

1. GİRİŞ

Mollicutes sınıfındaki mikroorganizmalar hücre duvarından yoksundur ve hücreyi yalnızca üç katlı plazma membranı sarar. Bu sayede esnek yapıdadırlar ve türlerin çoğu 450 nm por çaplı filtrelerden kolayca geçebilir. Bunun yanında bazı türlere ait küçük hücreler 100 nm por büyüklüğüne sahip filtreleri de geçebilmektedir. Hücre duvarı bulunmaması ayrıca ileri derecede pleomorfik bireysel morfolojiye sahip olmalarına neden olmaktadır. Yine aynı nedenle penisilin gibi hücre duvar sentez inhibitörü antibiyotiklere dirençli; ozmotik şok, alkoller ve yüzey aktif maddelere duyarlıdırlar. Mollicutes türleri kendi kendine çoğalma yeteneğine sahip en küçük mikroorganizmalardır. Kokoid şekilden branşlı filamentöz ve sarmal filamentöz şekle kadar birçok görünümde olabilirler. Hücreler bazen zincir oluşturabilir. Kokoid şekilli olanlar çoğunlukla 200-400 nm çapındadır fakat 2000 nm boyutunda hücrelere de rastlanabilir. Gram negatif olarak kabul edilmelerine karşın genetik olarak Gram pozitif bakterilerle de ilişkilidirler. Filogenetik ağaçta Gram pozitif bakteriler içinde, fakat ayrı bir soy olarak yer alırlar (Krieg ve ark, 2010). Gram boyama yöntemiyle iyi boyanmazlar, Giemsa veya Castaneda yöntemleri ile boyanmaları gerekmektedir. Hücreler karanlık alan ve faz kontrast mikroskopunda incelenebilirler (Brown ve ark, 2007). İkiye bölünme ile çoğalırlar ve endospor oluşturmazlar. Bazı türler kapsüllüdür. Çoğu tür fakültatif anaerob olup az sayıda tür de aerob veya obligat anaerobtur. Bazı türler kayma hareketine, sarmal filamentöz morfolojiye sahip türler ise dönme ve kıvrılma hareketine sahiptir ancak çoğu tür hareketsizdir. Birkaç türde fimbria ve pilus bulunduğu bildirilmiştir (Krieg ve ark, 2010). Sıcaklığa, deterjanlara, kuruluğa ve genel olarak dezenfektanlara çok duyarlıdırlar (Quinn ve ark, 2011). Katı besiyerinde üreyen kolonilerin çapı genellikle 1 mm'den küçüktür. Üremekte olan koloniler besiyerinin içine doğru ilerleme eğilimindedir ve bu durum hemen hemen tüm türlerde gözlenen karakteristik sahanda yumurta görünümüne yol açar. Kültürü yapılabilen tüm türler hücre kültürüne gerek olmaksızın yapay besiyerlerinde üretilmektedir ancak sadece moleküler olarak karakterize edilip henüz kültürü yapılamamış türler de bulunmaktadır. Kültürü yapılabilen türlerden çoğu üremeleri için sterol ve yağ asitlerine ihtiyaç duyar. Steroller sitoplazmik membranın yapısı ve fonksiyonunda görev almaktadır (Krieg ve ark, 2010).

Mikoplazmalar hücre duvarı olmayan, bu nedenle ileri derecede pleomorfik bireysel morfolojiye sahip ve hücre duvar sentezini inhibe eden antibiyotiklere dirençli çok küçük prokaryotlardır. Çeşitli mikoplazma türleri insan, ruminantlar, domuz, kanatlılar ve yabani hayvanlarda önemli hastalıklara sebep olur. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün (OIE) 2014 yılı

bildirimi zorunlu hayvan hastalıkları listesinde 5 mikoplazma hastalığı ve bunlara yol açan 8 mikoplazma türü bulunmaktadır.

Mikoplazmalar peptidoglikan sentezi yapamayan, dolayısıyla hücre duvarı olmayan çok küçük prokaryotlardır. Mikoplazma cinsi, taksonomik olarak Mollicutes sınıfında yer alır (Krieg ve ark, 2010). Bu sınıfta bulunan türler çok küçük genomları, hücre duvarından yoksun oluşları, membran fonksiyonu ve üreme için kolesterole ihtiyaç duymaları, UGA kodonunu stop kodon yerine triptofan için kullanmaları, bakteri geçirmeyen filtrelerden geçebilmeleri, barınma ve beslenme ihtiyaçları için konaklarına sıkı sıkıya bağımlı oluşları nedeniyle kendi kendine çoğalan bakteriler arasında en alışılmadık grubu oluşturmaktadırlar (Baseman ve Tully, 1997). Fenotipik ve genotipik çok sayıda özellik açısından hücre duvarlı bakterilerden önemli ölçüde farklılık göstermeleri nedeniyle Tenericutes adlı ayrı bir bölüm oluşturulmuş ve Mollicutes sınıfı bu bölüme taşınmıştır (Miles ve Nicholas, 1998; Krieg ve ark, 2010). “Mikoplazmalar” ifadesi mikoplazma cinsine ait mikroorganizmaları tanımlamakta kullanıldığı gibi daha geniş anlamda tüm Mollicutes sınıfı üyelerini kastederek de kullanılmaktadır (Miles ve Nicholas, 1998).

Araştırmamızda, keçilerde kronik mastitislere ve salgınlara yol açabilen, bulaşıcı agalaksi hastalığının etiyolojik etkeni olan *Mycoplasma agalactiae*'nin bakteriyolojik kültür ve PCR ile ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Hücre duvarına sahip olmayan prokaryotik özellikte olan mikoplazma mikroorganizmaları insan ve hayvanda çeşitli infeksiyonlara neden olmaktadır. İnspektlerde ve bitkilerde de bulunabilen bu etkenler ilk kez 1898 yılında Nocard ve Roux tarafından Sığır Pleuro Pneumonia olgularından izole edilmiştir. Bu mikroorganizmalara PPLO (Pleuro Pneumonia Like Organism) adı verilmektedir. Asterococcus, Anulomyces adları da verilmiş ve 1929 yılında bu etkenlerin mikoplazma adı altında isimlendirilmesi uygun bulunmuştur. Bergey's Manual'in 2001 baskısına göre Mollicutes sınıfının Mycoplasmatales dizisindeki Mycoplasmatacae familyasında *Mycoplasma*, *Eperythron*, *Haemobartonella* ve *Ureaplasma* cinsleri bulunmaktadır. Ayrıca Mollicutes sınıfının Mycoplasmatales dizisinden farklı olan 4 dizisinde yer alan değişik familyalara ait *Spiroplasma*, *Acheloplasma* ve *Erysipelothrix* cinslerindeki türler de insan ve hayvanlarda önemli infeksiyonlara neden olmaktadır. Mycoplasmatacae familyasının genel özelliklerini taşıyan bu etkenler hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdürler. Gram negatif olmalarına rağmen anilin boyaları ile güç boyanırlar. Giemsa, Macchiavello ve Castaneda gibi boyama yöntemleri ile boyanabilen bu mikroorganizmalar hücre duvarları olmaması nedeniyle pleomorfik özelliğe sahiptirler. Diğer bakterilerden en önemli farkı hücre duvarı, dolayısıyla peptoglikan polimerinden yoksundurlar. Mikoplazma etkenlerini üretmek oldukça zordur. Nazlı üreyen bu mikroorganizmalar için bazı spesifik üretme faktörlerine ve izotonik ortamlara ihtiyaç vardır. Ayrıca üremeyi engelleyecek inhibitör maddelerin bulunmamasına dikkat edilmelidir. Bu amaçla en çok kolesterol gereksinimi nedeniyle %20 at serumu ilave edilmektedir. Üremeyi artırması amacıyla ayrıca maya ekstratları ve DNA'nın veya diğer nükleotidlerin katılması gerekir. Besiyeri için hazırlanan distile suyun çok iyi kalitede olması gerekmektedir. Gram pozitif diğer bakterilerin ve kontaminant türlerin üremesini engellemek amacıyla penisilin, Gram negatif bakterilerin üremesini engellemek amacıyla talyum asetat ilave edilmektedir. Optimal üreme pH aralığı 7,2-7,8'dir. Üreme sıcaklığı 37 °C olup, kültürlerin en az 7 gün süresince mikroaerofilik ortamda inkube edilmesi mikoplazmaların ilk izolasyonlarında çok önemlidir. Katı ortamlarda agar içine gömülü, tipik "Sahanda Yumurta" görünümünde koloniler oluşturan mikoplazma etkenleri gözle görülemediğinden, genellikle stereoskopik mikroskopla incelenirler. Mikoplazma etkenleri genellikle ekstrasellüler etkenlerdir. Ancak vücut içine özellikle müköz membranlara bazı türlerin adhezyon özelliği vardır. Ayrıca konakçı hücrelerin ölümüne neden olan ya da oluşturdukları infeksiyonların kronik hale gelmesinde önem taşıyan hemolizin, proteaz ve diğer

bazı toksik maddeler sentezlerler. Mikoplazmalar konakçı hücre zarlarına zar veren peroksit ve süperoksit gibi metabolik son ürünlerin birikimine neden olur. Mikoplazma türlerinin eklemler ve seröz boşlukları çevreleyen mezenşimal hücrelere affinitesi vardır. Genellikle solunum kanalı ve akciğerlere yerleşim eğilimi gösterirler. Mikoplazmanın solunum yolu epitelinde kolonizasyonu siliyer aktiviteyi azaltmaktadır (Niang ve ark, 1998).

Mikoplazmalar basit bir hücre yapısına sahiptirler. Başlıca üç yapıdan oluşur: sitoplazmik membran, ribozomlar ve diğer prokaryotlarda olduğu gibi bir adet sirküler çift iplikçikli DNA molekülü. Esnek yapılı plazma membranı nedeniyle türler en çok yuvarlak veya yuvarlağa yakın şekildedirler. Ancak uçta yer alan “terminal organel” nedeniyle armut veya şişe benzeri görünüm de oldukça yaygındır. Bunun yanında branşlı veya branşsız çeşitli uzunluklarda filamentler veya sarmal filamentler şeklinde de bulunabilmektedirler. Sert hücre duvarları bulunmamasına karşın mikoplazmaların şekillerini koruyabilmeleri, türlerin bir kısmında bulunan hücre iskeleti sayesinde olmaktadır. Mollicutes türleri genetik olarak küçük genomları ve oldukça düşük G+C oranları ile karakterizedir. Sahip oldukları 580-2200 kbp arası genom boyutları ile prokaryotlar arasında en küçük genomlu mikroorganizma grubunu oluştururlar. DNA G+C içerikleri genellikle %23-34 arasındadır. Diğer bakterilerden yalnızca bir veya iki rRNA operonu taşımalarıyla ayrılırlar (istisna olarak bir Mesoplasma türünde üçtür). Göze çarpan bir başka özellik, bakterilerde genellikle stop kodon olarak kullanılan UGA kodonunun çoğu Mollicutes türünde triptofan için kullanılmasıdır. Plazmidler ve bakteriyofajlar bazı türlerde gözlenmektedir. Mollicutes türleri, kısıtlı genetik materyale sahip olmalarından dolayı, hem enerji üretimi hem de hücre komponentlerinin sentezi ile ilgili bakterilerde karakteristik olan birçok enzimatik yoldan yoksundur. Bunlar arasında murein ve nükleotid sentezi, fonksiyonel trikarboksilik asit (TCA) siklusu ve sitokrom aracılı elektron transport zinciri sayılabilmektedir. Bunların sonuçları; hücre duvarına sahip olmamaları, besiyerlerinde DNA yapıtaşlarına ihtiyaç duymaları ve verimsiz enerji üretim yollarına sahip olmalarıdır. Kompleks besin maddeleri ihtiyaçlarını karşılayabilmek için ise çok miktarda degradasyon enzimleri (nükleaz ve proteazlar) üretirler. Mollicutes sınıfını oluşturan 200’den fazla tür insan, omurgalılar, artropodlar ve bitkiler gibi oldukça geniş bir konak yelpazesinde kommensal ya da paraziter yaşam sürer. Çok sayıda tür hayvanlar, artropodlar ve bitkiler için önemli patojenlerdir. İnsan ve hayvan mikoplazmalarının başlıca yaşam ortamları; solunum yolları, ürogenital sistem, sindirim kanalı, göz, meme ve eklemlerin muköz ve seröz yüzeyleridir. Mollicutes sınıfının en son taksonomisi Tablo 1’de verilmiştir (Krieg ve ark, 2010).

Tablo 1. *Mollicutes* sınıfının taksonomisi

Bölüm: *Tenericutes*

Sınıf 1: *Mollicutes*

Takım 1: *Mycoplasmatales*

Aile 1: *Mycoplasmataceae*

Cins 1: *Mycoplasma*

Cins 2: *Ureaplasma*

Aile 2: *Incertae sedis*

Cins 1: *Eperythrozoon*

Cins 2: *Haemobartonella*

Takım 2: *Entomoplasmatales*

Aile 1: *Entomoplasmataceae*

Cins 1: *Entomoplasma*

Cins 2: *Mesoplasma*

Aile 2: *Spiroplasmataceae*

Cins 1: *Spiroplasma*

Takım 3: *Acholeplasmatales*

Aile 1: *Acholeplasmataceae*

Cins 1: *Acholeplasma*

Aile 2: *Incertae sedis*

Cins 1: “*Candidatus Phytoplasma*”

Takım 4: *Anaeroplasmatales*

Aile 1: *Anaeroplasmataceae*

Cins 1: *Anaeroplasma*

Cins 2: *Asteroleplasma*

Krieg ve ark (2010)’dan modifiye edilmiştir.

