rağmen bu çalışmalarda Formston'unkinden farklı olarak *M. bovis*'in katalaz testlerinde negatif sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Onlar saf kültürlerde ürettikleri *M. bovis* ile 2 buzağının gözlerinde hastalık oluşturmuşlardır. Sıvı kültürlerin intravenöz olarak verilmesi sonrasında 3-5 gün içerisinde ölen farelerin, kan, kalp ve dalağında tekrar izole edilen virüent kültürlerin, tavşanların gözüne damlatılarak enfeksiyon oluşturma çalışmalarında başarılı olamamışlardır. Tavşan ve kobaylara uygulanan intraokuler enjeksiyonlardan sonra 24 saatten az bir zamanda göz kapaklarında şişme ve konjunktivitis şekillendiğini, 48 saat sonra kornea etrafında enfeksiyon geliştiğini, 5 gün sonunda ise kornada enfeksiyon oluşmadığını gözlemlemişlerdir. Enfeksiyondan 20 gün sonra tüp aglütünasyon testi ile serum antikor titresini 1:320 olarak ölçmüşlerdir. 1960 yılında Henson ve Grumbles, yaptıkları bir çalışmada, 15 sürüde infeksiyöz keratokonjunktivitisli 73 sığırın 66'sının (% 90) göz yaşlarından, 3 tanesinin de burun akıntısında *M. bovis* izole etmişlerdir. Elde ettikleri izolatlardan 59 buzağının 43'ünde 3 ayrı yöntemle deneysel olarak IBK geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Embiryolu tavuk yumurtalarında ve sıvı ortamlarda ürettikleri canlı organizmaları agarda çoğaltarak tavuk embiriyosu, tavşan, fare ve kobay gibi deney hayvanlarına intravenöz, intraperitoneal, intraserebral, intradermal ve intraoküler yollarla enjekte etmişlerdir. Canlı kültürlerden intradermal ve intraoküler yollarla enjekte ettiklerinde dermonekrozis ve oftalmis, intravenöz, intraperitoneal ve intraserebral yollarla enjekte ettiklerinde ölümler meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Henson ve Grumbles ayrıca *M. bovis*'in hemolitik ve dermonekrotik olmak üzere 2 tip toksin ürettiğini keşfetmişlerdir. 1961 yılında Adinarayanan ve Singh, IBK'li klinik vakalardan, Bergey'in 1957 de el kitabında tanımladığı *M. bovis*'e benzeyen 40 suş izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar bazı hayvanların sağlıklı oldukları halde portör olduklarını tespit etmişler ve saf kültür kullanarak buzağılarda hastalık oluşturmayı başarmışlardır. 1965 yılında Nijerya ve Batı Afrikada, hem Griffin ve arkadaşları, hem de Gleeson, sığırlarda infeksiyöz keratokonjunktivit salgını bildirmişlerdir. Bunların çalışmalarında hemolitik ve hemolitik olmayan diplobasiller izole edildi ve hemolitik olan diplobasillerin *M. bovis* olduğu tespit edilmiştir. Tavşan, kobay ve farelerde hastalık oluşturmayı başaramamışlardır. 1965 yılında Hughes ve arkadaşları, ultraviyole ışığın IBK oluşumundaki rolünü araştırmak için deneysel bir çalışma yapmışlardır.

