

**T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**KEDİ VE KÖPEKLERDE HEMOTROPİK MİKOPLAZMA
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARININ
ARAŞTIRILMASI**

HAFİZE TUĞBA YÜKSEL

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. ŞÜKRÜ KIRKAN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Birimi tarafından
14044 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2019

KABUL ve ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Hafize Tuğba YÜKSEL tarafından hazırlanan “Kedi ve Köpeklerde Hemotropik Mikoplazma Türlerinin Moleküler Karakterizasyonlarının Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/06/2019

Üye (T.D.) :	Prof. Dr. Şükrü KIRKAN	ADÜ
Üye :	Prof. Dr. Mehmet AKAN	AÜ
Üye :	Prof. Dr. Serkan İKİZ	İÜ- Cerrahpaşa
Üye :	Prof. Dr. Cavit KUM	ADÜ
Üye :	Prof. Dr. Serap SAVAŞAN	ADÜ

ONAY:

Bu tez Aydın 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. Cavit KUM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, birlikte çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, göreve ilk başladığım günden itibaren desteklerini her zaman arkamda hissettiğim, karamsarlığa düştüğüm zamanlarda bana ışık olan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın kıymetli Öğretim Üyeleri Prof. Dr. K. Serdar DİKER'e, Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, Prof. Dr. Serap SAVAŞAN'a, Doç. Dr. Göksel ERBAŞ'a, Doç. Dr. Uğur PARIN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans, Doktora öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayata başlamamda en büyük destek olan canım babam Semih YÜKSEL'e, beni her durumda iyileştiren canım annem Alime YÜKSEL'e, bu hayatta hiç yalnız kalmayacağımı bana öğreten canım kardeşim Recep Yunus YÜKSEL'e, doktora sürecimin her evresinde sabır ve anlayışla yanımda olan Oğuzhan DOLGUN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Etiyoloji.....	3
2.2.Patogenezis.....	11
2.3.Klinik Bulgular.....	15
2.4.Risk Faktörleri ve Bulaşma Yolları.....	20
2.5.Halk Sağlığına Etkileri.....	25
2.6.Teşhis.....	26
2.6.1. Sitolojik Muayene.....	27
2.6.2. Serolojik Tanı.....	29
2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	30
2.7.Tedavi.....	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	39
3.1. Gereç.....	39
3.1.1. Örnekleme	39
3.1.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Ayıraçlar.....	40
3.1.2.1. Giemsa boya.....	40
3.1.2.2. Hemogram solüsyonları.....	40
3.1.2.3. 50X TAE (Tris, Asetik Asit, EDTA) Elektroforez Solüsyonu.....	40
3.1.2.4. 6X DNA loading dye.....	40
3.1.2.5. Tris/EDTA (TE) buffer.....	40
3.1.3. PCR	41

3.1.3.1. DNA ekstraksiyon kiti	41
3.1.3.2. ExPrime taq premix	41
3.1.3.3. Primerler	41
3.1.3.4. Agaroz Jel	42
3.1.3.5. Marker	42
3.1 3.6. Etidium bromür	42
3.1.3.7. PCR ürünü saflaştırılması	42
3.1.3.8. Sekans PCR ürünü saflaştırılması	43
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	43
3.1.4.1. QuickGene-Mini80 cihazı	43
3.1.4.2. Santrifüj cihazı	43
3.1.4.3. Termal döngüleme cihazı	43
3.1.4.4. Elektroforez cihazı	43
3.1.4.5. Görüntüleme cihazı	43
3.1.4.6. Saflaştırılmış PCR ürünü ölçüm cihazı	43
3.1.4.7. DNA sekans cihazı	43
3.2. Yöntem	44
3.2.1. Örnekleme	44
3.2.2. Giemsa Boyama	44
3.2.3. Hemogram	44
3.2.4. DNA Ekstraksiyonu	44
3.2.5. DNA Ekstraksiyon Kiti Prosedürü	45
3.2.5.1. Solüsyonların hazırlanması	45
3.2.5.2. Lizat hazırlama protokolü	45
3.2.5.3. QG-Mini80 ekstraksiyon protokolü	46
3.2.5.4. Ekstraksiyon işlemi	47
3.2.6. PCR	48
3.2.7. PCR Ürünlerinin Elektroforez Tankına Yüklenmesi.....	53
3.2.8. Jelde Yürütme.....	53
3.2.9. Görüntüleme ve Değerlendirme	53
3.2.10. PCR Ürün Saflaştırılması	53
3.2.11. Sekans PCR	54
3.2.11.1. Sekans PCR ürünlerinin saflaştırma protokolü	55