İnsan ve hayvanlarda, floranın bir parçası olan ya da parazitik karakterde olan Mikoplazma türlerinin, müköz ve seröz epitel yüzeylere affiniteleri vardır. Patojen türler oldukça karmaşık virülens faktörlerine sahiptir. Bunlar arasında adhezinler, hücre dışı polisakkarit yapılar, yangı veya apoptozisi indükleyen membran lipoproteinleri, hücre dışı endopeptidaz, nükleaz ve glikozidazlar yer alır. Ayrıca hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri ve amonyak gibi ara metabolizma yan ürünleri patogeneizde önemlidir. Bunların dışında bazı muhtemel virülens mekanizmaları da söz konusudur; (a) bağışıklık hücreleri, bunların reseptörleri veya sitokinlerin supresyonu veya patolojik stimülasyonu, (b) hareket, (c) biyofilm oluşumu, (d) değişken yüzey antijenleri ve (e) hücre içi parazitizm (Krieg ve ark, 2010). Genel özellik olarak ekstraselüler karakterde olup, epitelyal yüzeylerde kolonize olsalar da bazı türlerin (örneğin *Mycoplasma gallisepticum*) *in vitro* ve *in vivo* olarak ökaryotik hücre invazyonu yapabildiği bilinmektedir (Vogl ve ark, 2008). Patojen mikoplazmalar hidrojen peroksit gibi orta derecede toksik metabolizma yan ürünleri üretseler de diğer patojen bakterilerde olduğu gibi spesifik ekzotoksinler tespit edilememiştir. Ancak istisnai olarak *M.*

pneumoniae'nin "toplum kökenli respiratorik distress sendromu" (CARDS) adlı sitotoksini ve *M. arthritidis*'in bir T-lenfosit mitojeni olan "*M. arthritidis* mitojen" (MAM) adlı süperantijeni bulunmaktadır. Bütün bu virülens faktörleri yine de oluşan patolojik lezyonları açıklamakta yetersiz olmaktadır ki mikoplazma hastalıklarının moleküler patogenezi günümüzde büyük ölçüde aydınlatılamamıştır (Citti ve Blanchard, 2013). Hücre duvarı ve lipopolisakkaritten yoksun olmaları, ayrıca kendi nükleotidlerini sentezleyememeleri nedeniyle mikoplazma türleri polimiksinler, beta-laktamlar, vankomisin, fosfomisin, sülfonamidler ve trimetoprim doğal olarak dirençlidirler (intrinsik direnç). Ayrıca mikoplazma RNA polimerazları rifampine duyarlı olmadığından bu antibiyotik için de doğal direnç söz konusudur. Mikoplazma hastalıklarının tedavisinde protein sentezini veya DNA replikasyonunu inhibe eden antibiyotikler etkili olabilmektedir. Bunların arasından makrolidler, tetrakisiklinler, florokinolonlar, aminoglikozitler, pleuromutilinler ve fenikoller veteriner hekimliğinde kullanılmaktadır. Mikoplazmaların dokularda (sekestrasyon) ve potansiyel olarak hücre içinde (intraselüler parazitizm) gizlenme eğiliminden dolayı genellikle uzun süreli antibiyotik tedavisi zorunludur (Krieg ve ark, 2010). Oluşturdukları çeşitli hastalıklar nedeniyle mikoplazmaların çalışıldığı başlıca alanlar veteriner ve beşeri hekimliktir. Bitki hastalıklarına yol açıp ekonomik kayıp oluşturmaları nedeniyle bitki koruma biliminde de çalışma konusudurlar (Miles ve Nicholas, 1998). Veteriner hekimlik ve diğer biyomedikal bilimler için önemli bir başka yönleri, sık sık inatçı ve fark edilmesi zor hücre kültürü kontaminasyonlarına neden olmalarıdır (Krieg ve ark, 2010). Bazen infekte hücreler anormal üreme veya morfoloji sergilerken çoğu kez açık belirti bulunmaz. Bu durum, hücre kültürleri araştırma amaçlı kullanıldığında çalışma sonuçlarının güvenilmez veya yanıltıcı olmasına, üretimde kullanıldığında ekzojen mikoplazmanın final biyolojik üründe istenmeden bulunmasına neden olur. Farklı ülkelerde yapılan değişik çalışmalar hücre kültürlerinin %10-87'sinin mikoplazmalar ile kontamine olduğunu göstermiştir. Mikoplazmaların bilinen en küçük genoma sahip prokaryotlar olmaları (*M. genitalium* için 580 kbp) canlılarda nükleotid sekansları ile hücresel yapı ve fonksiyonlar arasındaki ilişkinin anlaşılması için çok uygun model organizmalar olmalarını sağlamaktadır (Miles ve Nicholas, 1998). Mikoplazmaların sahandaki yumurta görünümü ve koloni morfolojileri, Resim 1 ve Resim 2'de sunulmuştur.

Mikoplazmalar, en önemli ekonomik kayıpları, çiftlik hayvanları ve kanatlılarda oluşturmaktadır. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün (OIE) 2014 yılı bildirim zorunlu hayvan hastalıkları listesinde 5 mikoplazma hastalığı ve bunlara yol açan 8 mikoplazma türü bulunmaktadır. Evcil ruminantlarda ise bunlardan 3 hastalık ve 6 tür görülmekte, ayrıca bunlar

dahil 30'dan fazla mikoplazma izole edilmektedir (OIE, 2014). Ruminantlardan izole edilen önemli *Mollicutes* türleri ve neden oldukları hastalıklar Tablo 2'de özetlenmiştir.

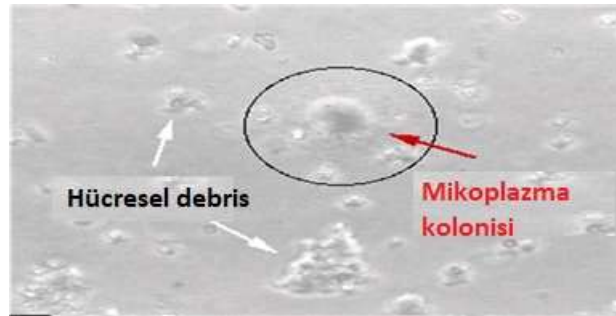
Tablo 2. Ruminantlardan izole edilen önemli *Mollicutes* türleri

Tür	Hastalık
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Bulaşıcı sığır plöropnömonisi
<i>Mycoplasma bovis</i>	Pnömoni, mastitis, artrit, keratokonjunktivitis, otitis, abortus
<i>Mycoplasma canis</i>	Pnömoni
<i>Mycoplasma californicum</i>	Mastitis, pnömoni
<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	Endometritis, infertilite
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	Pnömoni
<i>Mycoplasma canadense</i>	Mastitis, artrit, pnömoni
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	Pnömoni
<i>Mycoplasma bovoculi</i>	Keratokonjunktivitis
<i>Mycoplasma alvi</i>	Bilinmiyor
<i>Mycoplasma verecundum</i>	Bilinmiyor
<i>Mycoplasma leachii</i>	Mastitis, artrit, pnömoni
<i>Mycoplasma dispar</i>	Pnömoni
<i>Mycoplasma arginini</i>	Apatojen
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Apatojen

OIE (2014)'den modifiye edilmiştir.



Resim 1. Mikoplazmaların sahadanda yumurta görünümü
Krieg ve ark (2010)'dan modifiye edilmiştir.



Resim 2. Mikoplazmaların koloni morfolojileri
Krieg ve ark (2010)'dan modifiye edilmiştir.

Mikoplazmaların antijenik yapılarını incelemeye birçok serolojik test uygulanmaktadır. Bunlar aglutinasyon, komplement fiksasyon, agar jel difüzyon, üreme ve koloni inhibisyonu, metabolik inhibisyon, indirekt hemaglutinasyon testleri olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında hasta hayvanları ortaya koymada floresan antikor tekniği (FAT) ve Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) yöntemleri saptamada faydalı olmaktadır (Citti ve Blanchard, 2013).

2.1. Keçilerde Mikoplazma İnfeksiyonları

2.1.1. Salgın Keçi Ciğer Ağrısı (CCPP)

Hastalık keçiler arasında ilk defa Cezayir’de görülmüştür. Bulaşıcı sığır pleuropneumonisi ile yakından ilgili olan bir hastalıktır. Büyükbaş hayvanlarda plöropneumonisi gibi CCPP, 1800’li yılların sonlarında bulunmuştur. Bu sendromun organizması 1970’li yıllarda *Mycoplasma* sp. suş F38 belirlenmiştir. Daha sonra *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* olarak adlandırılmıştır. Bu patojen Afrika ve Asya’da büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Thiaucourt ve ark, 1996).

2.1.1.1. Epidemiyoloji

Hastalığa, sıcak rutubetli yerlerdeki keçilerde fazla rastlanır. Bulaşma solunum yolu ve direkt olarak meydana gelir. Hastaların ve portörlerin akciğer ve burunlarından gelen eksudatlar da mikroplar çok fazladır. Bunların öksürük ve tıksırıkla dışarı saçılması ve damlacık mukoid salgı içinde bulunan mikropların diğer hayvanların mukozasına değmesi veya damlacıkların yayılması ile bulaşabilmektedir. Bakım ve besleme koşullarının kötü oluşu ve stres etkenleri predispoze faktörlerdendir (Thiaucourt ve ark, 1996).

2.1.1.2. Klinik belirtiler

CCPP hastalığında inkübasyon süresi 6-10 gün veya daha uzun sürelidir. Klinik bulgular öksürük, yatma, grubun gerisinde kalma olup, vucüt sıcaklığı çoğu zaman 40 °C’yi aşmaktadır. Efor sonunda egzersiz tolere edilemez hale gelir, açık ağız solunumu görülür. Çoğu hayvan 1-2 günlük hastalık seyri sonrası ölmektedir. Morbidite %100 ve ölüm oranı %80 olarak görülmüştür. (Thiaucourt ve ark, 1996). Hastalığın akut evrelerinden sağ kurtulan keçilerde kronik akciğer lezyonları görülmüştür. *M. capripneumoniae* bu lezyonlardan izole edilmesinde

hastalıktan arı hayvanların enfeksiyona yakalanabileceği öngörölmüştür. (Wesonga ve ark, 1998). CCPP nedeniyle ortaya çıkan hastalığın, mikoplazmaya bağılı diğer keçi solunum yolu hastalıklarından ayırt edici özellikleri şunlardır: 1) Çok bulaşıcıdır. 2) Koyun ve sığırlar etkilenmez. 3) Klinik belirtiler solunum bulguları ile sınırlıdır.

Diğer mikoplazmalar, artiritis, keratit ve mastitise yol açmaktadır (Thiaucourt ve ark, 1996). *M. capripneumonia*'nın meme içi inokulasyonu ile deneysel olarak şiddetli tek taraflı mastitis indüklenmiştir. Patolojik bulgu şiddetli olmasına rağmen aşılınmış meme bezinde sınırlı bölgeyi etkilemektedir. Sistemik enfeksiyonlar gözlenmemiştir (Darzi ve ark, 1998).

Nekropside, CCPP'nin patolojik lezyonları akciğer ve pleural yüzey ile uyumludur ve yaygın olarak lezyonlar tek taraflıdır. Eş zamanlı paraziter bir hastalık veya Poxvirus enfeksiyonu varsa bulgular hiperemi, küçük nodüller ve ödem başlangıçta akciğerin diyafram bölümünde bulunur. Hastalık ilerledikçe fibrinöz pnömoni, hiperemi, ve ödem alanları görülür. Nodüller merkezi gri ve nekrotik hale gelir. Pleura kalın sarı, fibrinöz saman renginde bir sıvı ile dolabilmektedir (Thiaucourt ve ark, 1996).

2.1.1.3. Teşhis

Çoğu zaman klinik bulguların spesifik olmayan doğası nedeniyle, *M. pneumonia* klinik tanısı zordur. Klasik CCPP vakalarıyla ilişkili yüksek mortalite ve tipik torasik lezyonlar oldukça düşündürücüdür. Bununla birlikte kesin bir teşhis ek bir laboratuvar araştırması gerektirmektedir (Thiaucourt ve ark, 1996).

2.1.1.4. Sağaltım

Tetrasiklin veya makrolid grubu antibiyotikler en az 5 gün süreyle kullanılmalıdır. Penisilin etkene karşı etkinliği çok azdır veya hiç yoktur (Thiaucourt ve ark, 1996).

2.1.1.5. Koruma

Kenya'da inaktive edilen bir saponin adjuvantlı aşı başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Aşı endemik bölgelerde koruma sağlamış gibi görünmektedir. Yavrularda 10-12 haftalık aşılama daha uygun olmaktadır. Enfekte hayvanlar sürüden ayrılmalıdır. Hatta imha edilmelidir. Bu eylem uzun vadeli ekonomik kayıpları engeller. Fakat endemik görülen ülkelerde bu yöntem çok uygulanamaz, çünkü keçiler kırsal yaşamın vazgeçilmez bir parçasıdır (Thiaucourt ve ark, 1996).

2.1.2. Bulaşıcı Agalaksi

Bu hastalık süt üretiminde önemli kayıplara neden olmaktadır. Hastalığa koyun ve keçi yetiştiren, sağım, sağlık, bakım besleme, hijyen koşullarının iyi olmadığı işletmelerde yaygın olarak rastlanmaktadır. Mikroorganizma hasta hayvanların süt ve gözyaşı ile dışarı çıkar ve etrafa bulaşır. Hastalık sindirim sistemi yolu ile veya süt sağımıcının elleriyle diğer hayvanlara bulaşmaktadır. Portörlerin hastalığın yayılmasında önemi fazladır (Aytuğ ve ark, 1990; Bergonier ve ark, 1997; Da Massa ve ark, 1992; De La Fe ve ark, 2005; OIE, 2014).

2.1.2.1. Etiyoloji

Keçi ve koyunların bulaşıcı agalaksi hastalığının spesifik etkeni *M. agalactiae* olup, ilk kez 1923 yılında izole edilmiştir. Bununla birlikte daha çok keçilerde olmak üzere koyunlarda da “bulaşıcı agalaksi sendromu” olarak nitelenen hastalığın etiyojisinde *M. agalactiae* ile birlikte 3 farklı mikoplazma türünün (*M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* ve *M. putrefaciens*) de sorumlu olduğu bildirilmektedir (Amores ve ark, 2012; Gómez-Martin ve ark, 2012). Diğer yandan keçilerdeki bazı agalaksi vakalarından saf olarak *M. putrefaciens*'in izole edildiği bildirilmiştir (OIE, 2013a).