M. bovis inokulasyonu ile birlikte gün boyunca ultraviyole ışık yayan civalı güneş lambasına maruz bıraktıkları sığırlarda oluşturdukları infeksiyöz keratitin, doğadaki salgınlarda görülen vakalardakilerinden farksız olduğunu görmüşler ve güneşin yaydığı ultraviyole ışınının hastalığı artırıcı etkisi olduğu fikrine sahip olmuşlardır. 1968 yılında Pugh ve arkadaşları, yaptıkları deneysel çalışmaların sonuçlarını yayınladılar. Konjunktivalarına *M. bovis* homojenizatı damlattıkları koyun, tavşan, sıçan, kobay ve farelerden, fare ve koyunların gözlerine organizmanın yerleştiğini, diğerlerinde ise bulunmadığını görmüşlerdir. *M. bovis* ile infekte farelerde sığırlardakine benzeyen ağır şekilde keratit ve konjunktivit oluştuğunu, koyunlarda ise bakterinin hastalığa sebebiyet vermediğini gözlemlemişlerdir. 1968 yılında Hughes ve Pugh, *M. bovis*'in virulans faktörlerinin hemolizin ve pili olduğunu, 1970 yılında da IBK'nın geçici körlüğe neden olduğunu bildirmişlerdir. 1972 yılında Pedersen ve arkadaşları da *M. bovis*'in virulans faktörlerini hemolizin ve pili olarak bildirmişlerdir (Ruehl ve ark, 1993; Angelos ve ark, 2014). Brezilya, Arjantin ve Uruguay'da 1974 ve 2001 yılları arasında sığırlarda göz lezyonlarından 30 adet suş izole edildiği bildirilmiştir (Conceição ve ark, 2004).

Ülkemizde ise Erdeğer ve ark (1991)'nin yapmış olduğu çalışmada İBK şüpheli 168 sığırdan sağlamış olduğu 208 materyalin 41'inden, Çetin ve ark İBK semptomlu 92 sığırın 9'undan, sığırların hastalıklı gözlerinden almış oldukları 107 örnekten 11'inden, Samsar ve ark (1993) ise İBK semptomlu 51 sığırın tümünden *M. bovis* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Gökçe ve ark (2002) ise Kars ili ve çevresinde yapılan çalışmada İsviçre esmeri ırkı hayvanlarda meydana gelen İBK salgınlarından 30 adet *M. bovis* izolasyonu elde edildiğini bildirmişlerdir. Erzurum ili ve Merkez köylerinde İBK şüpheli 145 sığırın 26'sından (%17,9) *M. bovis* izole edildiği rapor edilmiştir (Işık, 2008). Çalışmamızda elde edilen % 12.5 oranında izolasyon değeri, geçmiş bulgularla uygunluk göstermiştir.

Araştırmada *M. bovis* %7 koyun kanlı agar'da 22'si hemolitik (%75,8), identifiye edilen suşların ve 7'si (%24,2) nonhemolitik tip koloni oluşturmuştur. İzolasyonda görülen bu koloni formlarının literatür verilerine uygun olduğu görülmektedir (Işık ve ark, 2008; Angelos, 2014).

İzole edilen suşların tümünün oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitif bulundu. Araştırmacılar *M. bovis*'in oksidaz reaksiyonunun pozitif olmasının değişmez bir özellik olduğunu bildirmektedirler. Katalaz testi bazı araştırmacılara göre negatif, bazı araştırmacılara göre pozitifdir, bazı araştırmacılarda hem negatif, hem de pozitif suşlar tespit etmişlerdir. Bununda muhtemelen coğrafik suş farklılıklarından kaynaklandığı ileri sürmekte olup

araştırmada elde edilen bulgular araştırmacıların bulgularıyla örtüşmektedir (Çetin ve ark, 1997).

İzole edilen suşların hiç biri MacConkey agar'da ürememiştir, MR-VP testi, glukoz, ksiloz, arabinoz, fuktoz, galaktoz, sukroz, laktoz, mannitol, dulsitol, inositol ve salisini fermente etme, indol, üreaz, hidrojen sülfür ve gaz oluşumu tüm suşlarda negatif bulunmuştur, elde edilen bu verilerin, yapılan çalışmalara uygun olduğu görülmektedir (Erdeğer ve ark, 1991; Işık ve ark, 2008).

Bu çalışmada nitrat redüksiyon testi izole edilen izole edilen suşların tümünde negatif bulundu, literatür verilerinde *M. bovis*'in nitrat redüksiyon özelliğinde kesin bir sınırlamasının olmadığı bildirilmekle birlikte kullanılan yöntem veya suş farklılığının rol oynadığı tahmin edilmektedir (Whittier, 2007).