3.2.12. DNA Sekanslama	56
4. BULGULAR	57
4.1. Giemsa Boyama Bulguları	57
4.2. Hemogram Bulguları	57
4.3. PCR Bulguları	67
4.3.1. Köpek Hemotropik Mikoplazma 16S rRNA PCR Bulguları	67
4.3.2. Köpek Hemotropik Mikoplazma <i>RNAse P</i> Geni PCR Bulguları	69
4.3.3. Kedi Hemotropik Mikoplazma 16S rRNA PCR Bulguları.....	70
4.3.4. <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> 16S rRNA PCR Bulguları	70
4.4. Sekans Bulguları	70
5. TARTIŞMA	79
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	104

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
®	: Tescilli Marka
°C	: Santigrat Derece
A	: Amper
ALT	: <i>Alanin Aminotransferaz</i>
AST	: <i>Aspartat Aminotransferaz</i>
bp	: Baz Çifti
cPCR	: Konvansiyonel PCR
dk	: Dakika
dl	: Desilitre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FeLV	: Feline Leukemia Virus
FIV	: Feline Immunodeficiency Virus
fl	: Femtolitre
g	: Gram
HCT	: Hematokrit
HGB	: Hemoglobin
kg	: Kilogram
l	: Litre
MCH	: Ortalama Korpusküler Hemoglobin
MCHC	: Ortalama Korpusküler Hemoglobin Konsatrasyonu
MCV	: Ortalama Korpusküler Hacim
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
PCV	: Hematokrit
pg	: Pikogram
PLT	: Trombosit
pmol	: Pikomol

qPCR : Kantitatif PCR
RBC : Kırmızı Kan Hücresi
rRNA : Ribozomal Ribonükleik Asit
S : Svedberg Birimi
sn : Saniye
UV : Ultraviyole Işık
V : Volt
WBC : Beyaz Kan Hücresi
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
µm : Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Köpek ve kedi örneklerine ait yaş ve cinsiyet veriler.....	39
Şekil 2.	Lizat hazırlama şeması	46
Şekil 3.	Genomik DNA ekstraksiyon şeması	48
Şekil 4.	PCR ürünü saflaştırma aşamaları	54
Şekil 5.	Köpek hemogram sonuçlarına göre anemi bulgularının yaş ve cinsiyete göre dağılımı	62
Şekil 6.	Köpek hemogram sonuçlarına göre anemi bulgularının yaş ve cinsiyete göre dağılımı	67
Şekil 7.	Köpek hemotropik mikoplazma 16S rRNA PCR pozitif örneklerin cinsiyet ve yaş aralıklarına göre dağılımı	69
Şekil 8.	Köpek hemotropik mikoplazma 16S rRNA pozitif örneklerin sekans sonuçları	71
Şekil 9.	Sanger sekans ile tiplendirilmiş köpek hemotropik mikoplazma örneklerinin cinsiyet ve yaş aralıklarına göre dağılımı	72
Şekil 10.	<i>M. haemocanis</i> sekans homoloji yüzdeleri	76
Şekil 11.	<i>Candidatus M. haematoparvum</i> sekans homoloji yüzdeleri	77
Şekil 12.	<i>Candidatus M. haemominutum</i> sekans homoloji yüzdeleri	77
Şekil 13.	<i>M. wenyonii</i> sekans homoloji yüzdeleri	78
Şekil 14.	Sekans ile tiplendirilen örneklerin anemi verileri	78

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1.** Köpek hemotropik mikoplazma 16S rRNA PCR elektroforez görüntüsü 68
- Resim 2.** Köpek hemotropik mikoplazma *RNAse P* geni PCR elektroforez görüntüsü 69