M. agalactiae, mikoplazma cinsinin (PPLO) genel özelliklerini taşımaktadır. *M. agalactiae* Gram negatif, hareketsiz ve kapsülsüzdür. Etken Gram negatif olmasına rağmen anilin boyalarla güç boyanmaktadır. Giemsa, Macchiavello veya Castaneda gibi boyama yöntemleriyle boyanmaktadır. Hücre duvarı bulunmayan etken pleomorfik özellikte olup, hücre duvarı yerinde “ünit membran” bulunmaktadır. Serum içeren sıvı veya katı PPLO besiyerlerinde üremektedir. Katı besiyerlerinde tipik “sahanda yumurta” şeklinde koloniler oluşturmaktadır (Bergonier ve ark, 1997).

M. agalactiae fiziksel ve kimyasal etkenlerle, penisilin hariç diğer antibiyotiklere duyarlıdır. Etken, rutin olarak kullanılan birçok dezenfektana (sodyum hidroksit, sodyum hipoklorid, sodyum karbonat, formalin, kreasol, bazı iyonik ve non-iyonik deterjanlar) duyarlıdır. Antijenik yapısı genel olarak bir homojenite göstermektedir. Diğer mikoplazma türleriyle, örneğin *M. mycoides* subsp. *mycoides* ve *M. mycoides* subsp. *capri* gibi, kros reaksiyon vermemektedir (Madanat ve ark, 2001).

2.1.2.2. Epidemiyoloji

Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE)'ne göre bildirim zorunlu bir hastalık olan bulaşıcı agalaksi vakaları dünyanın birçok bölgesinde bildirilmiştir. Etkenin hayvanlardan insanlara bulaştığına dair bir veri bulunmamaktadır (OIE, 2013b). Hastalık dünyanın bazı bölgelerinden eradike edilmiş olmakla birlikte, bazı bölgelerde endemik (Amores ve ark 2011, De La Fe ve ark, 2012; Ariza-Miguel ve ark, 2013), bazı bölgelerde ise sporadik olarak görülmektedir (Kinde ve ark, 1994). İnfeksiyon özellikle Akdeniz Bölgesi başta olmak üzere Ortadoğu, Kuzey Afrika, Avustralya, Hindistan, Pakistan, Güney Amerika ve Yakın Doğu ülkelerinde yoğun olarak görülmektedir (Kinde ve ark, 1994; Pepin ve ark, 2003). ABD'de ise 2009 yılına değin sadece 3 adet *M. agalactiae* vakasının rapor edildiği bildirilmektedir (OIE, 2013c).

Sağlıklı bir sürüye mikoplazmanın bulaşması, bu sürüye dışarıdan enfekte bir hayvanın (portör) katılması sonucu ya da enfekte başka bir sürü ile temas sonucu olmaktadır. Portör hayvanlar herhangi bir klinik belirti göstermeyebilir, getirildiği sürüde de herhangi bir klinik belirti olmayabilir. Ancak enfekte hayvanların tedavi edilseler bile 7 yıla kadar etkeni yaydıkları bildirilmektedir. Bu hayvanlar taşınma gibi strese maruz kaldıklarında infeksiyon yeniden görülebilmektedir (Gil ve ark, 1999; Glew ve ark, 2000; Nicholas, 2002; Corrales ve ark, 2007). Bazı mikoplazma türleri küçük ruminantlarda önemli kulak infeksiyonlarına da neden olmaktadır. Bu infeksiyonların kulak parazitleri tarafından bir hayvandan diğerine nakledildiğine dikkat çekilmektedir (De La Fe ve ark, 2005; De Azevedo ve ark, 2006).

Keçiler, koyunlara göre *M. agalactiae* infeksiyonuna daha duyarlıdır. Ancak etken her iki türde de hastalık oluşturmaktadır. Hastalığın ekonomik önemi çeşitli faktörlere (sürü büyüklüğü, etkenin patojenitesi, coğrafi şartlar, sekonder veya miks infeksiyon durumu, koyun ve keçilerle farklı yaş grubundan hayvanların birlikte barındırılması gibi) bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Koyun ve keçilerdeki agalaksi salgınları daha çok yaz mevsiminde, doğum ve laktasyonun pik yaptığı dönemlerde görülmektedir (Pepin ve ark, 2003). Bulaşıcı agalaksi yetiştiricilik şartlarının iyi olmadığı (sağım, sağlık, bakım, besleme ve hijyen koşullarının) işletmelerde daha fazla görülmektedir (Da Massa ve ark, 1992; Aydın ve ark, 2006). Örneğin ABD'de, farklı bölgelerden satın alınarak oluşturulmuş 600 keçinin bulunduğu bir işletmede, kötü bakım-besleme şartlarının da etkisiyle yaşanan ve etken olarak *M. agalactiae* ve *M. mycoides* subsp. *mycoides*'in sorumlu olduğu bir epidemide, hayvanlardan 90 adedinin (%15) ilk 3 haftalık dönemde öldüğü veya kesime sevk edildiği bildirilmektedir (Kinde ve ark, 1994). Enfekte hayvanlar idrar, dışkı, süt, burun ve göz akıntılarıyla etkeni duyarlı hayvanlara ve çevreye bulaştırmaktadır. Mikoplazma türlerinin bir laktasyon döneminde süt ile atılmaya

devam ettiği, kuru dönemlerde ise meme lenf yumrularında varlığını devam ettirdiği bildirilmektedir. Çoğu vakalarda taşıyıcılığın aylarca, bazı vakalarda ise 1 yıldan fazla devam ettiği ifade edilmektedir (OIE, 2013c). Hastalık duyarlı hayvanlara direkt ve indirekt yollarla, genellikle sindirim, daha az olarak da solunum ve göz konjunktivasıyla bulaşmaktadır. Direkt bulaşmada etken; hasta hayvanların süt, gözyaşı, burun ve ağız akıntılılarıyla dışarı çıkmakta, böylece hayvanlara bulaşmakla kalmayıp, çevreyi de kontamine etmektedir. Kontamine yiyecek ve su ile etken duyarlı hayvanlara sindirim yoluyla kolaylıkla bulaşmaktadır. Süt emen kuzu ve oğlaklara bulaşmada kontamine süt, idrar, dışkı, ağız ve burun akıntıları rol oynamaktadır. Kuzu veya oğlakların annelerinden ayrılmasının strese neden olduğu ve bu yüzden mikoplazma infeksiyonlarına daha yatkın oldukları bildirilmektedir (Da Massa ve ark, 1992; Kinde ve ark 1994; Al-Momani ve ark, 2008; Amores ve ark, 2010).

Diğer yandan kısa mesafede bulunan ve sık barındırılan hayvanlarda aerosol yolla da bulaşma söz konusudur. İndirekt olarak kontamine yiyecek ve içeceklerle, fomitlerle ve elle sağım yapılan işletmelerde insan aracılığıyla bulaşma olmaktadır. Bulaşmada portör hayvanlar önemli vardır. Klinik belirti göstermeyen kronik ve latent infekte hayvanlarda etken aylarca lenf yumrularında kalarak, bir sonraki laktasyon dönemine kadar çevreyi ve diğer hayvanları kontamine etmektedir. Kontamine fomitlerle de etkenin duyarlı hayvanlara bulaştığı bildirilmektedir (Kinde ve ark, 1994; Amores ve ark, 2012).

Etken çevre şartlarına kısmen duyarlı olmakla birlikte, oluşturduğu biofilm nedeniyle ısı ve kuruluğa karşı kendini korumaktadır (OIE, 2013c). Yapılan bir çalışmada *M. agalactiae* ve *M. putrefaciens*'in bol miktarda biofilm ürettiği, *M. capricolum* subsp. *capricolum*'un ise üretmediği bildirilmiştir (McAuliffe ve ark, 2006).

Bulaşmada, kazanılan aktif bağışıklığın önemli olduğu ve 4 yaşın üzerindeki hayvanlarda hastalığın daha az görüldüğü bildirilmektedir. Bu durum, hayvanların bu yaşa kadar yeterli aktif bağışıklığa sahip olmaları ile açıklanmıştır (Aytuğ ve ark, 1990). Sağmal-gebe ve sağmal-gebe olmayan hayvanlarda hastalığın sağmal olmayanlara göre daha fazla meydana geldiği, bunun nedeninin ise süt üretiminin kendi başına bir stres faktörü olduğu, bu nedenle strese daha fazla maruz kalan hayvanların infeksiyona daha yatkın olduğu bildirilmektedir. *M. agalactiae* primer olarak koyun ve keçileri enfekte etmekle birlikte etkene spesifik antikolar bazı geyik türleri ve karacalarda saptanmıştır (OIE, 2013c).

2.1.2.3. Patogenez

Diğer bakteriyel etkenlere göre mikoplazmaların patojeniteleri ile ilgili bilgiler yeterli değildir (Jevhlinger ve ark, 2004). Mikoplazmalar dünyanın hemen her yerinde saprofit veya patojen olarak bulunmaktadır. Patojenik ve patojenik olmayan mikoplazmalar canlıların üst solunum yolu mukozalarında, intestinal ve genital sistemlerinde, eklem yüzeylelerinde ve meme dokusunda bulunmaktadır. Patojen mikoplazma türleri konakçı müköz membranlarına adhezyon molekülleriyle sıkıca bağlanmaktadır. Hedef hücreye bağlanan etkenler ürettikleri hemolizin, proteaz, nükleaz ve diğer toksik maddelerle konak hücrenin parçalanmasına ya da kronik infeksiyonuna neden olmaktadır. Bazı patojenik türler eklem ve seröz boşluklarda bulunan mezenşimal hücrelere afinite göstermektedir. Solunum sistemi ve akciğerler yaygın infeksiyon alanlarıdır. Mikoplazmalar solunum sistemi siliyumlarını dejenere ederek, konağı sekonder infeksiyonlara karşı predispoze hale getirmektedir. İnfeksiyonun ilk kez görüldüğü sürülerde hastalığa ait bulgular daha belirgindir. Bu dönemde septisemiye bağlı olarak vücut sıcaklığı yükselmektedir. Septisemi dönemini takiben etken kan ile afinite gösterdiği hedef organlara giderek (meme, göz, lenf nodülleri, eklem ve tendonlar), yerleşmektedir (Madanat ve ark, 2001; Pilo ve ark, 2007).

2.1.2.4. Klinik belirtiler

Hastalığın inkübasyon süresi doğal infeksiyonlarda 1-8 hafta arasında değişmektedir (OIE, 2013c). Bu süre etkenin virülensine, konakçının direncine ve çeşitli çevresel faktörlere göre değişmektedir. Erkek ve dişi koyun ve keçiler infeksiyona yakalanabilir. İnfeksiyon asemptomatik formdan akut, subakut ve kronik forma kadar değişik seyir göstermektedir (Kinde ve ark, 1994; Madanat ve ark, 2001; OIE, 2013c). Klinik bulgular daha çok keçilerde belirgin olarak görülmektedir (OIE, 2013c). Keçiler, laktasyon döneminin başlangıcında infeksiyona oldukça duyarlı olup, bu dönemde hastalık daha çok akut seyir göstermektedir. Yüksek ateş, mastitis, poliartritis ve keratokonjunktivitis önemli klinik belirtilerdendir. Hastalığa ilk kez yakalanan hayvanlarda daha çok akut form görülmektedir. Zamanla hastalık kronik forma dönüşerek klinik belirtiler de azalmaya başlamaktadır. Kronik formda anoreksi, halsizlik ve sürünün gerisinde kalma hastalığın ilk klinik belirtileridir. Başlangıçta hafif bir ateş, iştahsızlık ve süt üretiminde azalma dikkati çekebilmektedir. Bu dönemde mikoplazmalar meme, eklem ve konjunktiva mukozalarına kolonize olmaya başlamaktadır. Gebeler nadiren abort yapabilmektedir (Kinde ve ark, 1994; Bergonier ve ark, 1997; Madanat ve ark, 2001;

Nicholas ve ark, 2008). Akut vakalarda ateş yaygın olup, bazı vakalarda sinirsel semptomlar da görülebilmektedir (Nicholas ve ark, 2008).

Küçük ruminantların bulaşıcı agalaksiye en duyarlı oldukları dönem, laktasyon döneminin başlangıcı olup, vakaların da birçoğu bu dönemde rapor edilmiştir (OIE, 2013c). Duyarlı bir sürüde hastalığın morbiditesi yaklaşık %30-60, mortalitesi ise yaklaşık %20 düzeyindedir. Süt emme dönemindeki genç hayvanlarda gelişen septisemiye bağlı olarak mortalite %40-70 olabilmektedir. Ancak, diğer sekonder infeksiyonların ölüm oranını artırdığı bildirilmektedir (Da Massa ve ark, 1992; Kinde ve ark, 1994; Madanat ve ark, 2001; OIE 2013c).

Bulaşıcı agalaksinın önemli bir klinik bulgusu olan meme formunda bulgular, etkenin meme kanalına girmesini takiben 1-3 gün içinde başlamaktadır (Kinde ve ark, 1994). Hastalığın bu formunda memede kataral veya parankimatöz bir yangı şekillenmekte, bunu takiben loblarda yumuşama ve hacimce küçülme görülmektedir. Süt genellikle yeşilimsi-sarı veya grimsi-mavi renkte ve sulu kıvamdadır. Bazen boz-kirli sarı renkte, peynirimsi görünüşte, yapışkan kıvamda ve pıhtılı olabilmektedir. Bu pıhtılar bazen meme kanalını tıkamaktadır. Bu nitelikteki sütler bekletildiğinde hızla çökmekte ve üstte, süt serumu birikmektedir. Süt verimi azalmakta veya birkaç gün içerisinde tamamen kesilebilmektedir. Bölgedeki yangı, sağımın ağırlı olmasına neden olmaktadır. Memedeki yangı klinik olarak düzelmiş görülse de o laktasyon döneminde süt verimi eski haline gelememektedir. Gangrenöz mastitiste süt kanlı olabilir. Bu durumda süt verimi daha uzun sürede kesilmektedir. Süt verimi kayıplarının yanı sıra laktasyonun ilk aylarında hastalık çıktığında, kuzu ve oğlakların beslenmesinde önemli sorunlar ortaya çıkmaktadır (Aytuğ ve ark, 1990; Corrales ve ark, 2007). Mastitis genellikle bilateral olarak seyretmekte olup, meme dokusunda sıcaklık artışı, şişkinlik ve ağrı ile birlikte meme lenf yumrularında hipertrofi şekillenmektedir. Kronikleşen vakalarda ilerleyen fibrosis gelişmekte, en sonunda da sertleşmiş nodüllerle birlikte meme atrofiye olmaktadır (Corrales ve ark, 2007; OIE, 2013c).