M. bovis'lerin nutrient jelatin içeren besi yerine inokulasyondan sonra 37°C'de 1 gün inkube edilmiş ve inkubasyondan sonra izole edilen tüm suşların nutrient jelatini hidrolize ettiği görülmüştür. Bu bulguların tümü literatür verilerine uygunluk göstermektedir (Whittier, 2007; Işık, 2008).

Patojen *M. bovis*'lerin en önemli identifikasyon kriterlerinden biri de hemaglutinasyon, otoaglutinasyon özelliği ve MgCl₂'ün etkisiyle otoaglutinasyon ve hemaglutinasyon'un oluşmamasıdır. Hemaglutinasyon ve otoaglutinasyon veren suşlar patojen kabul edilmektedir. Bu çalışmada izole edilmiş olan 8 hemolitik suş hemaglutinasyon ve otoaglutinasyon testi yönünden pozitif bulunmuştur. Hemolitik *M. bovis* suşlarının tümü % 0.85'lik tuz süspansiyonunda otoaglutinasyon yaptı ve otoaglutinasyon pozitif suşların tümü aynı zamanda hemaglutinasyon pozitif, otoaglutinasyon pozitif suşlar % 10 MgCl₂ ilavesiyle bu özelliklerini kaybettikleri belirlendi. İki adet nonhemolitik suş ise hemaglutinasyon ve otoaglutinasyon testi yönünde negatif bulunmuştur. Bu bulgular araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir (Erdeğer, 1991; Çetin, 1997; Işık, 2008).

Araştırmada IBK'ya karşı sığırların ırk ve yaş duyarlılığıyla ilgili bulgular, yapılan çalışmalara uygunluk göstermekle birlikte (Erdeğer, 1991; Çetin, 1997; Işık, 2008), bu çalışmada 0-12 aylık hayvanlardaki izolasyon oranının düşük olduğu belirlenmiştir. Materyal olarak kullanılan 0-12 aylık hayvanlarda, izolasyon oranının düşük olmasının nedeninin özellikle Aydın ilinde genellikle 6 aylığa kadar olan buzağıların kapalı ahırlarda tutulmaları ve bunun sonucu olarak da gözlerin UV ışınları gibi predispozisyon yaratan bazı faktörlere maruz kalmamalarından kaynaklandığı düşünölmektedir.

Hatay yöresindeki sığırlarda rastlanan göz hastalıklarının insidansının araştırıldığı bir çalışmada saptanan göz problemlerinden % 12'sinin IBK olduğu bildirilmiştir (İşler ve ark 2008). Söz konusu çalışmada göz hastalıkları mevsimsel faktör açısından karşılaştırıldığında hastalık oranının ilkbahar mevsiminde en yüksek (% 39.33) ve bunu yaz (% 26.88), sonbahar (%21.84) ve kış (%11.95) mevsiminin takip ettiği saptanmıştır. Çalışmamızda da bu bulgulara benzer olarak *M. bovis* izolatları ilkbahar ve yaz aylarında toplanan numunelerden identifiye edilmiştir.