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	<i>Mycoplasma haemocanis</i> taksonomisi.....	5
Tablo 2.	<i>Mycoplasma haemocanis</i> 'in günümüze kadar olan adlandırılmaları.....	5
Tablo 3.	<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> taksonomisi.....	5
Tablo 4.	<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> 'un günümüze kadar olan adlandırılmaları.....	5
Tablo 5.	<i>Mycoplasma haemofelis</i> 'in taksonomisi.....	8
Tablo 6.	<i>Mycoplasma haemofelis</i> 'in günümüze kadar olan isim değişiklikleri.....	8
Tablo 7.	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> taksonomisi.....	8
Tablo8.	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> 'un günümüze kadar olan isimlendirmesi.....	8
Tablo 9.	<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> taksonomisi.....	8
Tablo 10.	<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> 'in günümüze kadar olan isimlendirmesi.....	8
Tablo 11.	Hemoplazma ile karışabilen hastalıklar.....	26
Tablo 12.	Köpek ve kedilerde hemoplazmozis tanısı için kullanılabilen testler.....	27
Tablo 13.	Köpek ve kedi örneklerine ait yaş ve cinsiyet verileri.....	39
Tablo 14.	Köpek hemotropik mikoplazma cinsi için <i>16S rRNA</i> gen primerleri.....	41
Tablo 15.	Köpek hemotropik mikoplazma cinsi için <i>RNAse P</i> gen primerleri.....	41
Tablo 16.	Kedi hemotropik mikoplazma cinsi için <i>16S rRNA</i> gen primerleri.....	42
Tablo 17.	<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> için <i>16S rRNA</i> gen primerleri.....	42
Tablo 18.	Köpek hemotropik mikoplazma cinsi için <i>16S rRNA</i> PCR karışım oranları	49
Tablo 19.	Köpek hemotropik mikoplazma cinsi için <i>16S rRNA</i> geni ısıl döngü ve süre diagramı.....	49
Tablo 20.	Köpek hemotropik mikoplazma cinsi için <i>RNAse P</i> geni PCR karışım oranları.....	50
Tablo 21.	Köpek hemotropik mikoplazma cinsi <i>RNAse P</i> geni için ısıl döngü ve süre diagramı.....	50
Tablo 22.	Kedi hemotropik mikoplazma 16S rRNA PCR karışım oranları.....	51
Tablo 23.	Kedi hemotropik mikoplazma 16S rRNA PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diagramı.....	51
Tablo 24.	<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> 16S rRNA PCR karışım oranları.....	52

Tablo 25.	<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> için 16S rRNA PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	52
Tablo 26.	ExoSAP işlemine ait ısıl döngü ve süre diagramı.....	54
Tablo 27.	Sekans PCR karışım oranları.....	55
Tablo 28.	Sekans PCR'ına ait ısıl döngü ve süre diagramı.....	55
Tablo 29.	Köpek tam kan örneklerinin hemogram sonuçları.....	58
Tablo 30.	Köpek hemogram sonuçlarına göre anemi bulgularının yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	62
Tablo 31.	Kedi tam kan örneklerinin hemogram sonuçları.....	63
Tablo 32.	Kedi hemogram sonuçlarına göre anemi bulgularının yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	67
Tablo 33.	Köpek hemotropik mikoplazma 16S rRNA PCR pozitif örneklerin cinsiyet ve yaş aralıklarına göre dağılımı.....	68
Tablo 34.	Köpek hemotropik mikoplazma 16S rRNA PCR pozitif örneklerin sekans sonuçları.....	71
Tablo 35.	Köpek hemotropik mikoplazma Sekans ile tiplendirilmiş örneklerin cinsiyet ve yaş aralıklarına göre dağılımı.....	72
Tablo 36.	Köpek hemotropik mikoplazma genel sonuçları.....	73

ÖZET

KEDİ VE KÖPEKLERDE HEMOTROPİK MİKOPLAZMA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Yüksel H.T. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Aydın, 2019.