Koyun ve keçilerdeki bulaşıcı agalaksinın oküler formunda en tipik klinik bulgu keratokonjunktivitis olup, vakaların yaklaşık %50'sinde görülmektedir. Keratokonjunktivitis tek veya çift taraflı görülmekte olup, daha çok hastalığın kronik formunda gelişmektedir. Konjunktivada başlangıçta hiperemi, bunu takiben de korneal vaskülarizasyon gerçekleşmektedir. Bu durum keratokonjunktivitis, keratitis ve korneanın vaskülarizasyonuna bağlı olarak oluşan görme kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Bazı hayvanlarda korneada ülserasyon gerçekleşmekle birlikte, bir süre sonra iyileşmeler de görülebilmektedir (Madanat ve ark, 2001).

Hastalığın artritis formunda en önemli klinik bulgu topallıktır. Başlangıçta ön ve arka ekstremitelerde birkaç eklemdede şişlik, ağrı ve sıcaklık artışı dikkati çekmektedir. Tendovajinaların da yangılı olduğu saptanabilir. Oğlaklarda bulaşıcı agalaksinın en önemli klinik bulgusu poliartritistir. Hayvanlar merada dolaşamadıkları için beslenemez ve zamanla kaşektik hale gelmektedir. Semptomlar daha çok karpal ve tarsal eklemlerde meydana gelmektedir. İleri vakalarda ankiloz ve topallıkla birlikte hayvanlar zamanla yürüyemez veya ayağa kalkamaz hale gelmektedir. Sinoviyal sıvının artışı ile eklemlerde ısı artışı ve şişkinlik dikkati çekmektedir (Corrales ve ark, 2007).

Hastalığın kronik formunda bazı agalaksi vakalarında abortlar da görülmektedir. Bu durumun patogenezi tam olarak açıklanamamakla birlikte, granüler vulvovaginitisli keçilerden, *M. agalactiae*'nin izole edilmiş olması, etkenin bu hayvanlarda atıklara da neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. *M. agalactiae* vulva, vajina ve akciğerlerden de izole edilmektedir. Bu bölgedeki etken granuler vulvovajinit oluşmasına neden olurken pnömoni nadir olarak gözlenmektedir (OIE, 2013c).

2.1.2.5. Teşhis

Teşhis amacıyla laboratuvara canlı hayvanlardan süt, kan, idrar, dışkı ile göz ve eklemlerden alınan svab örnekleri gönderilmektedir. Ölü hayvanlardan ise çeşitli iç organlar (karaciğer ve dalak gibi) ile eklem sıvıları gönderilebilir. Alınan materyallerin antibiyotik içeren (örneğin penisilin 250-1000 IU/ml) transport mediumlarla gönderilmesi, spesifik etkenin izolasyonunu artırmaktadır. Örnekler kısa sürede ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Eğer örneklerin laboratuvara ulaştırılması birkaç gün gecikecek ise, bu durumda materyaller dondurulabilir (Darzi ve ark, 1998). Klinik materyallerden hazırlanan preparatlar uygun bir boyama yöntemiyle (Giemsa gibi) boyanarak, etken aranır. Bakteriyoskopik bulgu kesin teşhis için yeterli değildir (Aydın ve ark, 2006).

Direkt teşhiste, çeşitli materyallerden uygun besiyerlerine ekimler yapılarak etken izole ve identifiye edilmektedir. Klinik materyallerin laboratuvara ulaştırılmasında transport mediumların (Örneğin; *Mycoplasma* transport medium, %20 serum, %10 maya ekstraktı ve benzil penisilin içeren beyin-kalp infusion broth gibi) kullanılması tavsiye edilmektedir. Transfer soğuk zincirde (kuru buz içinde) ve kısa sürede yapılmalıdır. Eğer örneklerden ekimler yapılmayacaksa, dondurularak saklanmalıdır. Laboratuvara ulaştırılan uygun klinik materyaller (süt, konjunktival sıvı, pleura sıvısı ve eklem sıvısı gibi) sıvı ve katı besiyerlerine ekilerek, %5-10 CO₂'li ortamda, 37°C'de 1 hafta inkube edilir. Mikoplazma türleri özel besiyerlerine

gereksinimi olan ve yavaş üreyen bakteriler olup, üremek için izotonik bir ortama ve çeşitli katkı maddelerine (örneğin; iyi kalitede et infüzyon, maya ekstraktı ve kolesterol gibi) ihtiyaç duymaktadır. Etkenlerin kolesterol ihtiyacı besiyerlerine %20 inaktive at serumu katılarak sağlanabilmektedir. Diğer yandan besiyerlerine Gram pozitif bakteriyel kontaminatların inhibisyonu için penisilin, Gram negatif bakteri ve mantarların inhibisyonu için ise talyum asetat eklenmeli, pH 7,2-7,8 aralığında olmalıdır. Katı besiyerinde üreyen ve ortası düğmeli gibi görünen koloniler, agarla birlikte alınarak sıvı PPLO besiyerlerine ekilir ve saf kültürler hazırlanır. Sıvı besiyerinde üreyen saf kültürler Giemsa boyama yöntemiyle boyanarak, incelenir. Bakteriyoskopide belli bir şekli olmayan oval, kokoid, halka, yüzük vb formların görülmesi PPLO'dan şüphelendirir. İdentifikasyon için gerekli biyokimyasal testler yapılır. Mikoplazma türlerinin identifikasyonu daha çok referans laboratuvarlarda yapılmaktadır. Öncelikle üreyen etkenlerin, bakterilerin L formlarından ve *Ureaplasma* türlerinden ayrılması gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli testlerden yararlanılmaktadır. Bunlar arasında antibiyotik içermeyen besiyerlerine ekim, digitonin duyarlılık testi, modifiye üreaz testi ve Dienes boyama yöntemi gibi özel boyama metotları sayılabilir. Diğer yandan akut dönemde kan örneklerinden hemo-kültür yapılarak da etkenin izole edildiği ifade edilmektedir (Aydın ve ark, 2006; OIE, 2013c).

Hastalığın indirekt teşhisinde mikoplazma türlerine karşı sentezlenen spesifik antikörlerin saptanmasında çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu testler arasında lam aglutinasyon (özellikle kanatlılarda), lateks aglutinasyon, hemaglutinasyon inhibisyon (kanatlılarda), indirekt hemaglutinasyon, AGD, KF, FAT, IFAT ve ELISA gibi teknikler bulunmaktadır (Lambert ve ark, 1998; Nicholas, 2002; Pepin ve ark, 2003, Zendulcova ve ark, 2004; Fusco ve ark, 2007; OIE, 2013c). Bu testler içinde en fazla ELISA ve komplement fizyasyon testlerinin kullanıldığı bildirilmektedir (OIE, 2013c).

Son yıllarda mikoplazma türlerine ait genomik materyallerin bakteri kültürlerinde ve çeşitli klinik örneklerde (süt, burun akıntısı, göz akıntısı, eklem sıvısı ve doku örnekleri gibi) saptanmasına yönelik farklı PCR yöntemleri geliştirilmiş ve laboratuvarında başarı ile kullanılmaktadır (Tola ve ark, 1997; Peyraud ve ark, 2003; Gómez-Martin ve ark, 2012). Bulaşıcı agalaksinin endemik olduğu İspanya'da, keçilerden alınan 307 kulak svab örneğinden *M. agalactiae* ve *M. mycoides* subsp. *capri*'nin belirlenmesine yönelik kültür ve PCR yöntemleriyle bir çalışma yapılmıştır. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde PCR ile 246, kültür ile 117 örnek pozitif bulunmuştur. Örneklerin 133'ü PCR ile pozitif, kültür ile negatif, 4'ü ise PCR ile negatif, kültür ile pozitif olarak saptanmıştır. Yine İspanya'da, 2008-2010 yılları arasında 12 farklı ildeki, 1313 koyun sürüsündeki hayvanlardan alınan, 922 örneğin 439'unun

(% 37,8) PCR ile pozitif bulunduğu ifade edilmiştir (Ariza-Miquel ve ark, 2013). Sonuç olarak her iki çalışmada da İspanya’da hastalığın yaygın olduğu ve PCR yönteminin, *M. agalactiae* ve *M. mycoides* subsp. *capri* saptanması bakımından hızlı ve güvenilir bir teşhis yöntemi olduğu, bu nedenle hastalıkla mücadelede başarı ile kullanılabileceği bildirilmiştir (Amores ve ark, 2010; Ariza-Miquel ve ark, 2013).

Bulaşıcı agalaksi hastalığının moleküler teşhisine yönelik ülkemizde yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Çetinkaya ve ark (2010), Doğu Anadolu bölgesinde yaptıkları çalışmada Bulaşıcı Agalaksi hastalığı etkeni *M. agalactiae*’nın yaygınlığını kültür ve PCR metodları ile %81.7 olarak bulduklarını belirtmişlerdir.

2.1.2.6. Sağaltım

Hastalığın tedavisinde tetrasiklin, tylosin, eritromisin ve talyum fumarat başta olmak üzere birçok antibiyotik kullanılmaktadır. Hastalığın endemik olduğu İspanya’da 16 adet küçük ruminant orijinli *M. mycoides* subsp. *mycoides* large colony (LC) tipinin test edildiği bir çalışmada, izolatların tilosin, nalidiksik asit, enrofloksasin, norfloksasin, siprofloksasin, doksisisin, spiramisin, spektinomisin, linkomisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, eritmosin, streptomisin ve gentamisine *in vitro* duyarlılıkları incelenmiştir. Etkenin en fazla duyarlı olduğu antibiyotiklerin florokinolonlar, makrolidler ve tetrasiklin olduğu, nalidiksik asit, gentamisin, streptomisin ve spektinomisine ise dirençli olduğu rapor edilmiştir (Antunes ve ark, 2007). Bulaşıcı agalaksinın tedavisinde antibiyotiklerin sistemik kullanılmaları tavsiye edilmekle birlikte, bazı özel durumlarda (örneğin kronik mastitis) meme içi uygulamalar da önerilmektedir. Diğer yandan anti-bakteriyel tedavinin beklenen sonuçları vermediğini, kronik artrit ve keratokonjunktivitis vakalarında sadece semptomatik tedavinin mümkün olduğu, antibiyotik uygulanan hayvanların taşıyıcı rollerinin devam ettiği bildirilmektedir. Uygun antibiyotiğin yeterli terapötik dozda uygulanmadığı durumlarda, ilaçlardan beklenen etkinin çok zayıf veya hiç olmayacağı bildirilmektedir. Bu durumda, etkenin çevreye salınımının devam edeceği ve muhtemelen antibiyotiklere direnç gelişebileceğine dikkat çekilmektedir (Madanat ve ark, 2001). Ayrıca, kronik artrit ve keratokonjunktivitis gelişen hayvanlarda tedavinin oldukça güç olduğu bildirilmektedir (OIE, 2013c).

2.1.2.7. Koruma

Bulaşıcı agalaksiden ari bölgelerde hastalık saptanan sürüler genellikle karantinaya alınıp, kesime sevk edilmelidir. Hayvan barınakları ve kullanılan eşyalar uygun dezenfektanlarla dezenfekte edilmelidir. Mikoplazma türleri sodyum hidroksit (%2'lik), sodyum karbonat (%4'lük), sodyum hipoklorid, formalin (%1'lik), kresol, iyonik ve non-iyonik birçok deterjana duyarlıdır. Endemik bölgelerde ise iyi bir sürü yönetimi uygulanarak, sürü içinde hastalığın yayılması azaltılabilir. Bu amaçla, öncelikle hayvan barınakları ve kullanılan eşyalar temizlenip, dezenfekte edilmelidir. Süt veren hayvanlar genç hayvanlardan ayrı bir yere alınmalıdır. Yavrulara bu dönemde pastörize süt ve kolostrum verilebilmektedir. Hayvanlar kültür ve ELISA gibi yöntemlerle test edilmeli ve pozitif olanlar sürüden ayrılmalıdır. Koyun ve keçilerde bulaşıcı agalaksiden korunmada canlı ve inaktif aşılar kullanılmaktadır. İnaktif aşılarla kısa süreli bağışıklık sağlandığı, canlı aşuların ise sadece klinik bulguları önlediği, yeterince koruma sağlamadığı ve sürü içinde bulaşmayı önlemediği ifade edilmektedir. Kısaca, canlı aşı uygulamalarının iki önemli dezavantajı olduğu bildirilmektedir. Bunlardan birincisi aşı suşu süt ile yayılabilmekte, diğeri de aşının sadece klinik bulguları önlediği, koruyucu düzeyde bir bağışıklık oluşturmadığıdır (OIE, 2013c). Ancak, doğal enfekte hayvanlardan izole edilen *M. agalactiae* suşundan hazırlanan attenuue canlı bir aşının, keçilerde hastalıktan korunmada olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Batı Avrupa ve Akdeniz Bölgesi'nde inaktif (adjuvanlı) aşılar yoğun olarak kullanılmaktadır (De La Fe ve ark, 2007). İspanya'da inaktif aşı uygulanan 66 keçi sürüsünde yapılan bir çalışmada, süt örnekleri kültür ve PCR, serum örnekleri ise ELISA ile test ederek, sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışmada, inaktif aşuların sadece klinik semptomları azalttığı, yeni infeksiyonları önlemediği, sürü içinde hastalığın yayılmasını engellemediği bildirilmiştir (Amores ve ark, 2012). Diğer yandan inaktif aşılarda lokal suşların kullanılması tavsiye edilmiş, bu uygulamanın korumada daha olumlu sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (De Le Fe ve ark, 2007; OIE, 2013c).

Enfekte hayvanların direkt ya da özellikle indirekt teşhis yöntemleriyle (sürü taramaları için ELISA gibi) belirlenerek sürüden uzaklaştırılması, enfekte sürülerin damızlıktan çıkarılarak kesime sevk edilmesi, düzenli olarak süt tanklarının bakteriyolojik analizlerinin yapılması ve ekipmanlarının dezenfekte edilmesi, enfekte hayvanlara ait sütlerin yavrulara verilmemesi, iyi bir işletme yönetimi uygulaması hastalığın prevalansında önemli derecede azalmalara neden olan başlıca faktörlerdir (Pepin ve ark, 2003).

