

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

**MASTİTİSLİ KEÇİLERDE *MYCOPLASMA AGALACTIAE*'NİN
BAKTERİYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

RAMAZAN ULUGANLIGİL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Uğur PARIN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17052 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2019

KABUL ve ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ramazan ULUGANLIGİL tarafından hazırlanan “Mastitisli Keçilerde *Mycoplasma agalactiae*’nın Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/08/2019

Üye	: Prof. Dr. Şükrü KIRKAN	Aydın Adnan Menderes Üniv.
Üye (T.D.)	: Doç. Dr. Uğur PARIN	Aydın Adnan Menderes Üniv.
Üye	: Dr. Öğr. Üy. Fulya OCAK	Manisa Celal Bayar Üniv.

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

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bana bilgi ve tecrübelerini özveriyle aktaran, yetişmemde büyük katkıları olduğuna inandığım değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Uğur PARIN ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine, Yüksek Lisans öğrenimim boyunca şahsıma destek veren PARIN Ailesine, değerli meslektaşlarım Cevdet Peker'e, Yasin PARLATIR'a, Taner SARIBAŐ'a, Erdemli İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü Hayvan Sağlığı ve Gıda-Yem Kontrol birimi çalışma arkadaşlarıma, küçükbaş keçi yetiŐtiriciliğı yapan sürü yöneticisi Mersin Erdemlili çiftçilerimize, tüm öğretim hayatım boyunca bana eğitim, ilham ve destek veren aileme, sevgili eşim BüŐra Nur ULUGANLIGİL'e ve çocuklarım Elif Zümra'ya, Ahmet Kerem'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Keçilerde Mikoplazma İnfeksiyonları.....	8
2.1.1. Salgın Keçi Ciğer Ağrısı (CCPP).....	8
2.1.1.1. Epidemiyoloji.....	8
2.1.1.2. Klinik belirtiler	8
2.1.1.3. Teşhis	9
2.1.1.4. Sağaltım	9
2.1.1.5. Koruma	9
2.1.2. Bulaşıcı Agalaksi	10
2.1.2.1. Etiyoloji	10
2.1.2.2. Epidemiyoloji	11
2.1.2.3. Patogenez	13
2.1.2.4. Klinik belirtiler	13
2.1.2.5. Teşhis	15
2.1.2.6. Sağaltım	17
2.1.2.7. Koruma	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Gereç	20
3.1.1. Besiyeri, Supplement ve Solusyonlar.....	21
3.1.1.1. Besiyeri	21
3.1.1.1.1. Mycoplasma agar base (Oxoid CM0401).....	21
3.1.1.1.1. Mycoplasma broth base (Oxoid CM0403).....	21

3.1.1.1.2. Mueller-Hinton agar (Oxoid® CM 129).....	21
3.1.1.1.3. Brain Heart Infusion broth (%20 Gliserinli) (Oxoid® CM 0225).....	22
3.1.1.1.4. Trypton soya broth (Oxoid® CM 129).....	22
3.1.1.2. Supplement	22
3.1.1.2.1. Mycoplasma supplement-G (Oxoid® SR0059).....	22
3.1.1.3. Solusyonlar	22
3.1.1.3.1. Glukoz solusyonu	22
3.1.1.3.2. Fenol red solusyonu.....	23
3.1.1.3.3. Arjinin solusyonu	23
3.1.1.3.4. Sodyum fenolftalein difosfat solusyonu	23
3.1.1.3.5. Tetrazolyum solusyonu.....	23
3.1.1.3.6. Digitonin solusyonu	23
3.1.1.3.7. Nisin solusyonu	23
3.1.1.3.8. Üre solusyonu	23
3.1.1.3.9. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8.0) Buffer.....	24
3.1.1.3.10. Jel loading buffer (6X)	24
3.1.1.3.11. Tris (1M)	24
3.1.1.3.12. TE Buffer (10 mM tris, 1mM EDTA)	24
3.1.1.3.13. ExPrime taq premix (2X) (GeNet Bio®)	25
3.1.4. DNA Ekstraksiyon Kiti	25
3.1.4.1. Thermo Scientific™ genomic DNA purification kit prosedürü	25
3.1.5. Primerler	25
3.1.6. Agaroz Jel	26
3.1.7. Marker	26
3.1.8. Ethidium Bromid	26
3.1.9. Standart Suşlar	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Örneklerin Toplanması	27
3.2.2. Bakteriyel İzolasyon	27
3.2.3. Bakteriyel İdentifikasyon	27
3.2.3.1. Digitonin sensitivitesi	27
3.2.3.2. Nisin sensitivitesi	28
3.2.3.3. Glikoz fermentasyonu.....	28