M. bovis'in antibiyotiklere duyarlılığı birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda *M. bovis*'in ampisilin, basitrasin, gentamisin, kanamisin, nitrofurazon, oksitetrasiklin, penisilin G ve polimiksin B, sefalosporin, trimetoprim-sulfonamide duyarlı olduklarını, streptomisin, linkomisin, eritromisin ve tilozin etkisinin ise oldukça düşük olduğunu bildirmektedirler (Samsar, 1993; Whittier, 2007; Angelos, 2015). Çalışmada izole edilen 10 adet *M. bovis* suşunun antibiyotiklere duyarlılığı disk diffüzyon yöntemine uygun olarak incelenmiştir. İzole edilen suşların sefoperazon, amoksisilin klavulanik asit, florfenikole duyarlı oldukları eritromisin, klaritromisinin ise *in vitro* olarak çok etkili olmadıkları belirlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnfeksiyöz bovine keratokonjunktivitis hastalığında tedavi geciktirildiğinde, kornea skarlanması görme azalması, göz küresinin kopması ve kalıcı körlük meydana gelebilmektedir. Klinik bulgularda sürü bazında artış gözleendiğinde, hastalığın tedavisi ve kontrol programının tekrar gözden geçirilmesi gereklidir. Daha önce uygulanmış belirli bir antibiyotik tedavisi çalışmıyor görünüyorsa, bakteri kültürü ve antibiyogram testi için konjunktival numunelerin toplanması gerekmektedir. Örnekler, tedavi edilmemiş erken vakalarla birlikte diğer sağlıklı görülen hayvanlardan da toplanmalıdır. Etkilenen hayvanların birçoğundan mümkün olduğu kadar çok örnek alınması, ideal oran olarak sağlıklı görünen hayvanlardan ise % 20 oranında örnek alınması önerilmektedir. Toplanan numunelerden etkenin bakteriyolojik identifikasyonu için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarıyla temasa geçmek maliyet açısından tasarruf sağlamaktadır.

Başarılı bir tedavi ile İBK hastalığından etkilenen hayvanlar genellikle göz kapaklarını açık tutma kabiliyeti kazanmış olarak daha rahat görürler, refah seviyesi ile birlikte verim düzeyinde iyileşmeler de sağlanmış olur. Olası salgın durumlarında, tedavi başarısızlıkları için erken önlem alınması önemlidir. Sürü bazında dezenfeksiyon prosedürlerine harfiyen uyulması, hasta veya semptomları subklinik seyreden şüpheli hayvanların hemen izole edilmesi gerekmektedir. Korunmada İBK'nın tipik olarak bir sürüde görüldüğü dönemlerde zamanında aşılamanın önemini vurgulamak gerekmektedir. Herhangi bir sürü ortamında, İBK yalnızca bireysel bir hayvan problemi değildir.

Bu çalışmada *M. bovis*'in izolasyon oranının % 12.5 olmasına rağmen, bu oranın dikkate alınması gerekmektedir. Özellikle İBK'nın sığır yetiştiriciliğine vermiş olduğu ekonomik kaybın belirlenmesi gerekmektedir. Hastalık çıkan sürülerde hayvanların hastalıktan korunması için mevsime bağlı olarak gerekli önlemlerin alınması, hastalığın erken dönemde tedavi edilerek tedavide etkin antibiyotiklerin kullanımının sağlanmasıyla ekonomik kayıpların azaltılabileceği, hastalıklar için olası risk faktörlerinin (sinekler, yabancı cisimler, bitki çimleri, toz, diğer bakteriyel, viral ve mikotik infeksiyonlar) azaltılması da dahil olmak üzere, İBK kontrolü ve önlemesi tüm yönleriyle üreticilere aktarılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Alexander D.** Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2010, 26, 487-503.
- Angelos JA, Lane VM, Ball LM, Hess JF.** Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Research Communications* 2001, 34, 229-239.
- Angelos JA, Hess JF, George LW.** An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Veterinary Microbiology* 2003, 92, 363-377.
- Angelos JA, Bonifacio RG, Ball LM, Hess JF.** Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* pilin–*Moraxella bovis* cytotoxin–ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Veterinary Microbiology* 2007a, 125, 274-283.
- Angelos JA, Ball LM, Hess JF.** Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Veterinary Microbiology* 2007b, 125, 73-79.
- Angelos JA.** *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Cause or Coincidence? *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2010, 26, 73-78.
- Angelos JA, Gohary KG, Ball LM, Hess JF.** Randomized controlled field trial to assess efficacy of a *Moraxella bovis* pilin-cytotoxin–*Moraxella bovoculi* cytotoxin subunit vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research* 2012, 73, 1670-1675.
- Angelos JA, Edman JM, Chiquerwe T.** Ocular Immune Responses in Steers following Intranasal Vaccination with Recombinant *Moraxella bovis* Cytotoxin Adjuvanted with Polyacrylic Acid. *Clinical and Vaccine Immunology* 2014, 21, 181-187.
- Arda M.** Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınları, Ankara, 2000, 3-87.
- Bilgehan H.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Seçkin Yayınları, Ankara, 2009, 7-92.
- Brown MH, Brightman AH, Fenwick BW, Rider MA.** Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1998, 4, 259-266.
- Cerny HE, Rogers DG, Gray JT, Smith DR, Hinkley S.** Effects of *Moraxella (Branhamella) ovis* Culture Filtrates on Bovine Erythrocytes, Peripheral Mononuclear Cells, and Corneal Epithelial Cells. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44, 772-776.