Anneden yavruya bulaşmanın minimuma indirilmesi için pastörize kolostrum kullanılması, ortak çayır meraların enfekte hayvanlara kapatılması, horizontal bulaşmayı

engellemek için süt sağım hijyeninin dikkatle uygulanması önerilmektedir. Bugüne kadar meme içi kullanılan ilaçların mikoplazma infeksiyonunu tamamen önlediğine ilişkin bir veriye ulaşılmamıştır. Meme içi uygulamayla birlikte sistemik tedavilerin de yapılması tavsiye edilmektedir. Hastalıkla mücadelede Fransa'da uygulanan program dikkat çekicidir. *M. agalactiae* tarafından oluşturulan koyun ve keçilerdeki bulaşıcı agalaksi hastalığının kontrol ve eradikasyon programında öncelikle hayvanlar, klinik olarak muayene edilip, şüpheli hayvanlardan alınan örnekler (rneğin; süt) kültürü yapılmış ve hayvanların kan serumları ELISA ile analiz edilmiştir. Serum rnekleri sürü büyüklüğü de dikkate alınarak bir sürüden en az 20 hayvandan olmak üzere yılda 2 kez alınıp ELISA ile test edilmiş ve en az 1 adet serumda pozitiflik saptanması durumunda, o sürü pozitif olarak değerlendirilmiştir. Hayvan sürüleri kültür ve ELISA sonucuna göre; agalaksiden ari, şüpheli, enfekte ve ağır enfekte olarak 4 grupta sınıflandırılmıştır. Uygulama yaklaşık 11 yılı aşkın süreyle devam etmiş olup, infeksiyonun prevalansının %10'dan %1'e düştüğü bildirilmiştir (Lambert ve ark, 1998; Pepin ve ark, 2003).

İspanya'da hastalıkla mücadelede suni tohumlama uygulanan keçi sürülerinde, erkek hayvanlardan alınan semen ve kulaktan alınan svab örnekleri kültür ve PCR ile, serum örnekleri ise ELISA ile mikoplazma yönünden analiz edilmiştir. Bu yöntemle taşıyıcı hayvanların belirlendiği ve böylece hastalığın kontrolünde başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Gmez-Martin ve ark, 2012).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Araştırma materyalini oluşturan numunelerin toplanması, Mersin ilinde yer alan, keçi yetiştiriciliği yapılan aile tipi çiftliklerden 2018 yılı Ekim ve 2019 Mayıs ayları arasında gerçekleştirilmiştir. Bu çiftlikler serbest sistem yarı açık yapıda olup, standart rasyon programı uygulanmakta, manuel ve makine yoluyla sağım uygulanmaktadır. Araştırmamızda, 85-300 başlık hayvan kapasitesine sahip 5 çiftlikteki keçilerden, veteriner hekim tarafından alınmış 118 adet süt örneği kullanılmıştır. Çiftliklerden alınan numunelerin dağılımı Tablo 3’de gösterilmektedir. Örnelemeye hepsi sağım döneminde bulunan, son 1 ayda antimikrobiyel tedavi yapılmamış, en az bir doğum yapmış, 2-6 yaşlı, kıl keçisi ırkı hayvanlar dahil edilmiştir. Arthritis, artritise bağlı topallama ve mastitis klinik semptomlarının bir arada görüldüğü hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik mastitisin belirlenmesinde son 3 gün içinde meme bölgesinde görülen yangı belirtileriyle (ağrı, hassasiyet, kızarıklık, sıcaklık artışı ve fibrinöz doku oluşumu), sütte görülen değişiklikler (süt veriminin azalması, sütte kötü koku, sütün kanlı, irinli, pıhtılı olması) dikkate alınmıştır. Toplanan sütlerin *M. agalactiae* yönünden mikrobiyolojik analizleri, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Teşhis ve Analiz Laboratuvarında yapılmıştır.

Tablo 3. Çiftliklerden alınan numunelerin dağılımı

Çiftlik No	Alınan numune sayısı
1	21
2	19
3	27
4	23
5	28

3.1.1. Besiyeri, supplement ve solusyonlar

3.1.1.1. Besiyeri

3.1.1.1.1. Mycoplasma agar base (Oxoid® CM0401)

Bacteriological peptone	10 g
Lab-Lemco powder	10 g
Sodium chloride	5 g
Mineral supplement	0,5 g
Agar	10 g
Distile su	1000 ml

1000 ml distile su içine 35,5 g besiyeri ilave edildi ve karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içine 20 ml/80 ml besiyeri oranında Mycoplasma Supplement-G (Oxoid® SR0059) ilave edildi.

3.1.1.1.1. Mycoplasma broth base (Oxoid® CM0403)

Bacteriological peptone	10 g
Lab-Lemco powder	10 g
Sodium chloride	5 g
Mineral supplement	0,5 g
Agar agar	10 g
Distile su	1000 ml

1000 ml distile su içine 25,5 g besiyeri ilave edildi ve karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, 20 ml/80 ml besiyeri oranında Mycoplasma Supplement-G (Oxoid® SR0059) ilave edildi.

3.1.1.1.2. Mueller-Hinton agar (Oxoid® CM 129)

Mueller-Hinton agar	38 g
Distile su	1000 ml

pH: 7,3±0,2

Besiyeri 38 g olacak şekilde distile su içinde eritilip 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 45–50 °C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5 ml döküldü.

3.1.1.1.3. Brain Heart infusion broth (%20 Gliserinli) (Oxoid® CM 0225)

BHIB	8 g
Gliserin	20 ml
Distile su	80 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

3.1.1.1.4. Trypton soya broth (Oxoid® CM 129)

TSB	8 g
NaCl	75 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 5 ml miktarda steril tüplere dağıtıldı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

3.1.1.2. Supplement

3.1.1.2.1. Mycoplasma supplement-G (Oxoid® SR0059)

At serumu	20 ml
Maya ekstraktı	10 ml
Talyum asetat	25 mg
Kristal Penisilin	20000 IU

Toz halinde hazır olarak alınan supplement, 20 ml steril distile su ile sulandırıldıktan sonra 80 ml besiyerine sterilizasyondan sonra ilave edilmiştir.

3.1.1.3. Solusyonlar

3.1.1.3.1. Glukoz solusyonu

50 g D-glukoz (Sigma® 50-99-77) 100 ml distile su içinde eritilip 0,22 µm çaplı filtre ile sterilize edilerek +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3.2. Fenol red solusyonu

0,5 g Fenol red (Sigma® 143-74-8) 100 ml distile su içinde eritilip 0,22 µm çaplı filtre ile sterilize edilerek +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3.3. Arjinin solusyonu

5 g L-Arginin (Sigma 74-79-3) 50 ml distile su içinde eritilip, 0,22 µm çaplı filtre ile sterilize edilerek +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3.4. Sodyum fenolftalein difosfat solusyonu

0,5 g fenolftalein difosfat tuzu (Sigma 77-09-8) 50 ml distile su içinde eritilip, 0,22 µm çaplı filtre ile sterilize edilerek +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3.5. Tetrazolyum solusyonu

2 g 2,3,5 trifeniltetrazolyum klorid (Sigma 298-96-4) 50 ml distile su içinde eritilip 0,20 µm çaplı filtre ile sterilize edilerek +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3.6. Digitonin solusyonu

75 mg Digitonin (Sigma® 11024-24-1) 5 ml %95 etanol içinde eritilip, 56°C de 30 dk ısıtıldı. Soğuduktan sonra 0,22 µm çaplı filtre ile sterilize edilerek +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3.7. Nisin solusyonu

5,16 mg/ml (Sigma®, *Lactococcus lactis*, 24897751) olarak hazırlanıp +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3.8. Üre solusyonu

100 ml distile su içerisinde 1 gr üre (Merck Millipore® 1.08487.1000) ve 0.8 gr MnCl₂.4H₂O (Mangan (II) klorid-tetrahidrat Merck Millipore® 1.05927.1000) çözdürülmüştür. Daha sonra 0,22 µm filtrelerinden geçirilerek sterilize edilip +4 C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3.9. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8,0) buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base..... 121,1 g

Borik Asit61,83 g

EDTA 5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilip, pH: 8,0 ayarlanarak buzdolabında saklandı.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

10X TBE.....50 ml

Distile su.....950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

3.1.1.3.10. Jel loading buffer (6X)

Bromfenol Mavisi..... 25 mg

Sükroz4 g

H₂O10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

3.1.1.3.11. Tris (1M)

Tris Base121 g

Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7,6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 15 dk otoklav edildi.

3.1.1.3.12. TE buffer (10 mM tris, 1mM EDTA)

Tris (1M)..... .10 ml

EDTA(0,5 M)..... 2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlandı.

3.1.1.3.13. ExPrime taq premix (2X) (GeNet Bio®)

2X konsantrasyonda taq DNA polimeraz (1 u/10 µl), 2X reaksiyon buffer, 4 mM MgCl₂, enzim stabilitörü, sediment, pH 9,0, 0,5 mM her biri dATP, dCTP, dGTP, dTTP içermektedir.

3.1.4. DNA Ekstraksiyon Kiti

Mycoplasma sp. izolatlarından PCR aşamasında kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonu, Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification ekstraksiyon kiti ile gerçekleştirildi.

3.1.4.1. Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification Kit Prosedürü

- *Bir öze dolusu kültür 400 µl lizis solüsyonu ile süspanse edildi. 65°C’de 5 dk inkube edildi.
- *600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10000 rpm’de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
- *800 µl presipitasyon solüsyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.
- *10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solüsyonunda çözdürüldü.
- *300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C’de bekletildi. 10000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70’lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 2 µl template DNA kullanıldı.

3.1.5. Primerler

Çalışmada kullanılan *Mycoplasma sp.* cins spesifik 16S rRNA primerleri Pourbakhsh ve ark (2010), *Mycoplasma agalactiae* 16S rRNA primerleri Tola ve ark (1997) tarafından belirtilen şekilde üretici firmaya dizayn ettirilmiştir. Primer dizilimleri ve bant aralıkları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. *Mycoplasma* sp. ve *Mycoplasma agalactiae* primerleri

Primerler	Nükleotid sekansı	Ürün büyüklüğü	Referans
M1 F	5'-GCTGCGGTGAATACGTTCT-3'	163 bp	Pourbakhsh ve ark, (2010)
M3 R	5'-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3'		
FS 1	5'-AAAGGTGCTTGAGAAATGGC-3'	375 bp	Tola ve ark, (1997)
FS 2	5'-GTTGGCAGAAGAAAGTCCAATCA-3'		

3.1.6. Agaroz Jel

Agarose (Sigma®)..... 2 g

TBE (0,5X)100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3 dk kaynatılan karışım, 40-50°C'ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışıma 3 µl etidyum bromid ilavesinden sonra jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15 dk oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

3.1.7. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (ThermoScientific®) kullanıldı.

3.1.8. Ethidium Bromid

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında %1'lik Ethidium bromid (Sigma®) 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanan %1,5'lik agaroz jelin içerisine 5µl miktarında eklenerek kullanıldı.

3.1.9. Standart Suşlar

Biyokimyasal ve moleküler testlerde kalite kontrol suşu olarak *Mycoplasma agalactiae* ATCC® 35890 kullanılmıştır. PCR aşamasında negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC® 25922 standart suşu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Toplanması

Süt numuneleri alınmadan önce, meme başları dezenfektan ile temizlenip kurulanmış ve %70'lik alkol ile silinmiştir. Meme başındaki saprofit etkenleri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atılmıştır. Süt örnekleri steril tüpler içine 10 ml hacimde alınmıştır. Alınan 118 adet süt örneği soğuk zincir altında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına aynı gün getirilip laboratuvar araştırmalarına başlanmıştır.

3.2.2. Bakteriyel İzolasyon

İzolasyon amacıyla laboratuvara getirilen süt örnekleri, selektif sıvı besiyerinde 10^{-1} 'lik dilüsyonları hazırlanarak ekilmiştir. Süt örnekleri 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra ekimleri yapılmıştır. Ekimleri yapılan sıvı besiyerleri 37 °C'de %5 CO₂'li nemli ortamda mikroaerofilik olarak 7 gün süreyle inkube edilmiş ve besiyerleri günlük olarak takip edilmiştir. İlk 3 günlük inkubasyonun sonunda, homojen bulanıklık olmaksızın dipte tortu oluşturan ve sıvı besiyerinin üst kısmında pelikül tarzında üreme gösteren besiyerlerinden 50 µl hacimde alınıp selektif agara ekimleri yapılmıştır. Sıvı besiyerinde 7 gün sonunda üreme belirtisi gözlenmeyen inokulumlardan taze selektif sıvı besiyerine 0,5 ml tekrar pasaj yapılmış, 3 günlük inkubasyon periyodundan sonra bu sıvı besiyerlerinden 50 µl katı agarlara yeniden ekilmiştir. Üreme görülen katı besiyerlerinde kolonilerin yerleri belirlenip, tipik sahanda yumurta görünümlü kolonilerin varlığı yönünden stereomikroskop altında incelenmiştir. Numunelerin ekimi ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi Miles ve Nicholas (1998) tarafından bildirilen metotlara göre yapılmıştır.

3.2.3. Bakteriyel İdentifikasyon

Makroskopik koloni morfolojilerine göre *Mycoplasma* sp. olarak ön değerlendirmesi yapılan izolatların aşağıda belirtilen biyokimyasal testler ile identifikasyonları yapıldı.

3.2.3.1. Digitonin sensitivitesi

Testte kullanılan Mycoplasma agar 30-45 dk etüvde tutularak yüzeyi kurutuldu. Test edilecek izolatın ve kontrol kültürünün 10 katlı dilüsyonları yapıldı. 10^{-2} 'lik dilüsyondan agar

yüzeyine 200 µl miktarında yayıldı, pleyt oda ısısında bekletilip yüzeyi kurutulduktan sonra merkeze digitonin diski yerleştirildi, 37°C’de, nemli ortamda inkübe edildi.