3.2.3.4. Arjinin hidrolizi	28
3.2.3.5. Fosfataz aktivitesi	28
3.2.3.6. Tetrazolyum redüksiyonu	28
3.2.3.7. Film ve spot oluşumu	29
3.2.3.8. Üre hidrolizi	29
3.2.4. Genotipik İdentifikasyon	29
3.2.4.1. <i>Mycoplasma</i> sp. 16S rRNA PCR aşaması.....	29
3.2.4.1. <i>Mycoplasma agalactiae</i> 16S rRNA PCR aşaması.....	30
4. BULGULAR	32
4.1. Fenotipik Bulgular	32
4.1.1. Digitonin Sensitivitesi	32
4.1.2. Nisin Sensitivitesi	33
4.1.3. Glikoz Fermentasyonu	33
4.1.4. Arjinin Hidrolizi	33
4.1.5. Fosfataz Aktivitesi	33
4.1.6. Tetrazolyum Redüksiyonu.....	34
4.1.7. Film ve Spot Oluşumu.....	34
4.1.8. Üre Hidrolizi.....	34
4.2. PCR Bulguları.....	34
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- ABD** : Amerika Birleşik Devletleri
AGD : Agar Jel Difüzyon
ATCC: American Type Culture Collection
bp : Baz Çifti
CARDS: Toplum Kökenli Respiratorik Distres Sendromu
CCCP: Caprine Contagious Pleuropneumonia
CO₂ : Karbondioksit
dk : Dakika
DNA : Deoksiribonükleik asit
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAT : Floresan Antikor Testi
g : Gram
IFAT : Immun Floresan Antikor Testi
IU : Internationat Unit
KF : Komplement Fikzasyon
LC : Large colony
MAM : *M. arthritidis* mitojen
MA-PCR : *Mycoplasma agalactiae*- PCR
ml : Mililitre
nm : Nanometre
OIE : Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH : Power of Hydrogen
PPLO : Pleuro Pneumonia Like Organism
rpm : Rates per minute
rRNA : Ribizomal Ribonükleik asit
sn : Saniye
TBE : Tris Borik asit EDTA
TCA : Trikarboksilik asit
™ : Ticari Marka

UV : Ultraviyole Işıık
% : Yüzde
® : Tescilli Marka
µl : Mikrolitre
°C : Santigrat Derece

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Mikoplazmaların sahanda yumurta görünümü.....	7
Resim 2.	Mikoplazmaların koloni morfolojileri.....	7
Resim 3.	<i>Mycoplasma</i> sp. izolatları jel elektroforez görüntüsü.....	35
Resim 4.	<i>Mycoplasma agalactiae</i> izolatları jel elektroforez görüntüsü.....	35

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	<i>Mollicutes</i> sınıfınının taksonomisi.....	5
Tablo 2.	Ruminantlardan izole edilen önemli <i>Mollicutes</i> türleri.....	7
Tablo 3.	Çiftliklerden alınan numunelerin dağılımı.....	20
Tablo 4.	<i>Mycoplasma</i> sp. ve <i>Mycoplasma agalactiae</i> primerleri.....	26
Tablo 5.	<i>Mycoplasma</i> sp. 16S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	29
Tablo 6.	<i>Mycoplasma agalactiae</i> 16S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	30
Tablo 7.	İzolatların biyokimyasal özellikleri.....	32
Tablo 8.	Etkenlerin çiftlik bazında dağılımı.....	36

ÖZET

MASTITİSLİ KEÇİLERDE *MYCOPLASMA AGALACTIAE*'NİN BAKTERİYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Uluganlıgil R. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

Araştırmamızda bulaşıcı agalaksi etkeninin, yetiştiriciliği yapılan keçi populasyonlarında bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırma materyalini oluşturan hayvanlar keçi yetiştiriciliği yapılan çiftliklerden ve işletmelerden temin edilmiştir. Toplam 118 adet mastitis şikâyeti olan kıl keçisinden 10 ml süt numunesi alınmıştır. Alınan sütler, soğuk zincirde Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına ulaştırıldıktan sonra *Mycoplasma* selektif besiyerlerine ekimler yapılmış, izole edilen kolonilerin makroskopik, mikroskopik, bakteriyolojik ve biyokimyasal testler ile değerlendirilmesi sonucunda 10 (%8) adet izolatin *Mycoplasma* sp. olarak identifikasyonu yapılmıştır. Bakteriyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle *Mycoplasma* sp. olarak identifiye edilen 10 adet izolat, moleküler yöntemlerle doğrulanması amacıyla öncelikle *Mycoplasma* sp. 16S rRNA PCR işlemine tabi tutulmuş ve tüm izolatların (%100) *Mycoplasma* sp. olduğu tespit edilmiştir. *Mycoplasma* sp. olarak cins bazında identifiye edilen 10 adet izolatin 7 (%70) adedi ise, *M. agalactiae* 16S rRNA spesifik PCR işlemi sonucunda *M. agalactiae* olarak tür bazında identifiye edilmiştir. Sonuç olarak 118 adet süt numunesinden 7 (%6) adet *M. agalactiae* tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bulaşıcı agalaksi, Kıl keçisi, *Mycoplasma agalactiae*, PCR, 16S rRNA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *MYCOPLASMA AGALACTIAE* FROM GOATS WITH MASTITIS BY BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

Ulughgil R. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Microbiology Dept, MSci Thesis, Aydın, 2019.

In our study, it was aimed to determine the causative agent of contagious agalaxia by bacteriological and molecular methods in goat populations. The animals used as research material, were obtained from goat farms and farms. A total of 10 ml milk samples were taken from 118 goats with mastitis. After the milk samples were transferred to Aydın Adnan Menderes University Department of Microbiology in cold chain, they were inoculated to *Mycoplasma* selective media for identification. A total 10 isolates identified as *Mycoplasma* sp. by bacteriological and biochemical methods were firstly subjected to *Mycoplasma* sp. 16S rRNA PCR for confirmation by molecular methods and all isolates (100%) were found to be *Mycoplasma* sp. A total of 7 (70%) isolates identified as genus *Mycoplasma* were identified as *M. agalactiae* by *M. agalactiae* 16S rRNA specific PCR. As a result, 7 (6%) *M. agalactiae* were determined from 118 milk samples.

Keywords: Contagious agalactiae, Hair goat, *Mycoplasma agalactiae*, PCR, 16S rRNA,