- Conceição F, Bertoncelli DM, Storch OB, Paolicchi F, Cobo AL, Gil-Turnes C.** Antibiotic susceptibility of *Moraxella bovis* recovered from outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil and Uruguay between 1974 and 2001. *Brazilian Journal of Microbiology* 2004, 35, 364-366.
- Çetinkaya E, Ayhan K.** Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Science and Engineering Journal* 2012, 2, 53-62.
- De Castro C, Grice ID, Daal M, Daal T, Peak IR, Molinara A, Wilson JC.** Elucidation of the structure of the oligosaccharide from wild type *Moraxella bovis* Epp63 lipooligosaccharide. *Carbohydrate Research* 2014, 388, 81-86.
- Di Girolamo FA, Sabatini DJ, Fasan RA, Echegoyen M, Vela M, Pereira CA, Maure P.** Evaluation of cytokines as adjuvants of infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012, 145, 563-566.
- Erdeğer J, Akan M, Diker KS.** *Moraxella bovis*'in tüm hücre proteinlerinin elektroforetik analizi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1996, 43, 61-63.
- Erdeğer J, Aydın N, Ertürk A.** *Moraxella bovis*'in adherens özelliklerinin hücre kültürlerinde incelenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1995, 42, 547-551.
- Erdeğer J, Aydın N.** Sığırlarda izole edilen *Moraxella bovis* suşlarının çeşitli özelliklerinin araştırılması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 1991, 15, 140-147.
- Farias LDA, Maboni G, Matter LB, Scherer CFC, Libardoni F, Vargas AC.** Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3' region of rtxA gene from geographically diverse strains of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Veterinary Microbiology* 2015, 178, 283-287.
- Funk L, O'Connor AM, Maroney M, Engelken T, Cooper VL, Kinyon J, Plummer P.** A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. *Vaccine* 2009, 27, 4585-4590.
- Furmanek-Blaszczak B, Kurpiewska N, Boratynski R, Sektaş M.** Molecular Characterization of Plasmid pMbo4.6 of *Moraxella bovis* ATCC 10900. *Current Microbiology* 2013, 66, 205-213.
- George LW, Borrowman AJ, Angelos JA.** Effectiveness of a cytolysin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research* 2005, 66, 136-142.