3.2.3.2. Nisin sensitivitesi

Testte kullanılan Mycoplasma agar 30-45 dk etüvde tutularak yüzeyi kurutuldu. Test edilecek izolatın ve kontrol kültürünün 10 katlı dilusyonları yapıldı. 10⁻²’lik dilusyondan agar yüzeyine 200 µl miktarında yayıldı, pleyt oda ısısında bekletilip yüzeyi kurutulduktan sonra merkeze nisin diski yerleştirildi, 37°C’de, nemli ortamda inkübe edildi.

3.2.3.3. Glikoz fermentasyonu

Test edilecek izolatın 24 saatlik saf kültüründen 500 µl miktarında bir adet glikozlu ve bir adet glikozsuz besi yerine ekimleri yapıldı. Besiyerleri 37°C’de, nemli ortamda 48 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.4. Arjinin hidrolizi

Test edilecek izolatın 24 saatlik saf kültüründen 500 µl miktarında bir adet arjininli ve bir adet arjininsiz besi yerine ekimleri yapıldı. Besiyerleri 37°C’de, nemli ortamda 48 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.5. Fosfataz aktivitesi

Fosfataz testi için hazırlanan agar plağı ikiye bölündü. Test edilecek izolatın 24 saatlik saf kültüründen agarın yarısına 100 µl miktarında damlatma yöntemi ile ekim yapıldı, plağın diğer yarısı kontrol olarak boş bırakıldı. 37°C’de, nemli ortamda 5 gün inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.6. Tetrazolyum redüksiyonu

Test edilecek izolatın 24 saatlik saf kültüründen 2 ayrı tetrazolyum agar plaklarına 200 µl ml miktarında ekildi. Ekim yapılan agarın biri aerobik diğeri ise anaerobik koşullarda 37 °C’de, nemli ortamda 2 hafta inkübe edildi.

3.2.3.7. Film ve spot oluşumu

Üreme olan katı ve sıvı besiyerlerinin üst yüzeyinde oluşan ince bir tabaka (mum tabakası gibi) görüldüğünde film oluşumu olarak değerlendirildi.

3.2.3.8. Üre hidrolizi

Bir lama agar blok ile kesilen *Mycoplasma* sp. kolonisi koyuldu ve üzerine hazırlanan üre reaktifinden bir damla damlatıldı. Kolonin rengi, amonyak ve manganez dioksitten kaynaklı olarak kahverengiye dönüştüğünde üreaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirildi

3.2.4. Genotipik İdentifikasyon

3.2.4.1. *Mycoplasma* sp. 16S rRNA PCR aşaması

Araştırmamızda DNA ekstraksiyonu yapılan izolatların *Mycoplasma* sp. 16S rRNA PCR işlemleri Pooladgar ve ark (2015) tarafından bildirilen protokole göre yapıldı.

Mycoplasma sp. izolatlarından yapılan PCR işleminde 20 µl toplam hacimde, son konsantrasyonu 1x ExPrime Taq premix 10 µl, 1 µl primerler (her biri için 10 µM), olacak şekilde hazırlandı ve kalan miktar deiyonize su ile tamamlandı.

Mastermikslar hazırlandıktan sonra 0,2 ml'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 18'er µl hazırlanan mastermikslar ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra HiMedia PrimaTrio LA1006 termal döngüleme cihazına yüklenip, programlandı. 16S rRNA analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. *Mycoplasma* sp. 16S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç	1	94°C	7.5 dk
Denatürasyon		94°C	30 sn
Bağlanma	30	56°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

PCR kondisyonları 94° C’de 7,5 dakika ön denatürasyonu takiben 30 siklus olmak üzere 94° C’de 30 saniye denatürasyon, 56° C’de 30 saniye bağlanma, 72° C’de 1 dakika uzama ve 72° C’de 5 dakika son uzama aşamaları şeklinde gerçekleştirilmiştir.

PCR ürünleri %2’lik agaroz jelde elektroforteze tabi tutulmuş ve Vilbert Lourmat UV transilluminator cihazında jel görüntülemesi yapılmıştır. *Mycoplasma* sp. için 163 bp büyüklüğündeki bant oluşumu aranmıştır.

3.2.4.1. *Mycoplasma agalactiae* 16S rRNA PCR aşaması

Araştırmamızda genotipik identifikasyon sonucu *Mycoplasma* sp. olarak doğrulanan izolatların *M. agalactiae* 16S rRNA PCR işlemleri Pooladgar ve ark (2015) tarafından bildirilen protokole göre yapıldı.

Mycoplasma sp. izolatlarından yapılan PCR işleminde 20 µl toplam hacimde, son konsantrasyonu 1x ExPrime Taq premix 10 µl, 1 µl primerler (her biri için 10 µM), olacak şekilde hazırlandı ve kalan miktar deiyonize su ile tamamlandı.

Mastermikslere hazırlandıktan sonra 0,2 ml’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 18’er µl hazırlanan mastermikslere ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’lardan 2’şer µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra HiMedia PrimaTrio LA1006 termal döngüleme cihazına yüklenip, programlandı. 16S rRNA analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. *Mycoplasma agalactiae* 16S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç	1	95°C	5 dk
Denatürasyon		94°C	1 dk
Bağlanma	34	50°C	1 dk
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

PCR kondisyonları 94° C’de 5 dakika ön denatürasyonu takiben 34 siklus olmak üzere 94° C’de 1 dakika denatürasyon, 50° C’de 1 dakika bağlanma, 72° C’de 1 dakika uzama ve 72° C’de 5 dakika son uzama aşamaları şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %2’lik agaroz

jelde elektroforteze tabi tutulmuş ve Vilbert Lourmat UV transilluminator cihazında jel görüntülemesi yapılmıştır. *M. agalactiae* için 375 bp büyüklüğündeki bant oluşumu aranmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Fenotipik Bulgular

Toplanan 118 örneğin 10 adedinde ilk izolasyonda mikoplazma şüpheli koloniler görüldü. İlk izolasyonda üreme belirtisi gözlemlenmeyen ve kör pasajları yapılan besi yerlerinin hiçbirinde mikoplazma şüpheli koloniler saptanmadı. Mikoplazma şüpheli 10 örneğin ekiminin yapıldığı besiyerlerinde tipik sahanda yumurta görünümünü koruyan 10 (%8,4) örnek digitonin ve nisin sensitivitesi, glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi, tetrazolyum redüksiyonu, film/spot oluşumu ve üre hidrolizi testleri sonucunda *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirilmiştir. İzolatların biyokimyasal özellikleri Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. İzolatların biyokimyasal özellikleri

No	Digitonin Sensitivite	Nisin Sensitivite	Glikoz	Arjinin	Fosfataz	Tetrazolyum aerobik/anaerobik	Film/spot	Üre
1-3	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif
1-7	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif
1-15	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif/Pozitif	Negatif
2-61	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif
2-65	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Pozitif/Negatif	Negatif
2-74	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif
2-80	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif
2-93	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif/Negatif	Negatif
2-97	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif
2-100	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif/Pozitif	Pozitif/Pozitif	Negatif

4.1.1. Digitonin sensitivitesi

Testte kullanılan *Mycoplasma* agar 30-45 dk. etüvde tutularak yüzeyi kurutuldu. Test edilecek izolatın ve kontrol kültürünün 10 katlı dilasyonları yapıldı. 10⁻² lik dilasyondan agar yüzeyine 200 µl miktarında yayıldı, pleyt oda ısısında bekletilip yüzeyi kurutulduktan sonra merkeze digitonin diski yerleştirildi, 37°C’de, nemli ortamda inkübe edildi. Beş mm’den daha fazla inhibisyon zonu oluşturan izolatlar *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirildi (Miles ve Nicholas, 1998).

4.1.2. Nisin sensitivitesi

Testte kullanılan Mycoplasma agar 30-45 dk etüvde tutularak yüzeyi kurutuldu. Test edilecek izolatın ve kontrol kültürünün 10 katlı dilasyonları yapıldı. 10^{-2} lik dilasyondan agar yüzeyine 200 µl miktarında yayıldı, pleyt oda ısısında bekletilip yüzeyi kurutulduktan sonra merkeze nisin diski yerleştirildi, 37°C’de, nemli ortamda inkübe edildi. İnhibisyon zonu oluşturan izolatlar *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirildi (Miles ve Nicholas, 1998).

4.1.3. Glikoz fermentasyonu

Test edilecek izolatın 24 saatlik saf kültüründen 500 µl miktarında bir adet glikozlu ve bir adet glikozsuz besi yerine ekimleri yapıldı. Besiyerleri 37°C’de, nemli ortamda 48 saat inkübasyona bırakıldı. Ekim yapılmış glikozlu besi yerinde asidik reaksiyon görülmesi (rengin açık sarıya dönmesi) glikoz fermentasyonu pozitif olarak değerlendirildi. Renk değişikliği olmaması glikoz fermentasyonu negatif olarak değerlendirildi (Miles ve Nicholas, 1998).

4.1.4. Arjinin hidrolizi

Test edilecek izolatın 24 saatlik saf kültüründen 500 µl miktarında bir adet arjininli ve bir adet arjininsiz besi yerine ekimleri yapıldı. Besiyerleri 37°C’de, nemli ortamda 48 saat inkübasyona bırakıldı. Ekim yapılmış arjininli besiyerinde pembe renk oluşumu görüldüğünde arjinin hidrolizi pozitif olarak değerlendirildi. Renk değişikliği olmaması negatif olarak değerlendirildi (Miles ve Nicholas, 1998).

4.1.5. Fosfataz aktivitesi

Fosfataz testi için hazırlanan agar plağı ikiye bölündü. Test edilecek izolatın 24 saatlik saf kültüründen agarın yarısına 100 µl miktarında damlatma yöntemi ile ekim yapıldı, plağın diğer yarısı kontrol olarak boş bırakıldı. 37°C’de, nemli ortamda 5 gün inkübasyondan sonra 5 N sodyum hidroksitten birer damla kontrol ve üreme olan kısma damlatıldı. 1-2 dakika içerisinde kontrol kısmının rengi değişmeyip, üreme olan kısımda açık kırmızı renk oluştuğunda fosfataz pozitif olarak değerlendirildi (Miles ve Nicholas, 1998).

4.1.6. Tetrazolyum redüksiyonu

Test edilecek izolatın 24 saatlik saf kültüründen 2 ayrı tetrazolyum agar plaklarına 200 µl ml miktarında ekildi. Ekim yapılan agarın biri aerobik diğeri ise anaerobik koşullarda 37 °C’de, nemli ortamda 2 hafta inkübe edildi. Hem aerobik hem de anaerobik ortamda inkubasyona bırakılan besiyerlerinde stereomikroskopta pembe-kırmızı renk görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Miles ve Nicholas, 1998).

4.1.7. Film ve spot oluşumu

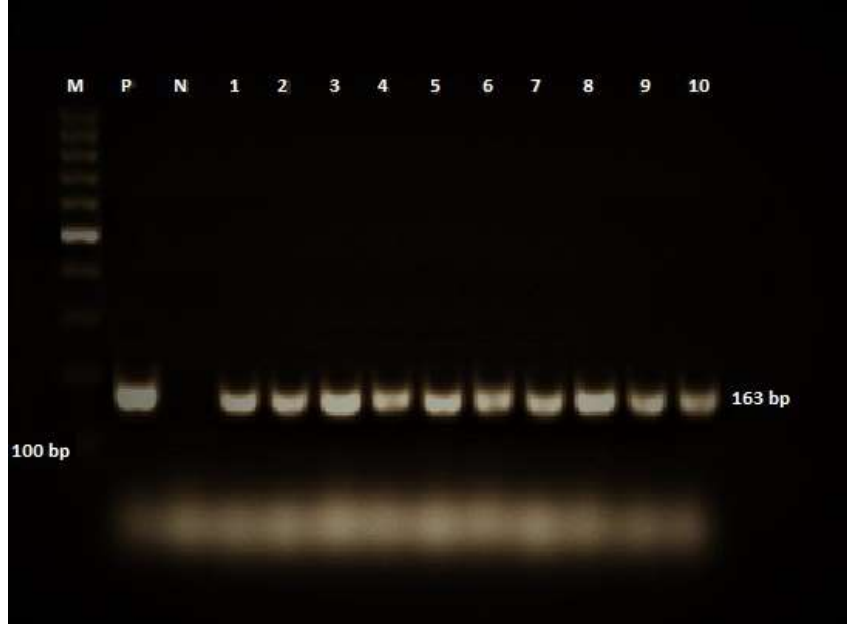
Üreme olan katı ve sıvı besiyerlerinin üst yüzeyinde oluşan ince bir tabaka (mum tabakası gibi) görüldüğünde film oluşumu olarak değerlendirildi. Stereomikroskopta incelemede agar içinde kolonilerin ortasında görülen koyu renkli siyah noktacıklar spot oluşumu olarak değerlendirildi (Miles ve Nicholas, 1998).

4.1.8. Üre hidrolizi

Mycoplasma sp. izole edilen tüm suşların kolonilerine damlatılan üre reaktifi sonucunda hiçbir renk değişimi gözlenmedi ve negatif olarak değerlendirildi.

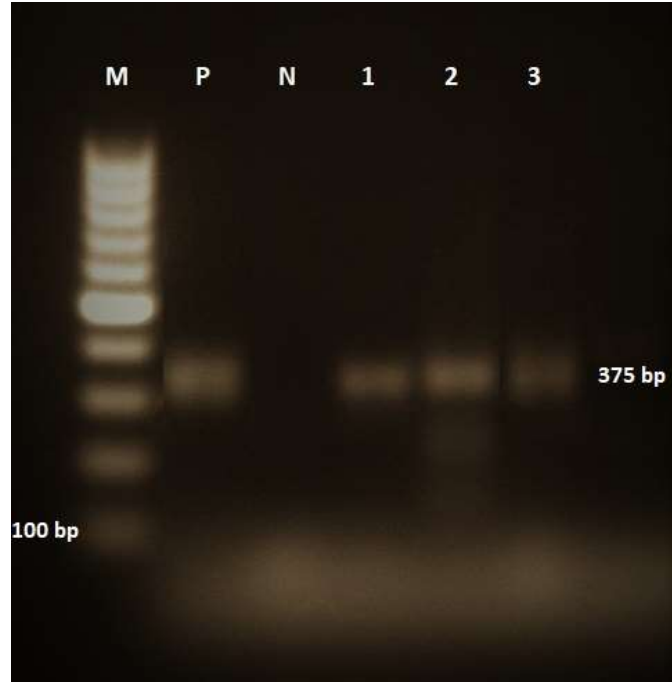
4.2. PCR Bulguları

İdentifikasyonu yapılan 10 örneğin 16S rRNA PCR amplifikasyonları agaroz jel elektroforezle görüntülenmiştir. Tüm *Mycoplasma* sp. izolatları (n:10) 163 bp bant aralığında 16S rRNA pozitif bulunmuştur (Resim 3).



Resim 3. *Mycoplasma* sp. izolatları jel elektroforez görüntüsü M: 100bp DNA ladder, P: Pozitif kontrol (*M. agalactiae* ATCC 35890), N:Negatif kontrol (*Escherichia coli* ATCC 25922), 1-10: *Mycoplasma* sp. pozitif örnekler

16S rRNA PCR ile pozitif bulunan örnekler *M. agalactiae* 16S rRNA geni için amplifiye edilmiş, 10 örneğin 7 (%70) tanesi 375 bp bant aralığında *M. agalactiae* olarak tespit edilmiştir (Resim 4).



Resim 4. *Mycoplasma agalactiae* izolatları jel elektroforez görüntüsü M: 100bp DNA ladder, P: Pozitif kontrol (*M. agalactiae* ATCC 35890), N:Negatif kontrol (*Escherichia coli* ATCC 25922), 1-3: *Mycoplasma agalactiae* pozitif örnekler

Mycoplasma sp. ve *M. agalactiae* olarak tanımlanan etkenlerin çiftlik bazında dağılımı Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Etkenlerin çiftlik bazında dağılımı

Çiftlik No	Numune No	<i>Mycoplasma</i> sp.	<i>M. agalactiae</i>
1	1-3	Pozitif	Negatif
	1-7	Pozitif	Negatif
	1-15	Pozitif	Pozitif
4	2-61	Pozitif	Pozitif
	2-65	Pozitif	Pozitif
	2-74	Pozitif	Pozitif
5	2-80	Pozitif	Pozitif
	2-93	Pozitif	Pozitif
	2-97	Pozitif	Pozitif
	2-100	Pozitif	Negatif

Pozitif numunelerin çiftlik bazında değerlendirilmesi sonucu 1 ve 4 nolu çiftlikten 3’er (%60) adet *Mycoplasma* sp., 5 nolu çiftlikten ise 4 (%40) adet *Mycoplasma* sp. tanımlanmıştır. *M. agalactiae* pozitif numuneler ise 1 nolu çiftlikten 1 adet, 4 ve 5 nolu çiftlikten ise 3 adet tanımlanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bulaşıcı agalaksi, küçük ruminantlarda çeşitli sendromlara neden olabilen mikoplazma kaynaklı bir hastalıktır (Bergonier ve ark, 1997). Hastalık, öncelikle meme bezlerini, eklemleri, gözleri, daha az sıklıkla ürogenital sistemi ve nadiren solunum yolunu etkilemesi ile karakterize edilmektedir. Klinik olarak mastitis, süt üretiminin düşmesi, poliartrit, keratokonjonktivitis, abortus ve septisemi kaynaklı kayıplar yüksek oranda önem arz etmektedir (Nicholas ve ark, 2008; Kheirkhah ve ark, 2011). *Mycoplasma agalactiae*, koyun ve keçilerde hastalığın ana nedenlerinden biridir (Bergonier ve ark, 1997; Nicholas ve ark, 2008). Bununla birlikte, *M. agalactiae*, özellikle koyunlarda bulaşıcı agalaksi hastalığının etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir (Bergonier ve ark, 1997). *M. agalactiae* keçi ve koyunlarda çok bulaşıcı olabilmektedir. Akut, subakut veya kronik şekillerde seyrebilmektedir (Gerco ve ark, 2001). Hastalık etkeni Güney Avrupa ve Güney Amerika, Kuzey Afrika, Akdeniz bölgesi ve Batı Asya'da yoğun olarak bildirilmiştir (Zendulkova ve ark, 2004). Genellikle laktasyon başladıktan hemen sonra ilkbaharda ortaya çıkmakta ve latent enfeksiyonun aktivasyonu ile birlikte dişi hayvanlardan süt emme yoluyla yavrulara iletilmektedir. Bulaşıcı agalaksi hastalık etkenlerinin ana kaynağı meme bezi olmaktadır (Nicholas ve ark 2008; Kheirkhah ve ark, 2011). Bu enfeksiyon her yaşta hayvanda ortaya çıkmıştır ancak gebe ve laktasyondaki hayvanlar daha hassas olmaktadır. Latent enfeksiyon sonrasında klinik belirtilerin ortaya çıkması 2 haftalık süreyi bulabilmektedir, ancak inkubasyon dönemini geçirdikten sonra 7 ay boyunca etkenin atılması devam etmektedir (Aytuğ ve ark, 1990). Keçilerde bulaşıcı agalaksi sendromunun etiyolojisinde yer alan tüm türler dahil olmak üzere birçok mikoplazma türü tanımlanmıştır (Amores ve ark, 2010). Tanısal bir yöntem olarak kültür maliyetli ve zaman alıcı olabilmekte ve aynı zamanda sonuçsuz kalabilmektedir (Zendulkova ve ark, 2004; Kheirkhah ve ark, 2011). Son yıllarda beri *M. agalactiae* identifikasyonu için moleküler testler kullanılmıştır. PCR yöntemi, süt örneklerinde *M. agalactiae*'nin tespiti için yapılan testlerden biri olmuştur (Tola ve ark, 1997).

Araştırmamızda keçi yetiştiriciliğinin yoğun olması ve göçebe yaşam tarzı dolayısıyla hayvanların sık yer değiştirmesi, bölgede bulaşıcı agalaksinın görülme sıklığı göz önünde bulundurulduğunda Akdeniz bölgesinde bulunan Mersin ili civarından numuneler toplanmıştır. Bölgede etiyolojik ajanı tespit etmeye yönelik çalışmaların azlığı nedeniyle *M. agalactiae* identifikasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Epidemiyolojik olarak bulaşıcı agalaksinın dünya çapında dağılımı, bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Garrido ve arkadaşları (1987) İspanya'da keçilerde kontakt agalaksi'nin en önemli etkeninin *M. agalactiae* olduğunu bildirmişlerdir. Tola ve arkadaşları (1997) koyun sütlerinde *M. agalactiae*'nin PCR ile saptanmasına ilişkin yaptığı çalışmada iki farklı gruba ait koyunları incelemişler, I. grupta yeni enfekte olmuş 357 koyun, II. grupta ise daha önce enfekte olmuş 87 koyun almışlardır. Bu çalışmada I. grupta 175 pozitif koyun tespit edilirken, ikinci grupta ise *M. agalactiae* tespit edilmemiştir. De La Fe ve arkadaşları (2005) Kanarya adalarında bulaşıcı agalaksinın varlığına ilişkin yaptığı çalışmada *M. agalactiae* oranını %27 oranında bulmuşlardır. Madanat ve arkadaşları (2002) Çek Cumhuriyeti ve Ürdün'deki koyun ve keçi sürülerinde *M. agalactiae*'nin varlığına ilişkin yaptığı çalışmada Ürdün'den toplanan 137 serum örneğinden 8 tanesi pozitif sonuç verirken, Çek Cumhuriyetinden toplanan 80 serum örneğinde *M. agalactiae*'ya rastlanmamıştır. Yine aynı araştırmacılar 2 yıl sonra koyun ve keçilerde *M. agalactiae*'nin saptanmasına yönelik yaptığı çalışmada Ürdün'den 35 hayvan, Çek Cumhuriyeti'nden ise 64 hayvan toplamışlardır. Ürdün'den toplanan hayvanların 10 tanesi *M. agalactiae* yönünden pozitif bulunurken, Çek Cumhuriyeti'nden toplanan hayvanlarda bu mikroorganizma tespit edilmemiştir. Bu durum Çek Cumhuriyeti'ndeki koyun ve keçilerin *M. agalactiae* yönünden negatif olduğunu göstermiştir. Amores ve arkadaşları (2010) iki farklı *Mycoplasma* (*M. agalactiae* ve *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*) türünün kulak sürüntü örneklerinde saptanmasında PCR ve standart kültür tekniklerini kıyasladıklarında PCR'nin daha etkili ve hızlı olduğunu tespit etmişlerdir. Amores ve arkadaşları (2012) süt örneklerine %10-30 gliserol eklendikten sonra yapılan numune dondurulması işleminin *Mycoplasma* türlerinin saptanmasında etkili olup olmadığını saptamak istemişler ve başlangıçtaki etken sayısı düşük olduğu takdirde yanlış sonuçlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Brezilya'nın kuzeydoğu endemik bölgelerinden yayınlanmış çalışmalarda, keçilerde bulaşıcı agalaksi prevalansı %20-%56.43 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (Bandeira ve ark, 2008). Buna karşılık, Paraíba Eyaletindeki keçiler arasında bulaşıcı agalaksi salgınları sırasında serolojik analiz sonucunda, %83.2 oranında daha yüksek prevalansta olduğu bildirilmiştir (Campos ve ark, 2009). Koyunlarda ve keçilerde enfeksiyon prevalansı değişmektedir. Güney Amerika'daki bir bulaşıcı agalaksi salgınında, morbidite oranı keçilerde %26 ve kuzularda %49 olarak bildirilmiştir (De Azevedo ve ark, 2006). Fransa'da ise Chazel ve arkadaşları (2010) agalaksinın en çok keçilerde *Mycoplasma mycoides* grubu etkenlerden kaynaklandığını, koyunlarda ise *M. agalactiae*'nin en yaygın etiyolojik tür olduğunu bildirmiştir. İspanya'da, Ariza-Miguel ve arkadaşları (2013), koyunlarda bulaşıcı agalaksi prevalansının, farklı çiftliklerde %50-100 arasında değiştiğini

bildirmiştir; Ürdün'de ise, Al-Momani ve arkadaşları (2008), koyunlarda %39, keçilerde %36 oranında prevalans olduğunu bildirmiştir. Alves ve arkadaşları (2013), PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada, *M. agalactiae* sıklığını keçi keçi sütünde %3,7 olarak bildirmiştir. Bu çalışmada keçi süt örneklerinde %6 oranında *M. agalactiae* tespit edilmiştir.

Yurdumuzda yapılan çalışmalarda Otlu ve arkadaşları (1997) Kars ili Digor ilçesinde 200 başlık bir koyun sürüsünde artrit, keratit ve mastitis gibi klinik bulgularla seyreden hastalık belirlenmiş bu bulgular göz önünde bulundurularak bulaşıcı agalaksi hastalığı üzerinde durmuşlardır. Hasta hayvanlardan alınan göz sürüntüsü, eklem sıvısı ve süt örneklerinin yapılan bakteriyolojik yoklaması sonucu örneklerden kültürel yoklamalar ve digitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, tetrazolyum redüksiyonu, fosfataz aktivitesi gibi biyokimyasal testler ile *M. agalactiae* izole ve tanımlanmıştır.

Marmara Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada 22 sürüden alınan toplam 144 örneğin 68'inde *Mycoplasma* sp. izole edilmiş, bunların 53 (%78)'ü *M. agalactiae* olarak tanımlanmıştır. Coğrafik olarak, Marmara bölgesinde hastalığın Ege ve Akdeniz bölgelerine göre daha yoğun olduğu belirtilmiştir (Özdemir ve Türkaslan, 2003). Çetinkaya ve arkadaşları (2010), süt örneklerinin bakteriyolojik ve spesifik PCR ile incelenmesi sonucunda örneklerde %81,7 oranında *M. agalactiae* saptamışlardır. Bu oran sonucunda, bulaşıcı agalaksi hastalığının Doğu Anadolu Bölgesi'nde diğer bölgelere göre daha endemik olduğu ortaya çıkmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu metoduyla *Mycoplasma* sp. etkenlerine spesifik selektif besiyerlerinde yapılan kültür sonucunda, kontaminasyon varlığının olmasına rağmen etkenlerin genetik yapılarının saptanabildiği bildirilmiştir, ayrıca moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı bulaşıcı agalaksinın laboratuvar tanısı için güvenilirlik, doğruluk ve zaman açısından avantaj sağlamaktadır. Moleküler bir tespit yöntemi olarak PCR, birçok laboratuvar rutin olarak kullanılmaktadır ve son derece hassastır, klinik numuneler üzerinde gerçekleştirildiğinde hızlı bir erken uyarı sistemi sağlayabilir ve sonuçlar pozitif olduğunda tam bir araştırma yapılmasını sağlamaktadır. Bulaşıcı agalaksi hastalığı için kültürlerdeki *M. agalactiae* tespit sınırı PCR sayesinde 2×10^2 cfu/ml'ye indirilmiştir (Nicholas, 2002). Göçmen (2014) ise uvrC-PCR metoduna göre yaptığı çalışmada süt örneklerinden %15,74 oranda *M. agalactiae* tespit etmiştir. Araştırmamız sonucunda yapılan MA-PCR (*Mycoplasma agalactiae*-PCR) yöntemi ile Mersin civarında %6 oranında *M. agalactiae* saptanmıştır. Araştırmamızda ise daha önceki verilere göre düşük oranda pozitiflik elde edilmiştir. Bu durumun sebebi ise ise numunelerin toplandığı bölgedeki hayvanların yüksek rakımda bulunmasına ve hayvan giriş çıkış yoğunluğunun ve hareketlerinin diğer bölgelere nazaran daha düşük seviyede olmasına dayandırılmıştır.

Bu alışmada, *M. agalactiae*'nin varlığı üç farklı keçi sürüsünde ortaya konmuştur. Daha spesifik olarak, hastalığın yayılmasını destekleyen koşullar, hayvanların sürülerde karışık olarak tutulması ve serbest dolaştırılması, kötü sağlık koşulları ve yetersiz hijyen olarak yorumlanmıştır. Özellikle keçi yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde hayvanların sıkışık şekilde barındırılması, kontrolsüz otlatma, koruma ve kontrol prosedürlere uyulmaması, daha önce yapılan antibiyotik tedavileri sonucunda hastalık etkeninin baskılanıp latent döneme geçmesi ile birlikte *M. agalactiae* salgın riski artmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda Mersin ili ve civarındaki kıl keçisi yetiştiriciliği yapılan çiftliklerinden toplanan süt numunelerinde *M. agalactiae* varlığının bakteriyolojik kültür ve moleküler yöntemlerle araştırılması, izolatların öncelikle cins bazında, daha sonra tür düzeyinde moleküler olarak identifikasyonu amaçlanmıştır.

Çalışmamızda kıl keçilerinden toplanan 118 adet süt numunesinden *Mycoplasma* selektif besiyerlerine ekimler yapılmış, izole edilen kolonilerin makroskopik, mikroskopik, bakteriyolojik ve biyokimyasal testler ile değerlendirilmesi sonucunda 10 (%8) adet izolatın *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 izolatın 7 (%70) adedi ise, *M. agalactiae* 16S rRNA spesifik PCR işlemi sonucunda *M. agalactiae* olarak tür bazında identifiye edilmiştir. Sonuçta 118 adet süt numunesinden 7 (%6) adet *M. agalactiae* tespit edilmiştir.

Bulaşıcı agalaksi hastalığının ekonomik önemi sürünün büyüklüğü, hayvanların bağışıklık durumu, hayvanların yoğun olarak bir arada barındırılması ve coğrafi şartlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. İnfeksiyonlar dünyanın bazı bölgelerinden eradike edilmiş olmakla birlikte, bazı bölgelerde endemik, bazı bölgelerinde ise sporadik olarak görülmektedir. Bulaşıcı agalaksi, ülkemizde kurak iklimlerde yoğun olarak görülmesine rağmen latent olarak seyredabilen ve ani salgınlar ile ekonomik kayıplara yol açabilen bir hastalıktır. Ayrıca kontamine sütle beslenen keçilerde ise septisemi ve pnömoniye bağlı olarak gelişen kilo kaybı ile oluşmaktadır. Hastalıktan korunmak için aşı masrafları, hasta hayvanların tedavi giderleri ve veteriner hekim hizmetleri de ekonomik kayıplar arasında sıralanabilmektedir. Bu ekonomik kayıplar, hastalığın eradikasyonu için alınan yetersiz önlemler ve aşı stratejilerinin geliştirilmesi gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Hayvan sağlığını etkileyen her türlü hastalık, ülkemizde hayvansal ekonomiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Keçi yetiştiriciliğinin önemli sorunlarından olan bulaşıcı agalaksi, infekte populasyonlarda önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Mikoplazma infeksiyonlarına karşı uygulanacak tedavi ve koruma programlarının planlanması için hastalığın varlığının bilimsel yöntemlerle ortaya konulması,

kayıt dışı hayvan giriş çıkışlarının önlenmesi ve epidemiyolojik srvey araştırmalarının yaygınlaştırılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

Al-Momani W, Nicholas RAJ, Abo-Shehada MN. Risk Factors Associated With *Mycoplasma agalactiae* Infection of Small Ruminants in Northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine* 2008, 83, 1-10.

Alves BHLS, Silva JG, Mota AR, Campos AC, Júnior JWP, Santos SB, Mota RA. *Mycoplasma agalactiae* in semen and milk of goat from Pernambuco state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2013, 33(11), 1309-1312.

Amores J, Corrales JC, Gómez-Martin A, Sanchez A, Contreras A, De Le Fe C. Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in ear svabs taken from goats. *Veterinary Microbiology* 2010, 140, 105-108.

Amores J, Sanchez A, Gómez-Martin A, Corrales JC, Contreras A, De Le Fe C. Surveillance of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in dairy goats herds. *Small Ruminant Research* 2012, 102, 89-93.

Antunes NT, Tavio MM, Assunc NT, Tavio MM, Assunção P, Rosales RS, Aquili V, De La Fe C, Poveda JB. *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* large colony type to 15 antimicrobials. *Veterinary Microbiology* 2007, 119, 72-75.

Ariza-Miguel J, Rodríguez-Lázaro D, Hernández M. A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. *BMC Veterinary Research* 2013, 8, 171.

Aydın N, İzgür, M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), 1. Baskı. Ankara, İlke-Emek Yayınları, Türkiye; 2006. s. 293-304.

Aytuğ CN, Alaçam E, Özkoç Ü, Yalçın BC, Güçgen H, Türker H. Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği, 1. Baskı. İstanbul, Tüm Vet Yayıncılık Hizmetleri Yayını No: 2, Türkiye; 1990. S. 171.

Bandeira DA, Castro RS, Azevedo EO, Nascimento ER, Melo LSS, Melo CB. Infection by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat herds in the microregions of Cariri in Paraíba State. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2008, 60, 1255-1258.

Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerging Infectious Diseases* 1997, 3(1), 21.

Bergonier D, Berthelot X, Poumarat F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Revue Scientifique et Technique* 1997, 16, 848-873.

Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007, 57(11), 2703-2719.

Campos AC, Teles JAA, Azevedo EO, Nascimento SA, Castro RS. ELISA protein G for the diagnostic of contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2009, 84, 70-75.

Chazel M, Tardy F, Le Grand D, Calavas D, Poumarat F. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Veterinary Research* 2010, 6(1), 32.

Citti C, Blanchard A. Mycoplasmas and their host: emerging and reemerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology* 2013, 21(4), 196-203.

Corrales JC, Esnal A, De La Fe C, Sanches A, Assunção P, Poveda JB, Contreras A. Contagious Agalactia in Small Ruminants. *Small Ruminant Research* 2007, 68, 154-166.

Çetinkaya B, Karahan M, Kalın R, Atıl E. Türkiye'nin Doğusundaki ruminant Mikoplazmalarının biyoçeşitliliği: Aşı ve kontrol stratejileri için uygulamalar. IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 05-07 Ekim, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 9-12, 2010.

Darzi MM, Gupta PP, Sood N. Clinical and immunopathological responses in goats following intramammary inoculation with *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* (F38). *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases* 1998, 19, 95-98.

Da Massa AJ, Wakenel PS, Brooks DL. Mycoplasmas of goats and sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1992, 4, 101-103.

De Azevedo EO, De Alcantara BDM, Elmiro RN, Tabosa MI, Barreto MI, Almeida JF, Araujo MD, Rodrigues ARO, Riet-Correa F, De Castro RS. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brasil: first report. *Brazilian Journal of Microbiology* 2006, 37, (4), 1-9.

De La Fe C, Assunção P, Antunes T, Rosales RS, Poveda JB. Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *Veterinary Journal* 2005, 170, 257-259.

De La Fe C, Assunção P, Saavedia P, Tola S, Poveda C, Poveda JB. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. *Vaccine* 2007, 25, 2340-2345.

De La Fe C, Amores J, Tardy F, Sagne E, Nouvel L, Citti C. Unexpected genetic diversity of *Mycoplasma agalactiae* caprine isolates from an endemic geographically restricted area of Spain. *BMC Veterinary Research* 2012, 8, 146.

Egwu GO, Nicholas RAJ, Ameh JA, Bashiruddin JB. Contagious bovine pleuropneumonia: an update. *Veterinary Bulletin* 2001, 66(9), 875-888.

Fusco M, Corona L, Onni T, Marras E, Longheu C, Idini G, Tola S. Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant antigens for rapid detection of antibodies against *M. agalactiae* in sheep. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007, 14(4), 420-425.

Garrido FL, Leon JL, Ladero L, Cueller L, Diaz MA. Contagious agalactia in Spain. CEC Meeting on Contagious Agalactia and other Mycoplasmal Diseases of Small Ruminants, 1-5, 1987, Nice, France.

Gerco G, Corrente M, Martella V, Pratelli A, Buonavoglia D. A multiplex PCR for the diagnosis of contagious agalactiae of sheep and goats. *Molecular and cellular Probes* 2001, 15, 21-25.

Gil MC, Hermoso de Mendoza M, Rey J, Alonso JM, Poveda JB, Hermoso de Mendoza J. Isolation of Mycoplasmas from the external ear canal of goats affected with contagious agalactiae. *Veterinary Journal* 1999, 158, 152-154.

Glew MD, Papazisi L, Poumarat F, Bergonier D, Rosengarden R, Citti C. Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infection and Immunity* 2000, 68(8), 4539-4548.

Gómez-Martin A, Corrales JC, Amores J, Sanchez A, Contreras A, Paterna A, De La Fe C. Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in semen. *Theriogenology* 2012, 77, 1252-1256.

Göçmen H. Marmara Bölgesinde Koyun ve Keçilerde *Mycoplasma agalactiae*'nin Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemler ile Araştırılması. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 2014.

Jevhlinger W, Chopra-Dewasthaly R, Glew M, Citti, Rosengasten R. Molecular basis of *Mycoplasma agalactia* pathogenicity. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2004, 117(11-12), 472-479.

Kheirkhah B, Pourbakhsh SA, Nadalian MG, Banani M, Ashtari A. (2011). Detection of *Mycoplasma agalactiae* by culture and polymerase chain reaction (PCR) methods from Iranian goats. *African Journal of Microbiology Research* 2011, 5(13), 1668-1672.

Kinde H, Da Massa AJ, Patricia S, Wakenell RP. *Mycoplasma* infection in a commercial goat dairy caused by *M. agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1994, 6, 423-427.

Krieg N, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2. Baskı. New York, Springer, ABD, 2010. p. 709-713.

Lambert M, Calamel M, Dufour P, Cabasse E, Vitu C, Pepin M. Detection of false-positive sera in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1998, 10, 326-330.

Madanat A, Zedulkova D, Posbisil Z. Contagious agalactiae of sheep and goats: A Review. *Acta Veterinaria Brno* 2001, 70, 403-412.

McAuliffe L, Ellis RJ, Miles K, Ayling RD, Nicholas RA. Biofilm formation by *Mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology* 2006, 152(4), 913-922.

Miles R, Nicholas R. *Mycoplasma* Protocols, 1. Baskı. Totowa, Humana Press, ABD, 1998. p. 27-39.

Niang M, Rosenbusch R, Debey MC. Field isolates of *Mycoplasma ovipneumoniae* exhibit distinct cytopathic effects in ovine tracheal organ cultures. *Journal of Veterinary Medicine* 1998, 45, 29-40.

Nicholas RAJ. Improvement in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Ruminant Research* 2002, 45, 145-149.

Nicholas RAJ, Ayling RD, Loria GR. Ovine mycoplasmal infections. *Small Ruminant Research* 2008, 76, 92-98.

OIE. Contagious Bovine Pleuropneumonia. 2013a, Erişim Tarihi: 11.05.2019, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013, World Organisation for Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.09_CBPP.pdf.

OIE. Contagious Bovine Pleuropneumonia. 2013b, Erişim Tarihi: 11.05.2019, Technical Disease Cards, World Organisation for Animal Health: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/AnimalHealthintheWorld/docs/pdf>.

OIE. Infection with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (Contagious bovine pleuropneumonia). 2013c, Erişim Tarihi: 11.05.2019, Terrestrial Animal Health Code (2013), World Organisation for Animal Health: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.11.8.html.

OIE. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014. 2014, Erişim Tarihi: 25.05.2019. World Organisation for Animal Health: <http://www.oie.int/en/animalhealth-in-the-world/oie-listed-diseases-2014>.

Otlu S, Aydın F, Genç O, Taş C. Koyunlarda gözlenen kontagiyözagalaksi hastalığı üzerinde klinik ve bakteriyolojik araştırmalar. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 1997, 28(1), 33-38.

Özdemir Ü, Türkaslan J. Bulaşıcı agalaksi salgınlarından izole edilen *Mycoplasma* türleri. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2003, 34, 1-2.

Pepin M, Dufour P, Lambert M, Aubert M, Valognes A, Rotis T, Van de Wiele A, Bergonier D. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of contagious agalactia in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2003, 15(3), 281-285.

Peyraud A, Woubit S, Poveda JB, De La Fé C, Mercier P, Thiaucourt F. A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agent the contagious agalactiae syndrome of goats. *Molecular and Cellular Probes* 2003, 17(6), 289-294.

Pilo P, Frey J, Vilei EM. Review: Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Veterinary Journal* 2007, 174, 513-521.

Pourbakhsh SA, Shokri GR, Banani M, Elhamnia F, Ashtari A. Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. *Archives of Razi Institute* 2010, 65(2), 75-81.

Pooladgar AR, Looni R, Ghaemmaghami S, Puorbakhsh A, Ashtari A, Ali Shirudi A. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and polymerase chain reaction (PCR) from affected sheep to Contagious agalactia of Khuzestan province, Iran. *Archives of Razi Institute* 2015, 70(1), 21-27.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FS, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2. Baskı. West Sussex, Blackwell, İngiltere, 2011. p. 147-155.

Tola S, Angioi A, Rocchigiani AM, Indini G, Manunta D, Gallri G, Leori G. Detection of *M. agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 1997, 54, 17-22.

Thiaucourt F, Bolske G, Leneguersh B. Diagnosis and control of contagious caprine pleuropneumonia. *Revue Scientifique et Technique* 1996, 15, 1415-1429.

Vogl G, Plaickner A, Szathmary S, Stipkovits L, Rosengarten R Szostak MP. *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. *Infection and Immunity* 2008, 76(1), 71-77.

Wesonga H, Lindberg R, Litamoi JK. Late lesions of experimental contagious caprine pleuropneumonia caused by *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Journal of Veterinary Medicine* 1998, 45, 105-114.

Zendulcova D, Ball HJ, Madanat A, Lany P, Pospisil Z. Detection of *Mycoplasma agalactiae* antigen in sheep and goats by monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Acta Veterinaria Brno* 2004, 73, 461-464.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ULUGANLIGİL, Ramazan
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Adana 15/02/1987
Telefon : 05389639979
E-mail : ramazan.uluvethek@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce (YDS)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji A.B.D.	23/08/2019
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	01/06/2012
Lisans	Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi Kamu Yönetimi	27/05/2019

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2009-2010	Sarayönü Gözlu TİGEM	Stajyer Öğrenci
2010-2012	Adana Garip Tavukçuluk	Stajyer Öğrenci
2012-2013	Hakkari Otluca Dağ ve Komando Tugay Komutanlığı	Yedek Subay Veteriner Hekim
2013-2019	Erdemli İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü	Veteriner Hekim