Hemotropik mikoplazmalar, kültürleri yapılamayan, eritrosit tropizmi gösteren ve infekte konakçılarda değişen derecelerde hemolitik anemiye neden olan bakterilerdir. Hemotropik mikoplazma türlerinin klasik yöntemlerle identifikasyonları yapılamadığından dolayı moleküler yöntemlerle teşhisleri yapılmaktadır. Araştırmamızda kedi ve köpeklerde hemotropik mikoplazma varlığının ve karakterizasyonlarının moleküler teknikler kullanılarak yapılması amaçlanmıştır. Araştırmamızda kedi ve köpeklerden alınan 100'er tane tam kan örneklerinde hemotropik mikoplazma etkenlerinin varlığı PCR ile incelenmiştir. Köpek örneklerinin 66 (% 66)'sında hemotropik *Mycoplasma* sp. varlığı ortaya çıkarılırken, kedi örneklerinde ise hemotropik *Mycoplasma* sp. varlığına rastlanmamıştır. Köpek hemotropik *Mycoplasma* sp. izolatlarının Sanger sekans ile yapılan tiplendirmeleri sonucunda, 66 örneğin 6 (% 9,0)'sı *Mycoplasma haemocanis*; 5 (% 7,6)'i *Candidatus Mycoplasma hematoparvum*; 1 (% 1,5)'i *Candidatus Mycoplasma haemominutum*; 34 (%51,5)'ü *Mycoplasma wenyonii* olarak tiplendirilmiş ve 20 (% 30,4) örnekte ise tiplendirme yapılamamıştır. Sekans sonucu *Mycoplasma haemocanis* identifiye edilen hayvanların 5 (% 83,0)'inde, *Candidatus Mycoplasma hematoparvum* identifiye edilen hayvanların 3 (% 60,0)'ünde, *Mycoplasma wenyonii* identifiye edilen hayvanların 20 (% 59,0)'sinde anemi tablosu bulunduğu tespit edilirken, 18 adet *M. wenyonii* izolatu saptandığı hayvanlarda (% 27,2) ise anemi tablosu olmadığı belirlenmiştir. Araştırmamızın sonucunda, anemili/anemisiz köpek tam kan örneklerinde hemotropik mikoplazma türlerinin varlığı ve tiplendirmeleri moleküler yöntemler kullanılarak yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Anemi, hemotropik mikoplazma, kedi, köpek, PCR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HAEMOTROPIC *MYCOPLASMA* SPECIES IN CATS AND DOGS

**Yüksel H.T. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences,
Microbiology Department, PhD Thesis, Aydın, 2019.**

Hemotropic mycoplasmas are bacteria that cannot be cultured, show erythrocyte tropism and cause varying degrees of hemolytic anemia in infected hosts. Hemotropic mycoplasma species are diagnosed by molecular methods since they can not be identified by conventional methods. In our study, the presence and characterization of hemotropic mycoplasma in cats and dogs was aimed by using molecular techniques. In our study, the presence of hemotropic mycoplasma agents in 100 whole blood samples taken from cats and dogs was investigated by PCR. In 66 (66%) of the dog samples, hemotropic *Mycoplasma* sp. while there was not any hemotropic *Mycoplasma* sp. identification in cat samples. As a result of typing the isolates with the Sanger sequencing, 6 (9 %) of the 66 samples were *Mycoplasma haemocanis*; 5 (7,6 %) of the samples were *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*; 1 (1,5 %) of sample was *Candidatus Mycoplasma haemominutum*; 34 (51,5 %) were typed as *Mycoplasma wenyonii* and 20 (30,4 %) were not found typeable by sequencing. A total of 5 (83,0%) *Mycoplasma haemocanis* positive dogs, 3 (60,0 %) *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* positive dogs and 20 (59,0 %) *Mycoplasma wenyonii* positive dogs developed anemia symptom. However, 18 (27,2 %) of dogs with *M. wenyonii* did not show anemia symptom. As a result of our study, the presence and typing of hemotropic mycoplasma species in dogs' whole blood samples with and without anemia was performed by using molecular methods.

Key words: Anemia, cat, dog, hemotropic mycoplasma, PCR