- Gökçe I, Çitil M, Genç O, Erdoğan HM.** A comparison of the efficacy of florfenicol and oxytetracycline in the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Irish Veterinary Journal* 2002, 55(11), 573-578.
- Işık N.** İnfeksiyöz Bovine Keratokonjunktivitisi Sığırlarda *Moraxella bovis*'in İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılığının Araştırılması. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008, 1, 17-22.
- İşler T, Bulut S, Kılıç S.** Hatay Bölgesinde Yetiştirilen Sığırlarda Karşılaşılan Göz Problemlerinin İnsidanslarının Araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2008, 22(5), 255-259.
- Jacinta LF, Richard AS, Peter AH, Wojtek PM, Michalski Jan MT.** Molecular Characterization of a Secreted Enzyme with Phospholipase B Activity from *Moraxella bovis*. *Journal of Bacteriology* 2001, 183, 6717-6720.
- Karatuna O ve Yağcı A.** *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2008, 38, 42-51.
- Krieg NR, Garrity GM, Brenner DJ, Staley JT.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer Publication, New York, 2005, 97-113.
- Lepper AW, Moore LJ, Atwell JL, Tennent JM.** The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology* 1992, 32, 177-187.
- Lepper AW, Elleman TC, Hoyne PA, Lehrbach PR, Atwell JL, Schwartzkoff CL, Egerton JR, Tennent JM.** A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology* 1993, 36, 175-183.
- Luke NR, Amy J, Howlett JA, Shao J, Campagnari AA.** Expression of Type IV Pili by *Moraxella catarrhalis* is Essential for Natural Competence and is Affected by Iron Limitation. *Infection and Immunity* 2004, 72, 6262-6270.
- Mattick JS.** Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology* 2002, 56, 289-314.
- McConel CS, Shum L, Gleeson BL, House JK.** Serologic cross-reactivity of Australian *Moraxella bovis* to vaccinal bacterin strains as determined by competitive ELISA. *Australian Veterinary Journal* 2008, 86, 124-129.

- O'Connor AM, Brace S, Gould S, Dewell R, Engelken T.** A randomized clinical trial evaluating a farm-of-origin autogenous *Moraxella bovis* vaccine to control infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye) in beef cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011, 25, 1447-1453.
- Otter A, Twomey DF, Rowe NS, Tipp JW, McElligott WS, Griffiths PC.** Suspected chlamydial keratoconjunctivitis in British cattle. *Veterinary Record* 2003, 152(25), 787-788.
- Postma GC, Carfagnini JC, Minatel L.** *Moraxella* pathogenicity: an update. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2008, 31, 449-458.
- Prieto C, Serra DO, Martina P, Jakobs M, Bosch A, Yantorno OM.** Evaluation of biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the primary causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology* 2013, 166, 504-515.
- Prieto CI, Aguilar OM, Yantorno OM.** Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. *Veterinary Microbiology* 1999, 70, 213-223.
- Ruehl WW, Marrs C, Beard MK, Shokookj V, Hinojoza JR, Banks S, Bieber D, Mattick JS.** Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas in vitro. *Molecular Microbiology* 1993, 7(2), 285-288.
- Samsar E, Akın F, Bilir B.** Sığırların İnfeksiyöz Keratokonjunktivitisinde subkonjunktival antibiyotik ve alfakimotripsin uygulamaları. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1993, 40(4), 453-471.
- Sosa V ve Zunino P.** Diversity of *Moraxella spp.* strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. *Journal of Infection in Developing Countries* 2013, 7, 819-824.
- Whittier DW.** Treatment of Pinkeye in Cattle. Virginia Tech, 2007, 4-9.
- Yurdakök K ve İnce T.** Aşı adjuvanları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2008, 51, 225-239.
- Zbrun MV, Zielinski GC, Piscitelli HC, Descarga C, Urbani LA, Defain Tesoriero MV, Hermida L.** Evaluation of anti-*Moraxella bovis* pili immunoglobulin-A in tears following intranasal vaccination of cattle. *Research in Veterinary Science* 2012, 93, 183-189.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : GÜMÜŞ, Sezar
Uyruk : T.C
Doğum yeri ve tarihi : Konya/ 17.07.1970
Telefon : 05324166517
E-mail : vetsezar@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Selçuk Üniversitesi	1995

İŞ DENEYİMİ

1998-2002	İE Veteriner İlaç Sanayi A.Ş	Satış Sorumlusu
2002-2006	Tüm Ekip İlaç Sanayi A. Ş	Satış Sorumlusu
2006-	Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı	Veteriner Hekim

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

xxx

2. PROJELER

xxx

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx