



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIĞIR PNÖMONİLERİNDE *MYCOPLASMA BOVIS*
VARLIĞININ KÜLTÜR VE ELISA YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Kaan ÖNAT

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN

Bursa-2011

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	III
İNGİLİZCE ÖZET	IV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ ve YÖNTEM	26
GEREÇ	26
Akciğer Örnekleri	26
Standart Suş	27
Mycoplasma Besiyerlerinde Kullanılan Stoklar	27
Antiserumlar	28
Besiyerleri	29
ELISA Kiti	31
Diğer Gereçler	32
YÖNTEM	35
Bakteriyolojik İnceleme	35
İzolasyon Çalışmaları	35
Akciğer Homojenatı Hazırlanması	35
Akciğer Örneklerinin Besiyerine Ekimi	35
Pasajlama	35
Kolonilerin Klonlanması	36
İdentifikasyon Çalışmaları	36
Digitonin Sensitivitesi	36
Glikoz Fermentasyonu	36
Arjinin Hidrolizi	37
Fosfataz Aktivitesi	37
Tetrazolium Redüksiyonu	37
Film ve Spot Oluşumu	37
Üreme İnhibisyon Testi	37
Serolojik İnceleme	38
Sandwich ELISA	38
BULGULAR	41
Makroskobik Bulgular	41
İzolasyon Çalışmaları	41
İdentifikasyon Çalışmaları	43
Digitonin Sensitivitesi	43
Glikoz Fermentasyonu	43
Arjinin Hidrolizi	43
Fosfataz Aktivitesi	43
Tetrazolium Redüksiyonu	43
Film ve Spot Oluşumu	43
Üreme İnhibisyon Testi	44

Diğer Bakteriyel Etkenler Yönünden Bakteriyolojik İncelemeler	44
Sandwich ELISA Sonuçları	45
TARTIŞMA VE SONUÇ	48
KAYNAKLAR	55
TEŞEKKÜR	77
ÖZGEÇMİŞ	78

ÖZET

Bu tez çalışmasında, Bursa ve çevresinde pnömonili sığırlarda *M. bovis*'in varlığının kültür yöntemi ve Sandwich ELISA ile araştırılması amaçlandı. Bu amaçla Bursa bölgesindeki mezbahalarda kesilen sığırların akciğerleri ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen akciğer örnekleri değerlendirildi. Çalışmada toplam 1492 hayvanın akciğerleri incelendi, bunlardan 152'sinde (% 10,39) makroskobik olarak pnömoni bulguları gözlenerek örnek alındı. Bu örneklerin bakteriyolojik incelemesi sonucu 39 (% 25.65) *Mycoplasma spp.* izole edildi. *Mycoplasma spp.* olarak değerlendirilen 39 izolatin biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testleri ile yapılan identifikasyonlarında; 38'i (% 97.43) *M. bovis*, 1 tanesi *M. bovirhinis* (% 2,5) olarak tanımlandı. *M. bovis* bu pnömonilerin önemli bir oranında tek başına izole edilirken 30/152 (% 19,7), bazı vakalarda 8/152 (% 5,2) *M. bovis* ile birlikte koenfekte olarak diğer bakteriyel etkenlerinde de rol aldığı gözlemlendi.

Bu çalışmada *Mycoplasma spp.* olarak izole edilen 39 örnek ve mycoplasma yönünden negatif bulunan 5 örnek olmak üzere toplam 44 örnekten hazırlanan akciğer homojenatlarından *M. bovis*'in hızlı tespiti amacıyla Sandwich ELISA yapıldı. Test sonucunda *M. bovis* olarak identifiye edilen 38 örneğin hepsi Sandwich ELISA'da pozitif sonuç verirken, *M. bovirhinis* olarak identifiye edilen 1 örnek ve ayrıca Mycoplasma izole edilemeyen 5 örneğin hepsi Sandwich ELISA'da negatif sonuç verdi.

Sonuç olarak *M. bovis*'in bölgemizdeki sığır pnömonilerinde yaygın olarak bulunan bir etken olduğu gözlemlendi. Ayrıca sığırlarda pnömoni olgularında *M. bovis*'in primer etken olarak değerlendirilmesi ve rutin laboratuvar analizlerinde diğer bakteriyel etkenlerle birlikte *M. bovis*'in de varlığının araştırılması gerekliliği ortaya kondu. Klinik örneklerden *M. bovis*'in teşhisinde Sandwich ELISA yönteminin yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olduğu ve rutin olarak güvenle kullanılabilceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *M. bovis*, pnömoni, sığır, Sandwich ELISA

SUMMARY

The aim of this study was to detect *M. bovis* by culture and Sandwich ELISA from pneumonia of the slaughtered cattle in Bursa region. For this purpose, the lung samples were collected from both slaughterhouses in Bursa region and from laboratory of Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Uludag University. A total of 1492 lung samples was examined, and 152 samples (% 10.39) with lesions of pneumonia were evaluated. Thirty nine (% 25.65) *Mycoplasma spp.* were isolated from the lung samples by culture. Among 39 *Mycoplasma* isolates; 38 (% 97.43) were identified as *M.bovis* and 1(% 2.5) as *M .bovirhinis* by using biochemical and growth inhibition tests. *M. bovis* was purely isolated from 30 lung samples, whereas different types of bacteria, together with *M. bovis* were also isolated from 8 lung samples.

A total of 44 lung homogenates from 39 *Mycoplasma* positive and 5 *Mycoplasma* negative samples was examined by Sandwich ELISA for rapid detection of *M .bovis*. Thirty eight samples which were found to have *M .bovis* were also positive by Sandwich ELISA. One sample was determined to harbour *M. bovirhinis* and *Mycoplasma* culture negative 5 samples gave negative reaction in Sandwich ELISA.

In conclusion, this study revealed that *Mycoplasma bovis* was very common cause of cattle pneumonia in Bursa region. Furthermore, *M. bovis* should be evaluated as primary cause of pneumonia of cattle and presence of *M. bovis* should be routinely examined together with the other respiratory bacterial pathogens. Sandwich ELISA was found highly specific and sensitive and can be used routinely for detection of *M. bovis* from the clinical samples.

Key Words: *M. bovis*, pneumonia, cattle, Sandwich ELISA.

GİRİŞ

Türkiye’de sığır yetiştiriciliği ülke ekonomisi açısından önemli yer tutmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2009 yılı geçici verilerine göre ülkemizde toplam 10.723.958 adet sığır bulunmakta ve 412.621 ton olan yıllık et üretiminin % 78.83’ü (325.286 ton) ve 12.542.185 ton olan yıllık süt üretiminin % 92.35’i (11.583.313 ton) sığırlardan sağlanmaktadır (1).

Ülkemizde sığır yetiştiriciliği yaygın olmasına rağmen üretim parametreleri bakımından özellikle Avrupa ülkelerinin çok gerisinde kalmaktadır. Hayvansal üretimdeki kayıplar başlıca hayvanların bakım ve besleme koşullarının yetersizliği, hayvan sahiplerinin bilinçsizliği ve bunların sonucunda hayvanlarda gözlenen infeksiyonlar nedeniyle meydana gelmektedir.

Solunum sistemi hastalıkları sığırlarda ekonomik kayıplara yol açan infeksiyonlar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Sığırlarda solunum sistemi infeksiyonlarının büyük bölümünü pnömoniler oluşturmaktadır. Sığır solunum hastalıkları kompleksi (BRD) sığırların önemli bir hastalığıdır (2). Pnömoni oluşumunda başlıca bakteriler, virüsler ve mantarlar rol oynar. Patojenik Mycoplasmalar sığırlarda gözlenen bakteriyel pnömoni olaylarında önemli bir yer tutmaktadır (3). Sığırların solunum sistemi mukoz membranlarına kolonize olan çeşitli Mycoplasma türleri vardır, bunların bazıları patojenik iken bazıları normal floranın bir parçasıdır (4, 5). Sığırlarda Mycoplasmaların neden olduğu hastalıklar çok önemli olmasına rağmen, bunların rolü genelde göz ardı edilir (6). Dünya Hayvan Sağlık Örgütü (OIE) bakteriyel hastalıklar A listesinde yer alan Bulaşıcı Sığır Pleuro Pnömonisi (CBPP)’nin etkeni olan *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC dışında diğer Mycoplasma türleri de solunum, veneral ve diğer hastalıklara neden olabilmektedir. Bunlar arasında *M. bovis* Avrupa ve Kuzey Amerika’da sığır Mycoplasma infeksiyonlarında en yaygın ve en patojenik Mycoplasma türüdür ve sığır pnömonilerinin en önemli nedenidir (7, 8). *M. bovis* sığırlarda solunum sistemi hastalıklarında sıklıkla *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* ve solunum yollarını etkileyen virüsler ile birlikte hastalığının şiddetini arttırarak, morbidite ve mortalitenin artışına sebep olur. Ayrıca *M. bovis* tek başına da hastalık oluşturabilecek bir patojendir (9, 10). *M. bovis* solunum sistemi dışında özellikle genç hayvanlarda artrit olmak üzere sığırlarda farklı sistemlerde de çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir (11).

M. bovis infeksiyonunun olası ekonomik maliyetini; canlı ağırlık kazancı ve yemden yararlanmada düşüş, hasta hayvanların tedavi giderleri, ölümlerden dolayı oluşan kayıplar ve koruyucu önlemler için harcanan giderler oluşturmaktadır (11). İngiltere’de yılda yaklaşık 1,9 milyon kadar sığırın solunum hastalıklarından etkilenmesinin sığır endüstrisine maliyetinin 54 milyon EURO olduğu tahmin edilmektedir (3). Bunun yanında pnömoni ve buna bağlı hastalıklar sonucu ölen yaklaşık 157.000 buzağının yıllık bazda potansiyel değeri 99 milyon EURO’ dur. Avrupa çapında yaklaşık 90 milyon sığırın etkilendiği ve toplamda 576 milyon EURO kaybın olduğu düşünülmektedir (12). Bununla birlikte bu kayıplarda sadece *M. bovis* infeksiyonlarının neden olduğu maliyeti hesaplamak ancak tahmini değerler ile mümkün olabilmektedir (11). *M. bovis* infeksiyonlarının Avrupa sığır endüstrisi için yıllık maliyeti 144 milyon EURO, Amerika Birleşik Devletleri’nde ise 32 milyon USD civarı olduğu tahmin edilmektedir (13). Ayrıca buzağı başına; sütçü buzağılarda 25 EURO, etçi buzağılarda 58 EURO yıllık zarar hesaplanmıştır. Ekonomik zararların dışındaki zararlar da oldukça önemlidir; kronik pnömoni önemli bir sağlık sorunudur, hasta hayvanların çeşitli antibiyotikler ile uzun süreli tedavisi diğer patojenlerde antibiyotik direnci gelişmesine yol açmaktadır (11).

M. bovis infeksiyonu Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Avrupa’nın birçok ülkesinde görülmektedir (11). Ülkemiz dışında yapılan seroprevalans çalışmalarında birçok sürü *M. bovis* yönünden serolojik olarak incelenmiştir. Seropozitif sürülerin prevalansı çalışmalar arasında ve aynı çalışmada farklı coğrafik bölgelerde ciddi anlamda farklılık göstermektedir (% 28 ile % 90 arası) (14-16). Sürüler içerisinde de seropozitifliğin prevalansı üniform değildir Sütten kesilmemiş etçi buzağılarda prevalans % 20’nin altında iken, diğer yaş gruplarında % 40’ın üzerinde seropozitiflik bulunmuştur (14). İngiltere’de pnömonili sürülerdeki hayvanlarda % 20-25 oranında *M. bovis* antikoruna saptanmıştır (17). Radaelli ve arkadaşları (18), İtalya’da serolojik olarak etçi sığırların % 76’sında, buzağuların ise % 100’ünde *M. bovis* antikoruna tespit etmişlerdir.

Ter Laak ve arkadaşları (5), Hollanda’da besi sürülerinde yaptığı araştırmada *M. bovis*’in yaygınlığını % 20 olarak bulmuştur. 1994 ‘ten bu yana Kuzey ve Güney İrlanda’da pnömonili akciğerlerden *M. bovis* % 13-23 arası oranlarda izole edilmiştir (19, 20). Fransa’da pnömonili buzağı sürülerinde % 30 oranında izole edilirken (14), Tenk ve arkadaşları (15), pnömonili akciğer örneklerinden % 11,8 oranında *M. bovis* izole etmişlerdir. Radaelli ve arkadaşları (18), bakteriyolojik incelemede 64 pnömonili buzağının 16 ‘sından (% 25) *M. bovis* izole ederken, ergin etçi sığırlardan hiç izole edememişlerdir. Kuzey İrlanda’da 1999-2005 yılları arasında yapılan bir çalışmada

toplam 214 sürüde 1328 numuneden 282'sinde (% 21) kültür ve antijen capture ELISA yöntemi ile *M. bovis* tespit edilmiştir (21).

Dünyadaki çalışmalar ile karşılaştırıldığında ülkemizde sığırlarda Mycoplasma infeksiyonları ile ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Erzurum ilinde sığırlarda gözlenen pnömoni olguları üzerinde yapılan bir araştırmada *Mycoplasma spp.*'nin insidensinin % 3,6 olduğu bildirilmiştir (22). Bursa Yenişehir'de solunum yolu infeksiyonu görülen 87 başlık sürüde yapılan çalışmada kesim sonrası pnömoni bulgusu gösteren 12 akciğerden kültür yöntemi ile *Mycoplasma mycoides subs. mycoides* izole edilmiştir (23). Trakya ve Marmara Bölgesi'nde buzağı ve dana pnömonilerinde etken izolasyonuna yönelik olarak yapılan bir araştırmada *M. bovis*'in prevalansının % 7,5 olduğu bildirilmiştir (24). Kars bölgesinde 100 pnömonili sığırdaki yapılan bir diğer çalışmada bakteriyolojik incelemede Mycoplasma izole edilmemiş, PCR ile fibrinli pnömoni görülen 4 vakada *M. bovis* tek başına, 1 vakada ise *M. bovirhinis* ile koenfekte *M. bovis* ve *M. dispar* tespit edilmiştir (25). Çetinkaya ve arkadaşları (26), *M. bovis*'i pnömonili sığır akciğerlerinden % 50, burun svablarından ise % 81,3 oranında izole etmişlerdir. Ayrıca Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nde yapılan bir çalışmada buzağı akciğerlerinde *M. bovis*'e sıklıkla rastlandığı ortaya konmuş ve etkenin görülme sıklığının % 41,3 olduğu rapor edilmiştir (27).

Ülkemizde buzağı ve sığırlarda özellikle kış aylarında pnömoni vakaları artmaktadır. Bursa ve çevresi sığır yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerden biridir. *M. bovis*'in izolasyonu ve identifikasyonu güç olduğu ve pnömoni olgularında başka bakterilerin de katılımı ile miks infeksiyonlar olduğu için çoğunlukla hastalığın patogenezinde çok önemli role sahip olan *M. bovis* gözden kaçmaktadır ve böylece hastalığın kontrolü zorlaşmakta ve ülke hayvancılık ekonomisi büyük zarara uğramaktadır. Ayrıca ülkemizde *M. bovis* infeksiyonu ile ilgili yeterli sayıda çalışma yoktur. Bu tez çalışmasında, Bursa ve çevresindeki mezbahalarda kesilen pnömonili sığırlarda *M. bovis*'in varlığının kültür yöntemi ve Sandwich ELISA ile araştırılması amaçlanmıştır. Tezin sonuçları pnömoni vakalarında *M. bovis* 'in rolünü ve bölgedeki durumunu ortaya koyacak, ayrıca Türkiye'de ilk olarak kullanılan Sandwich ELISA metodunun spesifitesi ve klinik örneklerde kullanımını hakkında fikir verecektir.

GENEL BİLGİLER

Mycoplasma etkenleri ilk kez 1898 yılında Nocard ve Roux tarafından Sığırların Pleuro Pneumoni olgularından izole edilmişlerdir. Bu mikroorganizmalara PPLO (Pleura Pneumonia Like Organism) adı verilmiş ve 1929 yılında bu etkenlerin Mycoplasma adı altında isimlendirilmesi uygun bulunmuştur (28).

M. bovis ilk olarak 1961'de Amerika'da bir sığırdaki şiddetli mastitis vakasından izole edilmiştir (29). İlk olarak *Mycoplasma bovimastitidis* sonra da *Mycoplasma agalactiae*'nin neden olduğu koyunlardaki kontagiyöz agalaksiya ile çok benzer klinik görünümüne sahip olduğundan *Mycoplasma agalactiae subs. bovis* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 16S ribozomal RNA özelliklerine göre türler sınıflamasında *Mycoplasma bovis* adını almış, 1976'da solunum sistemi etkeni olarak tanımlanmıştır (30, 31).

Bergey's Manual'in 2004 taksonomisine göre Mollicutes (mollis= yumuşak, cutis= deri) sınıfında, Mycoplasmatales dizisindeki Mycoplasmataceae familyasında Mycoplasma, Eperythrozoon, Haemobartonella ve Ureaplasma cinsleri bulunmaktadır (32). Mycoplasma (Mikoplazma) terimi; 'myces' (mantar) ve 'plasma' (biçim) kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur (33). *M. bovis*, Mycoplasma cinsine dahildir (32). *M. bovis* birçok yönden *M. agalactiae* ile çok benzerdir. Bu türler aralarında 16S RNA sekansları yönünden % 99 homoloji gösterirler ve sadece 8 nükleotidlik çok küçük bir farklılık vardır (34). Mycoplasmaların genom büyüklüğü 580-1380 kb arasında değişmekle beraber *M. bovis*'in genomik büyüklüğü $961 \pm 18,9$ Kbp olarak belirlenmiştir (35).

Mycoplasmataceae familyasının üyeleri olan Mycoplasma ve Ureaplasmalar en küçük prokaryotlardır ve Clostridium, Streptococcus ve Lactobacillus genusunun üyeleri ile filogenetik olarak ilişkilidir. Bu genusun üyeleri küçük genom yapısı ve replikasyon için sınırlı metabolik özelliklere sahip olması ile diğer bakterilerden ayrılır. Sınırlı biyosentez özellikleri nedeni ile Mycoplasmaların nutrisyonel gereksinimleri komplekstir ve invivo ortamda konakçıya (ekzojen yağ asitleri, amino asitler, nükleik asit prekürsörleri, lipid prekürsör molekülleri ve vitaminler) bağlıdır. Ekzojen yağ asitleri ve kolesterole gereksinim duyarlar. Kolesterole gereksinimi Mycoplasmataceae familyasını benzer organizmalardan ayırır ve digitonine duyarlı hale getirdiği için identifikasyonları için yararlıdır. Mycoplasma genusu, bazıları insan ve hayvanlarda kronik hastalıklara

neden olabilen 100 den fazla türü içerir. Mycoplasmaların çoğu tür spesifik konakçı-etken ilişkisine sahiptir ya da bazı anatomik bölgelere tropizm gösterir (36).

Mycoplasma cinsine dahil türler hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür (36, 37). Mycoplasmalar yapısal olarak basittir, Ribozomlar, DNA ve bunu saran steroller, fosfolipidler ve proteinlerden oluşan trilaminar sitoplazmik membrandan oluşur (36). Peptidoglikan polimerlerinden yoksun olmasından ötürü elektron mikroskopik incelemede 3 tabakalı şekilde görülen bu yapıya “ünit membran” denir (28, 36, 37). Ünit membranın bileşimindeki bu maddeler mikroorganizmanın antijenik yapısından sorumludur. Peptidoglikan yapısı olmaması sebebiyle Mycoplasmalar beta laktam antibiyotikler gibi tüm “hücre duvar sentez inhibitörleri’ne ve sülfonomidlere doğal dirençlidir, gram negatifirler fakat gram boyama yöntemiyle güç boyanırlar. Giemsa, Macchiavello veya Castaneda yöntemleri ile boyanmaları gerekir (37). En iyi karanlık saha ve faz kontrast mikroskopunda incelenirler. Mycoplasmalara spesifik olmamakla birlikte Mycoplasmaları tanımlama ve saymada Acridine orange boyaması yapılabilmektedir (38, 39). Fimbria ve pilus yapıları yoktur. Tam aerob olan insan patojeni *Mycoplasma pneumoniae* dışında birçoğu fakültatif anaerobtur. Hücre duvarlarının olmaması nedeniyle pleomorfiktirler. En sık rastlanan temel şekil 0,3-0,8 µm çaplı kokoid hücrelerdir. Bunun yanında, uzun, mantar benzeri filamentöz, branşlı, halka, yıldız ve ameboid şekilde bulunabilirler. Diğer bakterilerden daha küçüktürler. Tüm Mycoplasmalar bakteri geçirmeyen (0,45µm) filtrelerden geçebilirler. Kokoid formda olan Mycoplasmalar diğer bakteriler gibi ortadan bölünerek ürerken, filamentöz olanlar içlerinde elementer cisimcikler oluşturarak ürerler, generasyon süresi 1 ile 6 saat arasında değişir (28, 36, 37). Mycoplasmalar fiziksel ve kimyasal etkilere duyarlıdır. 37°C’de 30–45 gün, -20°C’de 6–12 ay canlı kalabilirler. Liyofilize şekilde uzun süre (3–9 yıl) saklanabilirler. Ultraviyole ışınlarına dayanıklıdır. Patojenik türler konakçı dışında, güneş ışığından yoksun olan ortamlarda birkaç gün canlı kalabilirler. Diğer bakterilerin aksine dondurulup çözdürülmeye dirençli, kuruluğa çok duyarlıdır (28, 36, 37).

Bütün mollicuteler gibi, *M. bovis* küçük ve pleoformiktir ve % 27,8-32,9 mol düşük G+C oranına sahiptir (40). *M. bovis* glikozu fermente etmez, arjinini hidrolize etmez; bunların yerine organik asitlerden laktat ve piruvatı enerji kaynağı olarak kullanır (41). Mycoplasmaların çoğunun çevre şartlarına dayanıksızlığına rağmen, *M. bovis* güneş ışığına maruz kalmazsa çevrede birkaç gün, 4°C’de merada ve sütte yaklaşık 2 ay canlılığını sürdürebilir (7). Bunun dışında tahta yüzeylerde 20 gün, suda 17 gün canlılığını koruyabilir. Kuru kağıt disklerdeki canlılığı 4°C’de 126 gün, 30°C’de 28 gün

ve dış ortamda 7 gündür (42). Ayrıca gübrede 37 gün, pamukta 18 gün, samanda 13 gün, boyasız çelik yüzeylerde 1-2 gün canlı kalabilir (11). *M. bovis* sıvı besiyerinde 59-185 gün arasında canlı kalabilir ve canlılığı 4°C ile 37°C arasındaki sıcaklıklardan etkilenmez (42). 65°C'de 2 dakika yada 70°C'de 1 dakika muamele sonucu canlılığını yitirir (43). *M. bovis*'in çevresel şartlara karşı olan bu direncinin, biyofilm oluşturabilmesi sayesinde olduğu bildirilmiştir, dış çevrede biyofilm içinde *M. bovis*'in 30 saatin üzerinde canlı kaldığı belirlenmiştir (44). *M. bovis* kontamine dondurulmuş spermada yıllarca infeksiyöz kalabilir ve genelde gözden kaçabilen bir infeksiyon kaynağıdır (12). Genel dezenfeksiyon amacıyla formalin ve perasetik asit kullanılabilir (45).

M. bovis' in yüzeysel komponentlerinin antijenik karakterlerini değiştiren, antijenik varyasyonla ilgili 13 vsp (değişken membran yüzeysel lipoproteini) genine sahip olduğu bildirilmiştir (46). Değişken membran yüzey lipoproteinleri *M. bovis*'in en iyi tanımlanabilen virulens faktörleridir. Bunlar immunodominant yüzey antijenleridir ve bakterinin fenotipik değişkenliğine katkı sağlar, konakçı hücrelerine bağlanmada ve antikorlardan kaçışta önemli rol oynar. *M. bovis*'te 5 Vsp proteini tanımlanmıştır, bunlar VspA, VspB, VspC, VspF ve VspO'dur. Karakteristik olarak eksprese edilen proteinlerin faz (on/off ekspresyon) ve büyüklüklerinde yüksek sıklıkta varyasyon vardır (47). *M. bovis*'in hemen hemen bütün suşları Vsp proteinlerini eksprese eder; bunlar içinde VspB, VspO ve VspF sıklıkla eksprese edilirken, VspA ve VspC ekspresyonu daha azdır. Vsp protein ekspresyonunun birçok kombinasyonu belirtilmiştir; VspBO, VspB ve VspBF en yaygın olanlarıdır (48). İn vitro pasaj sonucu Vsp ekspresyonu değişir (49), Vsp protein ekspresyonunun profili genotip ile ilişkili değildir (46).

Vsp proteinlerindeki fenotipik değişkenlik, Vsp gen repertuarındaki değişkenlikler ile açıklanabilir. Esasında, *M. bovis* izolatları eksprese edilen Vsp gen repertuarına göre ayrılır (50). Vsp lokusunda tekrarlayan sekansların silinmesi ve eklenmesini kapsayan rekombinasyon olayları kodlanan proteinlerin antijenik varyasyonunu ve büyüklüğünü belirlerken, site-spesifik DNA değişimleri karakteristik faz varyasyonuna aracılık eder ve yeni kimerik Vsp proteinlerinin ekspresyonuna neden olabilir (51-54). Hastalık oluşumunda Vsp proteinlerinin rolü özetle konakçı antikor yanıtından kaçış (55), mukozal yüzeylere kolonizasyon, konakçı hücrelerine adhezyon (47, 53, 56) ve lenfosit blastogenezisi ile sitokin sekresyonunu baskılamadır (57).

Vsp dışındaki diğer yüzey proteinleri de konakçı hücrelere adhezyonda aracılık etmektedir. İnfeksiyon sırasında immunojenik bir protein olan pMB67'de Vsp'ler gibi in vitro olarak yüksek oranda faz ve büyüklük varyasyonuna maruz kalmaktadır (58).

Kompetitif bağlanma testleri temelinde 32 kDa hidrofilik protein olan P26 antijeni önemli bir adhezin olarak görülmektedir. 28 kDa proteininin *M. bovis*'in konakçı hücrelerine adhezyonunda etkili bir faktör olduğu belirtilmiştir (59).

Adhezyon aracılı olanlardan farklı olarak diğer virulens özelliklerinin daha az öneme sahip olduğu kabul edilmektedir. Bunlar polisakkarit toksini, diğer polisakkaritler, hidrojen peroksit, ısı şok proteinleri ve biyofilm oluşumudur (11). *M. bovis*'in toksin üretimi ile ilgili sadece bir bildiri vardır, bu ısıya dayanıklı, 73kDa, kompleks polisakkarit, meme bezine girişi takiben yangısal yanıtı uyarır (60). *M. bovis*'in içerdiği diğer polisakkaritler teşhis amacıyla kullanılsa da patogenezdaki rolleri bilinmemektedir (61).

Bazı mycoplasmalar tarafından hidrojen peroksit üretilmektedir ve demir ile reaksiyona girerek hidroksil radikalleri üretilip lipid peroksidasyonu ve hücre membranında oksidatif hasar meydana getirerek hastalık oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. *M. bovis*'in suşları arasında hidrojen peroksit üretiminin değişken olduğu ve in vitro pasajlarla üretiminin azaldığı bildirilmiştir (62).

M. bovis'in Hsp 60 (ısı şok proteini) genleri identifiye edilmiştir, sekans analizleri bu genler arasında yüksek homoloji olduğunu ortaya çıkarmıştır. Rekombinant Hsp60 füzyon proteinleri ile yapılan araştırmalar, doğal infeksiyonda mycoplasmal Hsp60'ın immunojenik olduğunu göstermiştir, bununla birlikte bu proteinlerin koruyucu yanıt oluşumu yada virulensi etkilediğine dair bir kanıt yoktur (63).

Biyofilmler genellikle antimikrobiyal direncin yanı sıra ısı ve kurumaya karşı dirençle ilgilidir. Mycoplasmalarda biyofilm oluşumu tespit edilmesi rağmen diğer bakterilerde yaygın olarak bulunan biyofilm oluşumundan sorumlu genlerden yoksundurlar. *M. bovis*'in biyofilm oluşumunun suşa bağlı ve mevcut Vsp profilleri ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Örnek olarak, VspF eksprese eden suşlarda biyofilm oluşumu zayıf iken, VspO veya VspB'yi eksprese edenlerde bol miktarda biyofilm oluşmaktadır (44).

Bitki, böcek, hayvan ve insanlarda bulanabilen Mycoplasmalar normal flora üyesi olabildikleri gibi aynı zamanda hastalık etkenidirler. Patojenik ve non patojenik türler intestinal, genital ve üst solunum yolu mukoz membranlarında, artiküler yüzeylerde ve sığır meme bezinde bulunurlar (37).

M. bovis dünya genelinde en virulent sığır Mycoplasmalarından biridir. İnfeksiyon çoğunlukla bronkopneumoni şeklinde görülür, sığır solunum hastalıkları kompleksi (BRD) ya da Shipping Fever'ın predispoze faktörlerinden biridir (12, 36).

M. bovis infeksiyonu infekte sütün içilmesi ve infekte buzağularla yakın temas sonucu oluşmaktadır (11). Nazal boşlukta kolonizasyon hastalıktan ari olan sürülerle karşılaştırıldığında *M. bovis* mastitisi olan sürülerde daha yaygındır (64). Genç buzağularda pneumoni ve otitis media gelişiminde infekte sütün aspire edilmesi ayrı bir öneme sahiptir. İnfekte buzağularla temas ikinci önemli infeksiyon kaynağıdır (11). Etken başlıca solunum kanalında bronkoalveolar bölgeye yerleşir ve öksürük ile damlacık infeksiyonu tarzında çevreye yayılır. Kontamine toz parçacıkları da infeksiyon kaynağı olabilir. Solunum sisteminde infeksiyonun gelişimini takiben, hastalık sürü içerisinde hızla yayılır. İnfekte bir sığır ile temas sonrası etken 24 saat içerisinde hayvanların burun akıntılarında bulunur. Etkenin ilk izolasyonundan bir hafta sonra *M. bovis* sürüdeki hayvanların çoğundan izole edilebilir (65-71). Doğal vakalardaki inkübasyon periyodu değişebilir, çünkü klinik solunum hastalığının başlangıcında *M. bovis* mi, virüsler mi ya da diğer bakterilerin mi rol oynadığı genellikle bilinmemektedir. Doğal olarak infekte bir buzağı grubunda solunum hastalığı, hastalıklı buzağı grubu ile karşılaştıktan 2 hafta sonra şekillenmektedir (72). Stres, transport ya da hayvanların sıkışık tutulmaları *M. bovis*'in nazal sekresyonda saçılımını artırır, bunlarda bulaşma için önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır (73). Solunum sisteminde bir kez infeksiyon geliştiğinde sıklıkla persiste kalmaktadır, bu da temas halinde olan buzağularda infeksiyon kaynağı olabilmektedir (73, 74).

Meme infeksiyonları genellikle etkenin meme başından girmesi ile başlar. Meme infeksiyonlarının gelişiminde stres faktörleri ve kötü bakım koşulları etkili olduğundan *M. bovis*'e bağlı mastitler genelde kötü bakım şartlarının bulunduğu büyük sürülerde görülmektedir (69). İnekler, *M. bovis* tarafından oluşturulan mastitlere en çok doğum ve laktasyonun yoğun olduğu dönemlerde duyarlıdır. Süt sağım alanında bulaşma çok daha hızlı olmaktadır. Memelerinin Mycoplasma ile deneysel infeksiyonu bir gün içinde diğer loblara saçılım ile sonuçlanmaktadır. Nazal akıntılar ve süt yüksek konsantrasyonda çoğunlukla infeksiyöz dozun 10^6 katı Mycoplasma içerebilmektedir ve bu sayede bulaşma hızlı ve etkili olmaktadır. Mycoplasmalar ile çevresel kontaminasyon önemlidir. *M. bovis*' in kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilirliği sığırlarda belirlenemeyen yeni salgınların ortaya çıkmasına sebep olabilir (75).

Erkek hayvanlarda genital sistemin infeksiyonu kontamine ortamda bulunmakla ya da *M. bovis* ile infekte hayvanlarla doğrudan temas sonrası gelişir. Prepisyum ve üretranın *M. bovis* ile infeksiyonu asendens yol ile testislerin infeksiyonu sonucu orşitis,

vesikülitis gelişir, semen bozulur ve semen ile saçılım olur (76). Dişi hayvanlarda genital kanal infeksiyonu erkeklerdekine benzer şekilde asendens olarak gelişir (77, 78).

Hastalık sırasında antikor titresi yüksektir. Düvelerde gebelik sırasında genital bölgeden alınan örneklerden *M. bovis* genellikle izole edilemez, ancak doğumdan sonra amnion sıvısı, endometrium ve fötustan etken izolasyonu mümkündür ki bu da vertikal bulaşmanın bir göstergesidir (7, 67, 79).

Buzağılarda eklemler etkenlerin kan yolu ile yayılması sonrası etkilenir. Bu durum genellikle sürüde infeksiyonun yaygın olduğu durumlarda meydana gelir (68).

M. bovis yüksek derecede sığırlara adapte dir fakat buffalolar, beyaz kuyruklu geyikler(80) koyun (81) ve keçiler (82,83) hatta insanlarda (84) bile nadir olarak izole edildiği olmuştur. Bu durumda bu hayvanlar sığırlar için infeksiyon kaynağı olabilirler. En son olarak Öngör ve arkadaşları (85) broiler tavukların tracheal örneklerinden *M. bovis* izole ettiklerini bildirmişlerdir. İnsanlarda görülen bir vakada inek gübresine aşırı derecede maruz kaldıktan sonra bronkopnömoni olan bir kadının boğazından *M. bovis* izole edilmiştir (83).

Mycoplasmalar konakçı mukoz membranlarına sıkıca tutunmaya eğilimlidirler ve bazı türler sahip olduğu adhezin genleri ile kodlanan özel bağlanma yapıları ile hücrelere tutunurlar. Etkenin konakçı reseptörleri glycoconjugat yapısındadır ve mukozal yüzeylere kolonizasyon sağlarlar. Mycoplasmalar extraselülerdir ve konakçı hücrelerin ölümüne ya da kronik infeksiyona yol açabilen hemolizinler, proteazlar, nükleazlar ve diğer toksik faktörleri üretirler. Solunum yolu ve akciğerler infeksiyonun en sık bulunduğu yerlerdir. Mycoplasmalar önemli virulens faktörlerinden biri olan Cytadhesinler ile solunum epitel hücrelerinin silialarına tutunur ve alıcı hücrelerde hasar ve sonradan kalıcı silia kaybına yol açar. Sekonder bakteriler ve diğer iritanların etkisi ile akciğer infeksiyona predispoze hale gelir, akciğer hasarı gelişir. Mycoplasmaların konakçı hücre yüzeyi ile olan özel birleşmeleri sitotoksik metabolitlerin ve sitozolik enzimlerin lokal konsantrasyonlarında artışa neden olabilir, birçok Mycoplasma türü membrana bağlı fosfolipazlara sahiptir, bunlar sitolitik lizofosfolipidleri serbest bırakarak konakçı hücre membranlarını bozabilme özelliğindedir. İnfeksiyonlar endojen ya da egzojen yolla olabilir ve sıklıkla kroniktir (8, 37). Latent infeksiyon yaygındır. Persistenliği sağlayan faktörler antijenik çeşitlilik ve biyolojik taklitçilik gibi immun sistemden kaçış mekanizmalarıdır. Epitel bariyerin bütünlüğünün bozulması konakçı savunmasının bozulmasının başlangıç adımı olarak tanımlanabilir (8).

Mycoplasmalar konakçıda replike olmaları ve canlı kalmalarını sağlayan eşsiz stratejiler geliştirir. Doğal özelliklerinden bazıları konakçı hücrelerinde hasara neden olabilir, esansiyel besinlerin birçoğunu sentez kabiliyetlerinin olmaması mycoplasmaları konakçı hücreleri ile rekabete zorlar, hücresel bütünlüğü ve fonksiyonları değiştirirler. Örnek olarak, fermentatif olamayan mycoplasmalar ATP elde etmek için arjinin dihidrolase yolunu kullanırlar, arjinin rezervleri tükendiğinde konakçı hücre protein sentezi durmaya zorlanır (8).

Mycoplasmalar en az 3 farklı tipte modulin (patolojik hasar ile sitokin sentezine neden olan moleküler parçalar) üretebilirler. Mycoplasma lipoproteinler patogenezde anahtar rol oynar, monositleri uyararak, proinflamatuvar sitokinler ve interleukinlerin salgılanmasına neden olur. Oluşan akciğer inflamasyonu Mycoplasma pnömoninin özelliklerindedir. İnfeksiyon başlangıçta nötrofil infiltrasyonu bunu takip eden makrofaj ve lenfositlerin katılımı ile karakterizedir. Nötrofil infiltrasyonunun yoğunluğu kemotaktik sitokinler tarafından kontrol edilir ve hastalığın şiddeti ile direkt ilişkilidir. *M. bovis* sığırların lenfosit apoptozisini indükleyebilir (36).

Patogenez çalışmalarındaki ilerlemeler sayesinde, *M. bovis*'in diğer mukozal mycoplasmalardan (domuz mycoplasmalarından *Mycoplasma hyopneumonia* gibi) çok farklı özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur. *M. bovis*'in mukozal yüzeylere tutunmasında faz-varyant yüzey proteinleri ve diğer multiple yüzey proteinleri aracılık eder. ON fazında faz varyant proteini ile Mycoplasma siliar epitelyal hücrelere tutunur. OFF fazına hızlı dönüşümden sonra, Mycoplasma epitelyumu istila edebilir ve kan dolaşımına karışabilir. Saha vakalarında *M. bovis*'in kanda tespiti zor olmasına rağmen, artrit ve düve mastitinin kandan dokulara yayılım sonucu olduğu anlaşılmaktadır. Etkenin konakçıya girmede karmaşık yollar izlediği bilinse de patojenitesi tam olarak anlaşılamamıştır (75). Yapılan çalışmalar özel adezyon proteinleri, özellikle P26 proteininin bağlayıcı reseptör olarak spesifikliğini göstermiştir (86). Bazı değişken yüzey lipoproteinlerinin de PG45 suşunun adezyonuna katıldığı gösterilmiştir (47). Vsp A, B, E ve F genlerinin tekrarlayan sekanslarından oluşan oligopeptidlerin bu tip adezyonu kısmen engelleme özelliği vardır. *M. bovis*'le yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda diğer mycoplasma türlerinden farklı olarak siliyalı trachea epiteline spesifik olarak bağlanmadığını ve siliar klerens mekanizmasının bakteriyeye karşı etkisi olmadığı belirlenmiştir (59, 87, 88). *M. bovis*'in makrofajlar tarafından fagosite edilse dahi lizise direnç gösterdiği bilinmektedir (89). Etken bu fagositlerin yüzeyine tutunabilmekte ve burada çoğalabilmektedir (90). Makrofaj ve nötrofil hücre kültürlerine *M. bovis*'e karşı

spesifik hiperimmün serum eklenmesiyle, etkenin sindirilebildiği ve yok edildiği gözlenmiştir (90, 91). *M. bovis*'in hücre zarında glikoz, glukozamin, galaktozamin ve bir heptozdan oluşan ve proteinlerle sıkıca bağlanmış, ısıya dayanıklı polisakkarit kompleksi vardır. Bu polisakkarit ekzotoksin gibi davranmasa da kılcal damar geçirgenliğini artırır ve komplement sistemini uyararak immün yanıtı tetikler. Bu mekanizma Gram (-) bakterilerin lipopolisakkaritlerinin mekanizmasına benzer (60). Aşılı hayvanlarda infeksiyonun tekrar etmesi durumunda, lezyonların aşırı şekilde ortaya çıkması tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonu ve hücresel bağışıklıkla açıklanmaktadır (92).

M. bovis suşlarının % 50'den fazlası apse formasyonuna neden olmaktadır. Bu 3–6 mm'lik apseler akciğer dokusunda, synovial membran duvarında ve orta kulakta yer almaktadır. Akciğer apseleri bronşların kapanmasından kaynaklanmaktadır ve bu bronşiolde respiratorik epitel hücrelerinde minimal hasar vardır. *M. bovis*'in epitelyal sitotoksik faktör üreten suşları apse oluşturmazken, apse oluşturan suşlar bu faktörü üretmez, bu özellik laboratuvar markeri ile suşların ayırımında patojenik ayırımı yapmayı sağlamaktadır (75).

M. bovis infeksiyonları için kaşeksi sekelleri tanımlanmıştır. Buzağılar yemelerine devam etmelerine rağmen, kondisyon kaybına karşı tedavilere hızlı yanıt vermezler. *M. bovis* akciğer makrofajına bağlandığında, makrofaj tarafından fazla miktarda Tumor nekrozis faktör alfa (TNF- α) üretimine neden olur. Uzun süren akciğer kolonizasyonunda, gram akciğer dokusunda / 10^8 ve daha fazla organizma 30 günden fazla bulunursa, sirkulasyonda yüksek miktarda ve kalıcı TNF- α bulunmasına neden olabileceği muhtemeldir. Etkilenen akciğerlerdeki önemli histopatolojik lezyon ödem, lenfatik ve vasküler trombozis ile birlikte septal kalınlaşmadır. *M. bovis* suşlarının hepsi görünüş olarak bu lezyonları oluşturur. Bununla birlikte akciğerde (eklemlerde) lezyonlu bölgelerde vaskulitis sınırlıdır ve sistemik vasküler değişikliklerle ilişkili değildir. Geçmiş çalışmalarda *M. bovis* in vitro olarak sığır lenfositlerine immunosupresyon yaptığı ortaya konulmuştur. Sonuç olarak, *M. bovis* infeksiyonlarının patogenezi yüzeysel faz varyasyonu (bağlanma, invazyon, konakçı savunmasından kaçış) ve bunların yol açtığı toksik aktiviteler (apse formasyonu, vaskulitis, immunosupresyon ve dolaylı olarak kaşeksi) ile ilişkili olarak iki alt gruba ayrılabilir (75).

M. bovis'e karşı oluşan immün yanıt üzerine yapılan çalışmaların çoğu deneysel infeksiyon odaklıdır ve doğal infekte buzağılardaki immün yanıt ile ilgili yeterli düzeyde çalışılma yoktur. *M. bovis* pnömonisinin endemik olduğu buzağı grubunun içerisine seronegatif buzağılar sokulduğunda, buzağılar en az 29-35 gün seronegatif

kalmaktadırlar, *M. bovis*'e karşı serum antikor titresi gelişimi 59-63 gün sonra olmaktadır (93). Bu bulgu sürü içerisinde infeksiyonun relatif olarak yavaş yayıldığını, infeksiyona karşı serum antikor yanıtı gelişiminin yavaş olduğunu göstermektedir. Doğal infekte buzağuların serumlarında *M. bovis* spesifik IgG ve IgM bulunurken, tespit edilebilir fakat düşük düzeyde IgA bulunur, nazal akıntılar ve bronkoalveolar lavaj sıvısı ise düşük düzeyde IgG ve IgM içerirken IgA miktarı serumdakinden fazladır (73). *M. bovis* antikorlarının yarılanma ömrü 20 gün olarak bildirilmiştir (94). Doğal infekte buzağularda hücrel immun yanıt gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu şeklinde görülür ve düşük düzeydedir bunun nedeni *M. bovis* tarafından lenfositlerin proliferasyonunun baskılanmasıdır (73).

Deneysel infeksiyonlarda immun yanıt daha iyi bir şekilde karakterize edilmiştir. Seronegatif buzağuların intratracheal yada intranasal olarak infeksiyona maruz kalması sonucu, serum IgG1 üretimi infeksiyondan 7 gün sonra (dpi) tespit edilebilir ve bu yanıt infeksiyondan en az 63(dpi) gün sonrasına kadar artmaya devam eder, serumda IgM 7 dpi'da tespit edilirken, 14 dpi'de maksimum düzeye ulaşır (95, 96, 97). Tracheabronşiyal yıkıntı sıvısında *M. bovis* spesifik predominant izotip IgA olup infeksiyondan 2 hafta sonra % 100 oranında tespit edilir iken, IgG1 düzeyleri ancak 2 haftanın sonunda artar (97).

M. bovis'te immunodominant antijenler Vsp'lerdir ve 3-7 aminoasitlik immunodominant epitoplara içerir (47, 98). PMB67, Vsp familyası dışındaki faz ve size değişken proteinler ve yüzeysel lipoprotein P48'in içinde bulunduğu diğer yüzeysel proteinler de antikor yanıtından sorumludur (58, 99).

M. bovis infeksiyonuna karşı bağışıklık için gerekli olan efektör mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bakterinin hava yolu ve alveollerde ekstraselüler yerleşimi ve havayolundaki epitelyal hücrelerle arasındaki ilişki temelinde, etkili bir antikor yanıtı bakterinin tutunmasını engelleyebilir, bakteriyi opsonize edebilir yada komplement aracılı öldürme mekanizmasını aktive edebilir. *M. bovis* sığır serumunda komplementi klasik yoldan aktive eder. Komplemente bağlı öldürme mekanizmasında IgG1, IgG2 'ye kıyasla daha etkindir. Buna karşın, *M. bovis* alternatif yoldan komplementi aktive etmez ve İmmunglobulinler tek başına bakteriyi elemine edemez (100).

M. bovis infeksiyon doğal vakalarda sıklıkla kronik olarak gözlenmektedir (74, 101, 102) ve deneysel çalışmalarda (71, 103, 104) immun yanıtın infeksiyonu elemine etmede etkisiz olduğunu ortaya koymaktadır. Doğuştan gelen bağışıklığın akciğerler

üzerine etkisi yeterli düzeyde incelenmemiştir. Bununla beraber *M. bovis* antijeni çoğunlukla alveolar makrofajların içerisinde tespit edilir, bu da makrofaj aktivasyonu ve sitokin sekresyonunu uyardığını ve makrofaj fonksiyonlarının baskılanmadığını göstermektedir (105). *M. bovis* nötrofillere bağlanır ve oksidatif yıkımı ve hücrelerin degranulasyonunu durdurur (89, 106). Diğer infeksiyöz etkenlerin solunum yollarında antimikrobiyal peptid ekspresyonunu bozma özelliği olsa da, *M. bovis*'in böyle bir etkinliği olup olmadığı bilinmemektedir (107).

M. bovis'in humoral immun yanıtta kaçışında en temel mekanizma bakteri yüzeyindeki immunodominant proteinlerin değişken ekspresyonudur. *M. bovis*'in kendisine karşı oluşan antikorları içeren serum ile inkübasyonu sonucu Vsp ekspresyonunun değişimi ve yüzey antijeni pMB67'in ekspresyonunun azalması görülür. Bunun yanında Vsp spesifik monoklonal antikorlar, Vsp ekspresyonunu azaltır. *M. bovis*'in antikor yanıtından kaçışını, humoral immun yanıtta başlıca hedef olan Vsp'nin ekspresyonunda antikora bağlı değişim ve Vsp mutasyonu açıklar (55) .

M. bovis ayrıca mitojenlere karşı lenfositlerin proliferatif yanıtını baskılama ve lenfositlerin apoptozisini uyarma özelliğine sahiptir (106, 108). Mitojenle uyarılmış lenfosit fonksiyonlarının inhibisyonu *M. bovis* lenfosit inhibitör peptid (Mb-LIP) olarak adlandırılan Vsp-L'nin C-terminal fragmenti tarafından düzenlenir (57).

Sığırlarda solunum hastalıklarında viral ve bakteriyel etkenlerin yanı sıra çevresel faktörler gibi diğer faktörler de rol oynar fakat *M. bovis*' in konakçı savunmasını baskılayıp diğer bakteriyel patojenlerin invazyonuna yol açarak infeksiyon oluşumunda predispoze edici faktör olduğuna inanılmaktadır (109). Buzağılarda Mycoplasmaya bağlı solunum sistemi infeksiyonları diğer sığır respiratorik patojenleri ile birlikte görülse de *M. bovis* izole edilen predominant türdür. *M. bovis* çeşitli solunum yolu hastalığı semptomlarına neden olur, ancak bunlar spesifik değildir, diğer pneumoni etkenleri ile karışabilir (70, 110). Bronkopnömoninin non spesifik klinik bulguları olan ateş, iştah kaybı, depresyon, hiperventilasyon, dispne, burun akıntısı ve öksürük beş günlük buzağılarda bile oluşabilir (67). *M. bovis* pneumonisini düşündüren spesifik bulgular topallık, kroniklik, antibiyotik tedavisine yanıt alamama olmakla birlikte topallık *Histophilus somni* infeksiyonunda da meydana gelebilmekte ve kronik yanıt alınamayan pneumoni de pulmonar apse, bronşiektazi ve sekestrasyon durumlarında da oluşmaktadır (11).

M. bovis immun sistemi invazyon kabiliyetine sahiptir, artritis (111, 112) ve meningitis (112) mycoplasmama ile sonuçlanabilir. Artritisin klinik belirtileri topallık,

eklemlerde ağrı, bütün vakalarda olmamakla beraber etkilenen eklemlerde eksternal olarak görülen şişliktir. Hastalık sırasında en çok etkilenen eklemler diz, omuz ve dirsek eklemleridir (11). *M. bovis* otitis media (113, 114) , mastitis(115, 116), keratokonjunktivitis (117, 118), endometritis, oophoritis, abort (116) ve seminal vesikülitise (119) neden olabilmektedir. Bunlara ek olarak dışkıdan, ürogenital sistemden, karaciğerden ve kalp kanından da *M. bovis* izole edilmiştir. Karaciğer ve kalp gibi organlar rutin olarak *M. bovis* yönünden incelenmediği için bu organlardaki patojenitesi ile ilgili bilgiler yeterli değildir (10). Houlihan ve arkadaşları (116) artrit ve mastitis problemi olan bir sürüdeki abort vakasından yaptıkları bakteriyolojik incelemede fetus'un iç organlarından sadece *M. bovis* izole etmiş, diğer abort etkenleri tespit edilememiştir.

Yıllardan beridir *M. bovis*' in sağlıklı sığırların solunum sisteminde bulunan oportunistik bir bakteri olduğu düşünülse de (120), son zamanlarda *M. bovis*' in sıklıkla yangısal akciğer lezyonları ile birlikte bulunduğu, nadiren sağlıklı hayvanlardan izole edildiği bildirilmektedir (121).

Ayrıca sığırlarda pnömoni oluşturan mycoplasmaların dışında, normalde köpeklerin reproduktif sisteminden izole edilen, *Mycoplasma canis*'in ilk olarak 1995'te buzağı pnömonilerinden izole edildiği (122) ve 1999'da İngiltere'de sığırlardan izole edilen mycoplasmalar arasındaki oranının % 18 olduğu bildirilmiştir (10).

Patolojik olarak *M. bovis* infeksiyonunda 4 ana lezyon modeli görülür; kazeonekrotik bronkopneumoni, koagulatif nekroz odakları ile birlikte bronkopneumoni, nekrozsuz suppuratif bronkopneumoni ve apseleşme ile birlikte kronik bronkopneumonidir (11). Lezyonlar en çok kranial ve dorsal akciğer loblarını etkiler, şiddetli vakalarda akciğer dokusunun % 80'den fazlası etkilenebilir, etkilenmemiş akciğer kısımları caudal lobların dorso caudal yüzünde sadece ince bir bant şeklinde görülür (101, 102, 123).

Doğal infekte buzağılardaki akciğer lezyonları eksudatif bronkopnömoni ve yangı hücreleri tarafından kuşatılmış geniş koagulatif nekroz alanlarından oluşmaktadır (103). Lezyonlarda koagulatif nekroz alanları belirgindir. Kronik infeksiyonlarda pnömoni, sıklıkla lenfositik kümelenmenin belirgin olduğu peribronşiyal lenfoid dokunun hiperplazisi ile karakterizedir, bu durum havayolu lümeninin stenozuna, yakın akciğer parenşim dokusunun baskılanması ve kollapsına neden olur. *M. bovis* antijeni, çoğunlukla koagulatif nekroz alanlarının çevresinde, makrofaj ve nötrofil infiltrasyonları ile yakın nekrotik eksudatlarda tespit edilir (123). İmmunohistokimya yöntemi ile

M. bovis antijeninin birçok dokuda makrofajların içinde, hepatosit stoplazmasında, safra kanallarında, renal tubullerde ve nadiren fasial sinirlerin aksonlarında lokalize olduğu belirlenmiştir (113). In vitro bulgular ve lezyonların immunohistokimyasal muayenesi bakteriyeminin havayolu yada alveolar epitelyumun invazyonu yada alveolden interlobuler septa içine doğru lenfatik drenaj sonucu olabileceğini düşündürmektedir (88, 102, 124, 125).

Klinik ve Patolojik bulgular *M. bovis* için karakteristik olmadığından identifikasyon için laboratuvar teşhisi gereklidir (12). *M. bovis*' in de içinde bulunduğu alt solunum yolu patojenlerinin tespiti için canlı hayvandan örnek alımında svab kullanılacaksa tahta saplı svabların inhibitör etkileri olabileceğinden, Dacron, kalsiyum alginate ya da polyester svablar tercih edilmelidir (126). Svablar alındıktan sonra Stuart ya da Eaton's gibi transport besiyerlerine konulmalıdır (127).

Solunum sisteminden klinik örnekler için bronkoalveolar lavaj (BAL) (128), transtracheal aspirasyon (129) ve nazal svab (5, 130) yöntemleri uygulanmaktadır. Bronko alveolar lavaj, nazal svaba göre daha uygundur, Thomas ve arkadaşları (127) saha koşulları altında mycoplasmaların varlığını saptamada BAL metodunun en iyi metot olduğunu ve nazal svabın alt solunum yollarındaki *M. bovis* varlığı konusunda fikir vermede yeterli olmadığını belirtmişlerdir. Ancak Godinho ve arkadaşları (131) 76 cm uzunluğunda steril at uterus svabı ile derin nazofaringeal svab metodunu direkt akciğerden örnekleme ile karşılaştırmışlar, nazofaringeal svab ile % 70, akciğer lavajı ile % 90 oranında *M. bovis* izole etmişlerdir. Bu yöntemin bronkoalveolar lavaj ya da tracheal lavaj yöntemine göre daha pratik daha hızlı ve hayvanlar için daha az stres yaratan bir metot olduğunu vurgulamışlar ve fazla sayıda hayvanda kısa sürede örnekleme yapılabildiği için özellikle sürü bazında örnekleme bu yöntemin çok kullanışlı olduğunu belirtmişlerdir. Wiggins ve arkadaşları (130) besi çiftliğine ulaştıktan hemen sonra örnek alınan buzağuların nazal svablarında *M. bovis* prevalansını sadece % 2 bulmuştur. Arcangioli ve arkadaşları (132) solunum hastalığının başlangıç safhasında, besideki sağlıklı danaların bronkoalveolar lavaj sıvılarının % 79'undan *M. bovis* izole etmişlerdir. Bunun dışında *M. bovis* çok farklı hastalıklardan izole edildiğinden, pnömoni akciğer dokusu, synovial dokular ve eklem sıvıları, mastitli süt, semen, genital akıntılar, prepisyum yıkantısı ve göz svabı örnek olarak alınabilmektedir (12). Besiye alındıktan sonra 2 ay içerisinde ölen buzağuların akciğerlerinde herhangi bir makroskopik lezyon ya da histolojik yangı bulgusu yokken *M. bovis* % 46 oranında izole edilmiştir (133). Etkenin İntranasal ya da intra tracheal olarak alımını takiben, infeksiyondan 9 gün

sonrasına kadar *M bovis* kan kültüründen izole edilebilir (103). Bununla beraber diğer dokuların infeksiyonu kalıcıdır, deneysel olarak infekte edilmiş dalak, karaciğer ve böbrekten infeksiyondan 21 gün sonrasına kadar etken izole edilebilmektedir (104).

M. bovis izolasyonu için, sıvı örnekler santrifüj edilmeli ve dipteki pellet inokulasyon için kullanılmalıdır. Kontaminasyon şüphesi varsa örnekler 0.45 µm'lik filtreden geçirilmelidir, Bronkoalveolar lavaj sıvısı gibi örneklerde bulunan antikor, antibiyotik, bakteri ve diğer inhibitörleri elimine etmek için buyyonda seri dilusyonlar yapıp, her dilusyon subkültüre edilmelidir (126, 131, 132).

Mycoplasmaları üretmek diğer bakterilere göre güçtür. Nazlı üreyen bu mikroorganizmalar için bazı spesifik üretme faktörlerine ihtiyaç vardır. Bunlardan en önemlisi olan kolesterol gereksinimleri nedeniyle besi yerlerine % 20 at serumu ilave edilir. Ayrıca üremeyi artırması amacıyla yeast extract ve DNA ya da nükleotidlerin katılması ve çok iyi kalitede distile suyun kullanılması gerekmektedir. Gram pozitif bakteri kontaminantlarının üremesini engellemek için penisilin G, Gram negatif bakteriler ile mantarların üremesini engellemek için de thallium acetate eklenmelidir. Hava kabarcıkları, su ve lipid damlacıkları Mycoplasma kolonileri ile karışabilmektedir. Mycoplasmaları bakterilerin L- formlarından ayırmak için şüpheli koloniler anti bakteriyel madde içermeyen besi yerine pasajlanır. L- formları bu ortamda normal koloni morfolojilerine dönerken Mycoplasmalar tipik görünümünü muhafaza ederler. Ayrıca boyama ile de debris ve L formlarından ayırmak mümkündür (8, 28, 36, 37, 134, 135). Mycoplasma kolonileri Dienes boyası (ticari olarak bulunan metilen mavisi boyası) ile boyandığında dekolore olmaz iken, L-formu koloniler 1dakika içinde dekolore olmaktadır. Mycoplasma kolonilerinin agara gömülü olarak üreyen merkezleri daha yoğun olarak koyu mavi boyanır, periferleri ise az yoğun olarak açık mavi boyanır (136, 137). Cansız ortamlar dışında Mycoplasmaları embriyolu yumurta ve hücre kültürlerinde de üretmek mümkündür(135).

M. bovis çeşitli besiyerlerinde (Medium B, Haylick's medium, modifiye Friis medium, N-agar ve broth vb.) kolaylıkla üreyebilmektedir (134). Shizumi (138) lipaz reaksiyonu temelinde *M. bovis* kolonilerini tespit edebilen Tween-80 içeren selektif bir besiyeri tanımlamıştır. Kolonilerin kırmızı renkte görüldüğü bir ticari besiyeri de mevcuttur (139). *M. bovis* izolasyonu için besiyerleri 3-10 gün 37°C'de inkübe edilmeli, saf kültür elde etmek için filtrasyon ya da seri dilusyon yöntemi ile izolatlar en az 3 kere klonlanmalıdır (134, 140). *M. bovis* genellikle 2-5 günde gözle görülebilir koloniler oluşturur, koloniler tipik sahanda yumurta görünümündedir (140) ve Eaton's medium

gibi özel besiyerinde *M. bovis* film ve spot oluşturur ve broth'u portakal rengine dönüştürür (134). Koloniler küçük (0,1-0,5 mm), koyu ve halesiz olabilmektedir (11).

M. bovis'i diğer mycoplasmalar ve ureaplasmalardan ayırmada glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi, üreaz aktivitesi, film oluşumu ve tetrazolium redüksiyonu gibi biyokimyasal testler kullanılmaktadır (11, 135, 141). Sığırlardan izole edilen *Mycoplasma* türlerinin karşılaştırmalı biyokimyasal özellikleri Tablo-1 'de verilmiştir (6).

Tür spesifik identifikasyon için hiperimmün tavşan serumları kullanılarak üreme inhibisyon, film inhibisyon, fleurosan antikor ve metabolik inhibisyon testleri *M. bovis* identifikasyonunda kullanılabilir (142). Bu teknikler relatif olarak yavaş olması ve antiserumların ticari olarak bulunmaması ve laboratuarda üretilme zorunluluğu yüzünden yoğun emek gerektirmektedir (11). *M. bovis*'i *M. agalactiae*'den ayırmada biyokimyasal testler yeterli olmamaktadır, her ikisi de glikozu fermente etmez, arjinin hidrolize etmezken, laktat ve piruvat gibi organik asitleri kullanarak, broth'da turbidite oluşturmadan turuncu renk oluşturur, etanolü okside eder, lipolitik aktivite sonucu besiyerinde film ve spot oluşturur. Bu iki sığır patojeni moleküler testler ile ayrılabilir (143,144).

Tablo 1. Sığır Mycoplasmalarının biyokimyasal özellikleri

Mycoplasma	Glikoz	Arjinin	Üreaz	Film	Kazein	Fosfataz	Tetrazolium	
							Aerobik	Anaerobik
<i>M. alkalescens</i>	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>M. bovirhinis</i>	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+
<i>M. bovis genitalum</i>	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>M. bovoculi</i>	+	-	-	+	-	+/-	+	+
<i>M. canis</i>	+	-	-	-	+/-	-	-	+
<i>M. californicum</i>	-	-	-	-	b	+	-	Suşların çoğu +
<i>M. canadense</i>	-	+	-	-	b	Zayıf +	-	+
<i>M. dispar</i>	+	-	-	-	b	-	+	+
<i>M.m. mycoides SC</i>	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>U. diversum</i>	-	-	+	-	-	-	b	b

b = bilinmiyor

Ball ve Findlay (145), *M. bovis* spesifik monoklonal antikorları ile klinik örnekte *M. bovis* antijenini tespit eden bir Sandwich (Capture) ELISA geliştirmişlerdir; testin sensitivitesi konvansiyonel kültür yöntemine yakın bulunmuştur. Sensitivitenin kısa bir zenginleştirme basamağı ile artırılabilirliğini belirtilmiştir (145, 146). Sandwich ELISA

yöntemi çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (19, 21, 146, 147) ve testin şu an ticari şekli mevcuttur (BIO-X, Lüksemburg). Bu test Akciğer homojenatlarından ve çeşitli klinik örneklerden *M. bovis* antijeninin tespiti için kullanılmaktadır. *M. bovis* genellikle hastalıklı örneklerde düşük miktarlarda bulunduğundan, örnekler uygun bir besiyerinde zenginleştirilir (Hayflick medium). Direkt olarak kit mikropleytinde 3 gün 37°C'de inkübe edildikten sonra kültürler *M. bovis* varlığı yönünden test edilir (145).

96 gözlük mikropleytin A,C,E ve G sıraları *M. bovis* spesifik poliklonal antikorlar ile kaplanmıştır. Bu antikorlar kültür mediumunda üreyen mycoplasmaları yakalar. Pleytin diğer sıraları (B,D,F ve H) *M. bovis*'e spesifik olmayan poliklonal antikorlar ile kaplanmıştır. Bu spesifik bağlanma meydana gelip gelmediğini belirlemede gerçek negatif kontrolü sağlar. Böylece örneklerdeki yanlış pozitif miktarı azalır (145). Test prosedürüne göre; 3 günlük zenginleştirme basamağından sonra pleyt yıkanır ve anti- *M. bovis* spesifik monoklonal antikor ile peroksidaz içeren konjugat eklenir. 1 saatlik oda ısısındaki inkübasyondan sonra ikinci yıkama aşaması yapılır ve enzim substrat (H₂O₂) ve kromojen tetrametilbenzidin(TMB) ilave edilir. Eğer kültürde *M. bovis* var ise konjugat Mycoplasma antijeni içeren kuyucukta sabit kalır ve enzim renksiz kromojeni maviye döndürür. Mavi rengin yoğunluğu örnekteki Mycoplasma titresini ile doğru orantılıdır. Sonuçların geçerliliği için kit ile birlikte kontrol antijeni mevcuttur. Bu kontrol antijeni liyofilize inaktif *M. bovis* kültüründen oluşur (148).

Kuzey İrlanda'da 1999-2005 yılları arasında yapılan bir çalışmada kültür ve Antijen Capture ELISA yöntemi ile toplam 214 sürüde 1328 numunedan 282'sinde *M. bovis* tespit edilmiştir, Antijen Capture ELISA'nın *M. bovis*'in hızlı teşhisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (21). Tenk ve arkadaşları Sandwich ELISA ve kültür yöntemini karşılaştırmışlar ve Sandwich ELISA'nın hızlı ve spesifik bir teşhis metodu olduğunu, zaman alıcı olan kültür metodu (filtrasyon, biyokimyasal ve immunolojik testler) yerine kullanılabileceğini belirtmişlerdir (147). Ball ve Findlay (145) *Staphylococcus aureus*'un nadiren nonspesifik olarak immunglobulinlere bağlanarak yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceğini ancak bunun dışındaki bakteriyel kontaminantların çoğunlukla pozitiflik oluşturamayacağını bildirmişlerdir. Diğer yönden kontamine sıvı kültürler çıplak göze görülebilen bulanıklık ve yoğun renk değişiminden anlaşılır, bu durumda ELISA testine geçmeden önce bulanık sıvı kültürden kanlı agar pasaj yapılması yararlı olmaktadır. Nadiren bakteriyel kontaminasyon pH değişikliğine yol açarak *M. bovis*'in üremesini baskılayabilir (145). Heller ve arkadaşları (146) süt örneklerinden *M. bovis*'i tespit etmek amacıyla antijen capture ELISA yöntemini

uygulamışlar, testin sensitivitesini % 80,6, spesifitesini % 94,9 bulmuşlar ve test öncesi 48 saatlik inkubasyonun testin sensitivitesini % 10 arttırdığını bildirmişlerdir.

PG45 referans suşuna karşı hazırlanan poliklonal antiserum kullanılarak membran filtrasyon dot-immunobinding yöntemi de mycoplasmaların identifikasyonunda kullanılabilir (132) *M. bovis* identifikasyonunda kullanılan diğer testler, immunperoksidaz işaretleme, immunobinding testleri ve flowsitomeridir (9, 149- 153). İmmunolojik tekniklerin birçoğunun sensitivitesi bir zenginleştirme basamağı ile arttırılabilir (146, 151, 154). Spesifik antikolar kullanılarak İmmunflorasan (IF) ya da İmmunohistokimya (IH) yöntemleriyle in situ olarak *M. bovis* tespiti yapılabilmektedir. IH yöntemi ile antijen ve spesifik lezyonlar birlikte tespit edilebilir (123).

M. bovis antikoları birkaç ay kanda kalabilir ve çeşitli metotlarla tespit edilebilir. Serolojik testler özellikle etken izolasyonunun güç olduğu kronik infeksiyonlar ve yüksek dozda düzenli antibiyotik tedavisi yapıldığı durumlarda yararlı olabilmektedir (12). İndirekt hemaglutinasyon, film inhibisyon ve indirekt ELISA gibi birçok serolojik test geliştirilmiştir. Tüm hücre ya da işlenmiş antijenle hazırlanan İndirekt ELISA testleri serolojik testler için kullanılan başlıca metotlardır. Piyasada Ticari ELISA kitleri de (Biovet, Kanada; Bommeli, İsviçre) mevcuttur (12).

M. bovis nazal boşlukta bulunduğu genelde immunojenik değildir, eğer invaziv hale gelirse antikor yanıtı oluşturur. İnfeksiyonun ilk 2 haftalık döneminde spesifik antikorlar oluşmadığı için serolojik testler kullanışlı değildir. ELISA testleri *M. bovis* infeksiyonunun seroprevelansı belirlemede (14) ve *M. bovis*'ten ari sürü oluşturmak için *M. bovis* sero negatif sığırları seçmek amacıyla kullanılmaktadır (7, 155). *M. bovis* 'e karşı yüksek serum antikor titresi olan sığırlarda pneumoni oluşumu riski yüksek olsa da (Relatif risk = 1,7), yüksek titrelili birçok sığırdaki kronik pneumoni yoktur (110).

M. bovis, *M. bovirhinis* gibi oportunistik mycoplasmalar ve acheloplasmalar tarafından kolaylıkla baskılanabilir ve bazen suşların antijenik varyasyonu serolojik testlerin güvenilirliğini kısıtlar (156). *M. bovis*' in antijenik varyasyonları sonucu ortaya çıkan yanlış negatif reaksiyonları minimize edebilen miks antijenler içeren ticari ELISA kitleri mevcuttur (14). Kontrol olarak monoklonal bloke edici antikor ve hedef antijen olarak *M. bovis* tüm hücre lizatı kullanılan bloke edici ELISA ile serumdaki *M. bovis* antikoları yüksek spesifite ve sensitivite ile ayrıca kros reaksiyon oluşmadan tespit edilebilmektedir (16). Spesifik *M. bovis* proteinleri ile serum antikolarını tespit edebilen ELISA testlerinde rekombinant VspA hedef antijeni ya da *M. agalactiae*'nin P48 antijeni

ile homolog membran lipoproteini kullanılmıştır. P48 proteininin sığırlardaki diğer altı Mycoplasma türü ile reaksiyon vermemesi, *M. bovis* P48 ELISA 'nın infeksiyonda spesifik marker olarak yararlı olabileceğini göstermiştir (99). Mastitis durumlarında sütte *M. bovis* antikorlarını tespit edebilen ELISA testleri de geliştirilmiştir (157). SDS-PAGE ve Western blot teknikleri suşların antijenik yapılarını karşılaştırmak ya da konakçı hayvanın humoral immun yanıt paternlerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (50, 158).

Kültür ve seroloji Mycoplasma infeksiyonlarının teşhisinde çok önemlidir. Kültür yönteminin zorluğu ve serolojik tekniklerdeki kros reaksiyonlar DNA bazlı tekniklerin gelişmesini sağlamıştır. Moleküler teknikler bu geleneksel tekniklere olan gereksinimi ortadan kaldıramaz fakat bu tekniklerde, örneklerin hızlı işlenmesi, diğer patojenlerle birlikte test edilebilmesi, maliyet verimliliği, spesifite ve sensitivitenin artırılma potansiyeli gibi avantajlar vardır (11). Moleküler teknikler özellikle, antibiyotik kullanılan hayvanlardan ya da doku artıkları içeren ve otolizli kronik lezyonlardan alınan örnekler ile bu örneklerin çeşitli prezervatiflerle karıştırılması, bakterilerle kontamine olması, antikorlar içermesi, gibi mycoplasma izolasyonunun zor olduğu durumlarda kullanışlı olmaktadır (159, 160). *M. bovis*' in PCR ile identifikasyonu konvansiyonel kültür metotlarıyla karşılaştırıldığında daha kısa zamanda olmaktadır. PCR testlerinde spesifik ve konservatif gen sekansları hedeflenmelidir. 16 S RNA gen sekansları temelindeki PCR testleri ile aynı anda birden fazla sığır solunum sistemi mycoplasma türlerini (*Ureaplasma diversum*, *M. bovis*, *M. bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* ve *Mycoplasma bovigenitalum*) tespit edilebilir (161-163). Bu PCR testleri çok spesifik ve duyarlı olmasına rağmen, 16S rRNA temelinde olduğu için *M. agalactiae* ile kros reaksiyon verebilir, PCR testlerinin en önemli amacı konvansiyonel yöntemlerle ayrımları çok güç olan *M. bovis* ve *M. agalactiae*'nin ayrımını yapmaktır (156, 164). *M. bovis* ve *M. agalactiae* 'yı direkt olarak süt ve nazal örneklerden tespit eden PCR metotları mevcuttur (165).

Süt ve akciğer dokusundan *M. bovis* ve *M. agalactiae*'yi identifiye etmede hibridizasyon problemleri kullanılarak ya da ürünün erime sıcaklığının analizi ile 16 S rRNA gen fragmentinin amplifikasyonu için adapte edilmiş Real time PCR kullanımını sensitiv, spesifik, hızlı ve uygun maliyetlidir (160). Benzer şekilde Denature gradient gel elektroforezis (DGGE) ile PCR temelli 16 S r RNA gen fragmentinin amplifikasyonu yapıldığında bu iki tür hızlı bir şekilde ayırt edilebilmektedir (11).

UvrC geninin PCR ile amplifikasyonu *M. bovis*'i *M. agalactiae*'nin de içinde bulunduğu diğer mycoplasma türlerinden ayırmada çok kullanışlıdır (156, 164, 166), ve yakın zamanda çok daha az örnek ve reaksiyon volümleri kullanılarak modifiye edilmiştir (143). Benzer şekilde, ATP binding proteini oppD//F (165) veya DNA polimerase III genini (167) hedefleyen PCR testleri *M. bovis* ve *M. agalactiae*'yi birbirinden ayırt ederek identifiye edebilmektedir. Multiplex PCR ile membran protein 81'in amplifikasyonu *M. bovis* ve *M. agalactiae*'yi identifiye edebilmekte, Restriction Fragment Length Analysis bu iki türü ayırt edebilmektedir (168).

Diğer *M. bovis* spesifik PCR testlerinde bilinmeyen bir gen sekansı kullanılmış (169), süt ve mukozal örneklerde sensitivite ve tekrarlanabilirliği artırılmış semi nested PCR' a adapte edilmiştir (170), bu testin performansını arttırmak için primerlerin modifikasyonu bildirilmiştir (171).

PCR testlerinin rutin olarak kullanıldığı 5 laboratuvarı karşılaştıran çalışmada, UvrC ve oppD/F hedef genlerinin en yüksek güvenilirliğe sahip olduğu belirtilmiştir (144). *M. bovis* identifikasyonunda rastgele genomik fragmentler içeren plasmid problemleri dot blot hibridizasyon testlerinde kullanılır (11).

Suş tiplendirme sistemlerinin *M. bovis* infeksiyonunun epidemiyolojisinde yeni anlayışlar açığa çıkarması beklenilmektedir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezis gibi konvansiyonel tiplendirme sistemleri 64-68, 55 ve 26 kDa proteinlerinin ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları tespit edebilse de suşlar arasındaki değişiklikleri ortaya çıkarmada yeterli değildir (11, 172).

Random Amplified Polymorphic DNA analizi (RAPD) ve Amplified Polymorphic Length Polymorphism (AFLP) analizi sistemleri tiplendirmede kullanılmaktadır (11). Loria ve arkadaşları (173) İtalya'da izole ettikleri *M. bovis* suşlarının moleküler tiplendirmesinde RAPD (Random Amplification of Polymeric DNA) yöntemini uygulamışlar ve bu tekniğin hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada İtalya'daki suşların *M. bovis* suşuna göre küçük ruminant *M. agalactiae* suşuyla daha yakın bir benzerlik gösterdiğini tespit etmişler ve Avrupa'daki diğer *M. bovis* suşlarından farklı olarak İtalyan suşların cluster B de sınıflandırıldığını bildirmişlerdir. RAPD ve AFLP'ye nazaran Pulsed-Field Gel Elektroforezis (PGFE) iyi bir ayırım gücüne sahiptir fakat zaman alıcı ve zahmetlidir, bütün izolatları tiplendiremez. Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) tiplendirme için hızlı, kolay ve tekrarlanabilir bir tekniktir (11).

Mycoplasma pnömonilerinin tedavisinde 2 önemli unsur erken teşhis ve uzun süreli tedavidir (174). Kronik pneumoni ve artrit vakalarında tedavideki yetersiz yanıt, diğer formlardaki *M. bovis* pnömonilerinde de prognozun kötü olacağını göstermez. Klinik tanının zorluğu akut *M. bovis* pnömonisinde etkili tedavi girişimleri geliştirilmesindeki en büyük problemidir. Artrit dışında akut *M. bovis* pnömonisinin klinik bulgularının pnömonik pasterollozdan farklı olmayışı, sağlıklı buzağılarda *M. bovis* prevalansı yüzünden izolasyonunun sınırlı öneme sahip oluşu ve kazeo nekrotik bronkopneumoninin lezyonlarının sadece nekropside belirlenebilmesi güçlüklerden bazılarıdır (11).

Yapılan çalışmalarda spectinomycin'in klinik bulgular üzerine herhangi bir etkinliği yokken, akciğerden *M. bovis* izolasyonu üzerinde sınırlı bir etkisi olduğu belirlenmiştir (175). Deneysel olarak intra artiküler *M. bovis* inokulasyonu sonucu artrit gelişimi üzerine Enrofloksasin tedavisinin herhangi bir etkisi yoktur (176). Artritisin tylosin ile tedavisinin infeksiyonun erken döneminde etkili olduğu bildirilmiş, fakat saha vakalarında etkinliği hakkında herhangi bir indikasyon yoktur (177).

M. bovis'e karşı valnemulin ve tulathromycin kullanımı daha geniş ölçüde araştırılmıştır. Bir çalışmada 3-9 haftalık yaşta buzağılara intratracheal *M. bovis* inokulasyonunu takiben tulathromycin uygulanmış, tedavi grubunda kontrol grubuna kıyasla hastalık şiddetinde azalma, daha düşük akciğer lezyon skoru, daha düşük rektal sıcaklık ve daha fazla canlı ağırlık kazancı belirlenmiştir. Bu çalışmada akciğerler konsolide olmuştur fakat saha vakalarındaki gibi tipik kazeonekrotik lezyonlar ve artrit belirtilmemiştir (178).

Valnemulin'in etkinliği bir deneysel çalışmada değerlendirilmiştir. Seronegatif 10-35 günlük buzağılar aerosol yolla etkene maruz bırakılmış, 10 gün sonra valnemulin ya da enrofloksasin tedavisine başlanmıştır. Her iki ilaçla da tedavi klinik bulgular, iştah, canlı ağırlık kazancında düzelme ve akciğerden izole edilen *M. bovis* sayısında azalma ile sonuçlanmıştır (104). Valnemulin etkinliği süt emen buzağılarda da bildirilmiştir, *M. bovis* ve *P. multocida*'nın başlıca patojen olduğu enzootik pnömonili buzağılarda 4 günlük yaşta içecekleri süte valnemulin katılmış ve 3 hafta uygulanmış, tedavi sonucu solunum hastalığı bulguları ve artrit de azalma görülmüştür. *M. bovis* nazal svablardan daha az sıklıkla izole edilmiş fakat PCR ile kontrol ve tedavi gruplarındaki izolasyon sıklığı aynı bulunmuştur (179).

Birçok vakada tedavinin etkisiz olduğu bildirilmektedir. Etkili spesifik antibiyotik kullanılması önemlidir (12). Bakteriler için kullanılan birçok konvansiyonel

antimikrobiyal duyarlılık testi yöntemi mycoplasmalarda da kullanılmıştır. Agar dilusyon referans metot olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu teknik az sayıdaki izolatların test edilmesinde pratik değildir. Agar disk difüzyon yöntemi mycoplasmaların yavaş üremesi ve zon çapları ile MIC değerleri arasında korelasyon olmaması sebebiyle kullanışlı değildir. Microbroth dilusyon yöntemi, ekonomikliği ve aynı mikrotitre pleyti içinde çeşitli antibiyotikleri test etme olanağına sahip olması sayesinde en pratik ve en yaygın kullanılan metottur. Bununla beraber bu metot zahmetlidir çünkü dilusyonlar önceden hazırlanmalıdır ve titre zamana bağlı olarak değişebilmektedir. Mikrodilusyon metodunun “sensitier”(trek diagnostics) versiyonu tekniğin zahmetli yanını ortadan kaldırır. E test yönteminin (AB BIODISK, Solna, İsveç) basitlik, inokulum miktarının minimum etkisi, son değer stabilliği ve tek bir izolat için uygulanabilirliği gibi avantajları vardır. Yukarıda belirtilen testler *M. bovis* suşları ve izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemede kullanılmaktadır (11,136, 180). Agar dilusyon metodunda, inkübasyon sırasında başlangıç MIC’i koloniler görülür görülmez okunur, final MIC değeri 3 gün sonra okunur (181) redoks indikatör (182), pürivattan asit oluşumu (183) ve pellet formasyonu (184) şeklinde broth mikro dilusyon yöntemleri tanımlanmıştır. Dilue kültürlerin hazır Sensitier pleytlere geçildiği ve redoks değişiminin resazurin (alamarBlue) indikatör boyası ile saptandığı antimikrobiyal duyarlılık testi tanımlamıştır (185). Son olarak E Test metodunda dilue *M. bovis* kültürlerinin agar üzerine inokule edilmesiyle ticari olarak bulunan E test stripleri ile farklı antibiyotiklerin duyarlılığı bulunabilir (136).

Metodun ne olduğuna bakılmaksızın, Mycoplasma antimikrobiyal duyarlılık testlerini gerçekleştirmede uluslararası kabul görmüş bir rehber yoktur. Veteriner Hekimlikte çeşitli araştırmacılar tarafından farklı tekniklerle *M. bovis* MIC değerleri belirlenmiştir (182,184, 186). Hannan (180) Mycoplasma türlerine karşı antimikrobiyal etkenlerin MIC değerlerini belirlemek için bir rehber hazırlamıştır ve burada etkili antibiyotiği belirlemede üreme inhibisyonunun kolayca ayırt edilebilmesini sağlayan inokulum miktarının 10^5 CFU/ml olduğunu belirtmiştir. E test metodunda da bu değer baz alınarak inokulum hazırlanır. Stereo mikroskopta belirlenen üreme inhibisyonu için Dienes boyası faydalı olmaktadır (187).

Mycoplasmalara karşı etkili olduğu bilinen antimikrobiyal ilaçlar arasında macrolidler, fluorokinolonlar, tetracyclinler, linconamidler, aminoglycosidler, florfenicol ve choramphenicol yer almaktadır (36, 174). Mycoplasma infeksiyonlarının tedavisinde

özellikle oxytetracyclinler, spectinomycin ve tilmicosin gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı Avrupa’da *M. bovis*’in direncinin arttığı bildirilmektedir(184, 188).

Francoz ve arkadaşları (136) 1990’da E Test yöntemini *M. bovis* antibiyotik duyarlılık profilini belirlemede ilk olarak kullanmışlar ve tekniğin MIC değerlerini belirlemede geçerli ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğunu ayrıca E test yönteminin microbroth dilusyon yöntemine göre daha ucuz daha az zaman gerektiren teknik olarak laboratuarda uygulanabilir, daha kolay ve tek bir klinik izolata karşı eşzamanlı olarak çoklu antibiyotikleri test etmeye olanak veren bir yöntem olarak tanımlamışlardır. Bu yöntemle test ettikleri bütün suşların erithromycine karşı dirençli olduğu, in vitro olarak en etkili antibiyotiğin enrofloxacin olduğunu belirtmişlerdir.

Loria ve arkadaşları (173) İtalya’da *M. bovis* saha suşlarıyla yaptıkları çalışmada MIC yöntemiyle en etkili antibiyotiklerin fluorokinolonlar (danofloxacin ve enrofloxacin) olduğunu bildirmişlerdir. Ball ve arkadaşları (186) ise yine aynı yöntemle sadece enrofloxacin’in mycoplasmosidal etkili olduğunu bildirmiştir. Ter Laak ve arkadaşları (182) seri broth dilusyon yöntemi ile *M. bovis*’in tylosin, kitasamycin ve tiamuline karşı duyarlı olduğunu, nifuroquine ve streptomycine karşı dirençli olduğunu bulmuştur.

Korunma amaçlı antibiyotikler ile metafiltik tedavi etçi sığırlarda solunum hastalıklarından dolayı oluşan mortalite ve morbiditeyi azaltmaktadır, bununla beraber kronik pneumoni ve arthritis prevalansına etkisi bilinmemektedir (189, 190).

M. bovis antikoru yeni doğan buzağılara kolostrum ile geçebilmektedir (132). Kronik *M. bovis* pnömonilerinde tedaviye iyi yanıt alınamaması, *M. bovis*’ten korunmada aşılamanın önemini ortaya koymaktadır(11).

Sığırlarda pnömoni oluşumunu önlemek amacıyla Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı’ndan lisanslı 2 ticari *M. bovis* bakterin aşısı mevcuttur (Pulmo-Guard ve Myco-Guard) (12). Bir diğer lisanslı aşı olan Mycomune mastitisin kontrolü amacıyla kullanılmaktadır (11). Ayrıca otolog aşılar da kullanılmaktadır (191).

Çalışmalar aşılamanın, serumda *M. bovis* spesifik IgM, IgG1, IgG2 ve IgA ve akciğer sıvısında IgA yı içeren ölçülebilir bir antikor yanıtını stimule edebildiğini göstermiştir (73, 192, 193). Bir çalışmada aşılarında titreler 16 gün içerisinde oluşmuş ve en az 6 ay tespit edilebilir düzeyde kalmışlardır. Bununla birlikte serum ve lokal antikor titreleri koruyucu titre oluşumu bakımından yeterli derecede korale değildir. Bazı deneysel çalışmalarda aşılar umut verici olmuş iken, aşıları hayvanlarda hastalığın yüksek seviyelerde olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (96). Saponinli inaktive *M. bovis* aşısının süttten kesilmeden önce buzağılarda kullanımının güvenilir olduğu bildirilmiştir.

Aşıyı takiben *M. bovis* ' le aerosol olarak infekte edildiğinde aşıllılarda akciğer ve eklemlerden *M. bovis*'in az yoğunlukta tespit edildiği, solunum hastalığının klinik belirtilerinin ve ateşin şiddetinde azalma olduğu ve nekropside daha az yaygınlık ve şiddette akciğer lezyonlar olduğu belirlenmiştir (96). Buna karşın yağ adjuvanlı ticari *M. bovis* aşısının süttten kesimden önce buzağılara uygulanması sonucu aşının koruyucu olmadığı, ayrıca otitis media oluşumu riskini arttırdığı bildirilmiştir (194).

Aşılama dışında koruma ve kontrol önlemleri olarak sürü bazında stres faktörlerini azaltmak ve iyi bir çiftlik idaresi gereklidir. Yeni alınan sütçü inekler ve yeni doğan buzağılar karantina edilmeli, sürüye katılmadan önce Mycoplasma mastitis yönünden test edilmelidir. Mycoplasma mastitis durumunda tedavisi girişimi yapılmamalı, pozitif hayvanlar ayıklanmalıdır. Mastitisli ineklerden arta kalan sütler pastörize edilmeden buzağı beslenmesinde kullanılmamalıdır (36).

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇ

1. Akciğer Örnekleri

28.01.2008 ve 28.04.2008 tarihleri arasında Bursa ve çevresinde bulunan toplam 5 mezbahaya (ET-BA, Kayarlar, Çimet, Çalı ve Karacabey mezbahaları) kesimin en yoğun olduğu Pazartesi ve Perşembe günleri olmak üzere haftada 2 gün materyal temini için gidildi. Toplam 1492 akciğer muayene edildi. Makroskobik olarak pnömoni bulgusu gösteren 142 akciğerin lezyonlu kısımlarından steril petri kutularının içerisine örnekler alındı ve en kısa sürede soğuk zincirde laboratuara ulaştırıldı. Örnekler -20 °C de muhafaza edildi. Bu süre zarfında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilen marazi maddelerden pnömoni bulgusu taşıyan 10 akciğer de değerlendirmeye alındı. Toplam 152 akciğer örneği *M. bovis* varlığı yönünden incelenmek üzere araştırma materyali olarak kullanıldı (Tablo-2).

Tablo 2. Akciğer örneklerinin kaynaklara göre dağılımı

Materyal Kaynağı	İncelenen Akciğer Sayısı	Pnömonili Akciğer Sayısı
Et-Ba Et Kombinasyonu	807	88
Kayarlar Et Kombinasyonu	541	41
Çim-Et Et Kombinasyonu	118	9
Çalı Belediye Mezbahası	13	2
Karacabey Belediye Mezbahası	3	2
Anabilim Dalı Laboratuvarı	10	10
Toplam	1492	152

2. Standart Suş: *Mycoplasma bovis* NCTC 10131 suşu Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

3. Mycoplasma Besiyerlerinde Kullanılan Stoklar

3.1 Thallium acetate (% 5)

5 g. Thallium acetate (Merck)100 ml distile su içinde eritildi. 0.20 µm çaplı Filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek 10 ml miktarında steril tüplere aktararak +4 °C de saklandı.

3.2 Yeast extract solüsyonu (% 25)

25 g. Yeast extract (Difco-127838JC) 100 ml distile su içinde eritilip 0.20 µm çaplı filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek 10 ml miktarında steril tüplere aktararak -20 °C de saklandı.

3.3 Glucose solüsyonu (% 50)

50 g. glikoz (Oxoid LP0071)100 ml distile su içinde eritilip 0.20 µm çaplı filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek +4°C de saklandı.

3.4 Fenol red solüsyonu (% 0,5)

0.5 g. Fenol red (Merck) 100 ml distile su içinde eritilip 0.20 µm çaplı filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek +4°C de saklandı.

3.5 Arginin solüsyonu (% 10)

5 g. Arginin (Merck) 50 ml distile su içinde eritilip, 0.20 µm çaplı filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek +4°C de saklandı.

3.6 Sodium phenolphthalein diphosphate solüsyonu (% 1)

0,5 g. phenolphthalein diphosphate tuzu (Sigma) 50 ml distile su içinde eritildi, 0.20 µm çaplı filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek +4°C de saklandı.

3.7 Tetrazolium solüsyonu (% 2)

2 g. 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (Merck) 50 ml distile su içinde eritilip 0.20 µm çaplı filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek +4°C de saklandı.

3.8 Digitonin solüsyonu

25 mg. Digitonin (Sigma) 5 ml % 95 etanol içinde eritilip, 56°C de 30 dk. ısıtıldı. Soğuduktan sonra 0.20 µm çaplı filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek +4°C de saklandı.

3.9 Digitonin Diskleri: 6 mm çapında steril filtre disklerine 25 µl miktarında digitonin solüsyonu emdirildi. Diskler 37 °C’de kuruyuncaya kadar etüvde bekletildi, kuruyan diskler + 4 °C’de saklandı.

3.9 Steril At serumu (Biochrom AG- S9135)

3.10 Kristal Penicillin (Kristapen-Deva)

4. Antiserumlar: İzolatların Üreme inhibisyon testi ile identifikasyonda kullanıldı.

4.1 *Mycoplasma bovis* antiserumu (Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü, İstanbul, Türkiye)

4.2 *Mycoplasma bovirhinis* antiserumu (Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü, İstanbul, Türkiye)

5. Besiyerleri

5.1. Mycoplasma Selektif Besiyeri:

Hayflick's medium: Şüpheli akciğer örneklerinden Mycoplasma cinsi bakterilerin izolasyonu amacıyla kullanıldı (134).

Hayflick's Buyyon

2,1 g. PPLO broth (Difco) 70 ml distile su içinde benmaride 100°C'de eritilip pH 7,6'ya ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Yeast extract (% 25'lik solüsyonu)10 ml
Steril inaktive at serumu20 ml
Thallium acetate % 50.4 ml
Glikoz (% 50'lik solüsyonu)..... 0.2 ml
Phenol red (% 1'lik solüsyonu)0.2 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml)..... 0.5 ml

ilave edilip, Laminar Flow kabinde 9 ml miktarında steril tüplere aktarıldı (134).

Hayflick's Agar

3,5 g. PPLO agar (Difco) 70 ml distile su içinde eritilip pH 7,6'ya ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Yeast extract (% 25'lik solüsyonu)10 ml
Steril inaktive at serumu 20 ml
Thallium acetate % 50.4 ml
Glikoz (% 50'lik solüsyonu)..... 0.2 ml
Phenol red (% 1'lik solüsyonu)0.2 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml)..... 0.5 ml

ilave edilip, Laminar Flow kabinde 9 cm çaplı steril cam petri plaklarına döküldü (134).

5.2. Biyokimyasal Test Besiyerleri

Poveda (141) tarafından bildirildiği şekilde aşağıdaki formülasyonlara göre hazırlandı.

Glikoz Fermentasyonu Testi Besiyeri

A.

PPLO broth 70 ml
Yeast extract (% 25'lik solüsyonu)10 ml
Steril İnaktive at serumu 20 ml
Glikoz (% 50'lik solüsyonu)..... 1 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml)..... 0.5 ml
Thallium acetate % 50.4 ml
Phenol red (% 1'lik solüsyonu)0.5 ml

B. Besi yeri glikozsuz olarak hazırlandı.

A ve B besiyerleri hazırlandıktan sonra 5 ml miktarında şişelere aktarıldı.

Arjinin Hidrolizi Besiyeri

A.

PPLO broth (pH 7.0)..... 70 ml
Yeast extract (% 25'lik solüsyonu)..... 10 ml
İnaktive at serumu20 ml
L. arginin HCl (% 10'luk solüsyonu)..... 5 ml
Thallium acetate % 50.4 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml)..... 0.5 ml
Phenol red (% 1'lik solüsyonu)..... 0.5 ml

B. Yukarıdaki besiyeri argininsiz olarak hazırlanır.

A ve B besiyerleri hazırlandıktan sonra 5 ml miktarında şişelere aktarıldı

Fosfataz Aktivitesi Besiyeri

PPLO agar	70 ml
İnaktive at serumu	20 ml
Yeast extract (% 25'lik solüsyonu).....	10 ml
Sodium phenolphthalein diphosphate (% 1 w/v sol.)	1 ml
Thallium acetate % 5	0.4 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml).....	0.5 ml
15-18 ml miktarında petri kutularına taksim edildi.	

- Yeast extracttan gelen fosfataz aktivitesini engellemek amacıyla Yeast extract solüsyonu benmaride 56° C'de 1 saat inaktive edildi.

Tetrazolium Redüksiyonu Besiyeri

PPLO agar	70 ml
İnaktive at serumu	20 ml
Yeast extract (% 25'lik solüsyonu).....	10 ml
Tetrazolium solüsyonu (% 2 w/v sol.)	1 ml
Thallium acetate % 5	0.4 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml).....	0.5 ml
15-18 ml miktarında petri kutularına döküldü.	

5.3. Genel Besiyeri

Kanlı Agar: Blood Agar Base No:2 (Oxoid-CM0271) üretici firmanın formülasyonuna göre hazırlanıp akciğerlerden diğer bakterilerin izolasyonu ve Mycoplasma türlerinin, bakterilerin L formlarından ayırımı amacıyla kullanıldı.

6. ELISA kiti: BIO-X PULMOTEST *MYCOPLASMA BOVIS* (BIO K 121), Bio-X Diagnostics (Luxemburg) – Akciğer homojenatlarında *M. bovis* antijeninin aranması için kullanıldı.

6.1.Kitin İçeriği

-Mikropleytlar: 2 adet 96 gözlü mikrotitrasyon pleyti. A,C,E ve G sıraları *M. bovis* spesifik poliklonal antikorlar ile B,D,F ve H sıraları ise kontrol antikorları (*M. bovis*'e spesifik olmayan poliklonal antikorlar) ile kaplanmıştır.

-Yıkama solüsyonu: Bir adet 100 ml'lik şişede 20 kat konsantre yıkama solüsyonu.

- Dilusyon buffer: 1 adet 50 ml'lik şişede 5 kat konsantre buffer.

- Konjugat: 1 adet 500 µl'lik anti-*M. bovis* konjugat şişesi(horse radish peroksidaz ile birleştirilmiş anti- *M. bovis* monoklonal antikoru). Bu reagent dilusyon buffer ile 1/50 oranında dilue edilerek kullanılır.

-Kontrol antijeni: 2 adet pozitif kontrol antijeni şişesi. Bu reagent 0,5 ml distile yada demineralize su ile çözdürülür. Çözdürmeden sonra, antijen -20°C'de saklanır.

-Kromojen solüsyonu: Bir adet 2ml'lik damlalıklı kromojen TMB (tetrametilbenzidin) şişesi. Bu reagent 4°C'de karanlık ortamda saklanır.

-Substrat solüsyonu: Bir adet 30 ml'lik hidrojen peroksit substrat solüsyonu. Bu reagent 4°C'de saklanır.

-Stop solüsyonu: Bir adet 15 ml'lik 1 M fosforik asit stop solüsyonu şişesi

- Hayflick medium: Bir adet 30 ml'lik steril medium şişesi.

-Antibiyotik-antimikotik karışımı: 2 adet liyofilize antibiyotik ve antimikotik içeren şişeler.

7. Karbondioksitli Etüv (ShellLab, 2300 CO₂ incubator)

8. Etüv(37°C) (Nüve EN 500)

9. Stereo Mikroskop (Olympus SZ2-ILST)

10. Binokuler Mikroskop (Olympus CH20BIMF200)

11. ELISA Reader (Biotek ELx-808-IU-USA)

12. **Otomatik Pipet** (20 μ l, 25 μ l,50 μ l,100 μ l,200 μ l,1000 μ l) (Eppendorf)
13. **Otomatik Pipet ucu** (Eppendorf)
14. **Su banyosu** (Elektro-mag M2535-6)
15. **Santrifüj** (Hettich universal 30RF)
16. **Isıtlı magnetik karıştırıcı** (Nüve MK 318)
17. **pH metre** (Merck)
18. **Derin Dondurucu** (Arçelik yatay derin dondurucu)
189. **Buzdolabı** (Arçelik Çift kapılı No-frost)
20. **Otoklav** (Nüve OT 4060)
21. **Steril tek kullanımlık pipet** (1 ml, 2ml, 5ml, 10ml)(LP Italiana SPA)
22. **Filtre 0.20 μ l'lik** (Sartorius- minisart)
23. **Filtre 0.45 μ l'lik** (Sartorius- minisart)
24. **Viyel 9mm'lik**
25. **Hassas terazi**
26. **Homojenizatör** (Miccra D-9)
27. **Laminar Flow Cabinet** (Nüve MN 120)
28. **Steril homojenat tüpleri**

29. Cam petri kutuları (7 cm çaplı)

30. Steril pastör pipeti

YÖNTEM

A. Bakteriyolojik İnceleme

1. İzolasyon Çalışmaları

İzolasyon için akciğer örneklerinden homojenat hazırlanarak ve direkt sürme şeklinde iki farklı ekim yöntemi uygulandı.

1.1 Akciğer Homojenatı Hazırlanması

Akciğerin lezyonlu kısmından kesilen 3x5 cm ölçülerinde kesilen parçanın dış yüzeyi alevden geçirildi içerisinde 5 ml PPLO buyyon bulunan steril homojenat tüpünün içine atıldı daha sonra ultraturaksta parçalanarak homojenize edildi. Homojenatın PPLO buyyonda 10^{-1} 'lik dilusyonu hazırlandı (134, 135).

1.2 Akciğer Örneklerinin Besiyerlerine Ekimi

Lezyonlu akciğerlerden hem direkt olarak hem de homojenat hazırlandıktan sonra ekimler yapıldı. Organ homojenatının 10^{-1} dilusyonundan Mycoplasma selektif agara 1-2 damla damlatıldı ve agar üzerinde dairesel hareketlerle yayılımı sağlandı. Yine homojenattan Mycoplasma selektif broth'a steril pipet ile 1 ml ekim yapıldı. Direkt ekim metodunda ise akciğerin lezyonlu kısmından 3x5 cm ölçülerinde bir parça alevden geçirildikten sonra steril makas ve pens yardımıyla kesilerek Mycoplasma selektif agarın üzerine organın direkt sürülmesi yöntemiyle ekim yapıldı. Ekim yapılan buyyon ve agarlar, 37°C de, nemli ve % 5 CO₂' li ortamda inkübe edildi. Sıvı besiyerleri üreme özellikleri yönünden her gün kontrol edildi. Agarlar 2-3 günde bir stereomikroskop altında tipik sahanda yumurta görünümlü kolonilerin varlığı yönünden incelendi (134, 135).

1.3 Pasajlama

Ekim yapılan besi yerinde üreme belirtisi varsa hemen pasajı yapıldı. Üreme belirtisi görülmeyen besi yerlerinden ise 7 gün ara ile 3 kez kör pasaj yapıldı. Agarlarda üreme belirtisi varsa; stereomikroskop altında kolonilerin yerleri belirlendi ve permanent cam kalemi ile alttan işaretlendi, agar üzerinde işaretli kısımlar steril pastör pipeti veya steril öze yardımıyla kesildi, agar blok yöntemiyle yine Mycoplasma selektif agara pasajı yapıldı. Ayrıca kesilen agar parçası Mycoplasma buyyona da ekildi. Buyyonlarda yoğun bulanıklık olmadan dipte tortu ve yüzeyde film oluşumu şeklinde üreme olduğunda; yeni

bir Mycoplasma buyyona 10^{-1} oranında ekim yapılarak, aynı buyyondan agara da 1-2 damla ekilerek kör pasajları yapıldı (134, 135).

1.4 Kolonilerin Klonlanması

Hayflick's agarda saptanan *Mycoplasma* spp. şüpheli kolonilerden seçilen tek koloni agar blok yöntemi ile çıkarıldı ve Mycoplasma selektif agara, agar blok ters çevrilerek bastırıldı ve steril öze ile agarın üzerine sürüldü. İki-üç gün inkübe edildikten sonra tek bir koloni seçilerek yine aynı işlem tekrarlandı. Üçüncü inkübasyondan sonra seçilen tek koloniler incelendiğinde orijinal morfolojisini koruyan koloniler *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirildi. Ayrıca İlk izole edilen koloniler L-formu kontaminantlardan ayırım amacıyla kanlı agara pasajlandı, kanlı agarda üreme olduğunda L formu kontaminant olarak değerlendirildi (134, 135).

2. İdentifikasyon Çalışmaları

Üç kez klonlanarak saf kültürü hazırlanan *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirilen izolatların biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testleri ile identifikasyonları yapıldı.

2.1 Digitonin Sensitivitesi

Testte kullanılan Mycoplasma agar 30-45 dk. etüvde tutularak yüzeyi kurutuldu. Test edilecek izolatin ve kontrol kültürünün 10 katlı dilasyonları yapıldı. 10^{-2} 'lik dilusyondan agar yüzeyine 200 µl miktarında yayıldı, pleyt oda ısısında bekletilip yüzeyi kurutulduktan sonra merkeze digitonin diski yerleştirildi, 37°C de, nemli ortamda inkübe edildi. Yirmi dört saat aralıklarla stereomikroskopta kontrol edildi. Beş mm'den daha fazla inhibisyon zonu oluşturanlar *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirildi (141).

2.2 Glikoz Fermentasyonu

Test edilecek izolatin 24-48 saatlik saf kültüründen 500 µl miktarında bir adet glikozlu ve bir adet glikozsuz besi yerine ekimleri yapıldı. Birer adet ekim yapılmamış glikozlu ve glikozsuz besiyeri de kontrol olarak kullanıldı. Besiyerleri 37°C'de, nemli ortamda 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Ekim yapılmış glikozlu besi yerinde asidik reaksiyon görüldüğünde (rengin açık sarıya dönmesi) kontrol tüplerinde değişiklik oluşmadığında glikoz fermentasyonu pozitif olarak değerlendirildi (141).

2.3 Arjinin Hidrolizi

Test edilecek izolatın 24–48 saatlik saf kültüründen 500 µl miktarında bir adet arjininli ve bir adet arjininsiz besi yerine ekimleri yapıldı. Birer adet ekim yapılmamış arjininli ve arjininsiz besi yeri de kontrol olarak kullanıldı. Besiyerleri 37°C’de, nemli ortamda 24–48 saat inkübasyona bırakıldı. Ekim yapılmış arjininli besiyerinde pembe renk oluşumu görüldüğünde ya da pH 7,0 dan 7,5 ve üzerine çıktığında, kontrol tüplerinde bir değişiklik oluşmadığında arjinin hidrolizi pozitif olarak değerlendirildi (141).

2.4 Fosfataz Aktivitesi

Fosfataz testi için hazırlanan agar plağı 2’ye bölündü. Test edilecek izolatın 24–48 saatlik saf kültüründen agar plağının yarısına 100 µl miktarında damlatma yöntemi ile ekim yapıldı, plağın diğer yarısı kontrol olarak boş bırakıldı. 37°C’de, nemli ortamda 3–5 gün inkübasyondan sonra 5 Normal 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 (141).

2.5 Tetrazolium Redüksiyonu

Test edilecek izolatın 24–48 saatlik saf kültüründen 2 ayrı tetrazolium agar plaklarına 0,2 ml miktarında ekildi. Ekim yapılan pleytin biri aerobik diğeri ise anaerobik koşullarda 37 °C’de, nemli ortamda 2 hafta inkübe edildi. Stereomikroskopta pembe veya kırmızı renk görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi (141).

2.6 Film ve Spot Oluşumu

Üreme olan agarların üzerinde ya da brothların 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 (141).

2.7 Üreme İnhibisyon Testi

Test edilecek izolatın 24–48 saatlik saf kültüründen 10^{-3} ’e kadar 10 katlı dilusyonlar hazırlandı. Test için 10^{-1} ve 10^{-3} olmak üzere en az iki dilusyon kullanıldı. Mycoplasma selektif agar bulunan petri plaklarının arka yüzüne permanent kalem ile boydan boya ve birbirine paralel olarak 2 çizgi çizildi. Her bir saf kültür dilusyonundan

50 µl çizginin bir kenarına bırakıldı, petri yaklaşık 45° eğilerek damlanın çizgi boyunca ilerlemesi sağlanarak düz bir hat şeklinde ekimi sağlandı. Petri oda ısısında 15 dk bekletilip ekim hattının kuruması sağlandı. Steril bir pastör pipeti kullanarak ekim hattının tam ortasından 6 mm çaplı bir agar parçası çıkarıldı. Oluşan çukura 30–50 µl *M. bovis* antiserumu konuldu, oda ısısında kuruması beklendikten sonra petri ters çevrilerek 37°C’de, nemli ortamda inkübe edildi. 2-3 günlük süre sonunda çukur etrafında 2 mm’den daha fazla üreme inhibisyon zonunun oluşması pozitif olarak değerlendirildi (141). *M. bovis* antiserumu ile negatif sonuç veren örnekler biyokimyasal testler ile değerlendirildikten sonra şüphelenilen *Mycoplasma* türleri yönünden farklı antiserumlar ile test edildi.

B. Serolojik İnceleme

1. Sandwich ELISA-BIO-X PULMOTEST MYCOPLASMA BOVIS (BIO K 121), Bio-X Diagnostics (Luxemburg)

Test Prosedürü:

- 1- Steril koşullar altında zenginleştirme vasatı hazırlandı. 1 şişe antibiyotik-antimikotik karışımı 1 ml zenginleştirme vasatı içerisinde suspanse edildi. Antibiyotik antimikotik karışımı 12 ml Hayflick mediumun içerisinde dilue edilerek kullanıma hazır hale getirildi.
- 2- Akciğer doku homojenatı hazırlamak için, yaklaşık 1 cm³’lük akciğer parçaları, 10 ml steril PBS solüsyonu içerisinde ultraturaks ile homojenize edildi.
- 3- Her örneğe 4 dilüsyon yapmak için steril mikropleyt kullanıldı. Her göze 240 µl Hayflick medium konuldu. Her örnek için 4 kuyucuk kullanıldı. İlk örnekten 30 µl ilk kuyucuktaki (A1) 240 µl mediumun içerisine eklendi (1:9 sulandırma), diğer örnekler de aynı yolla mikro pleyte aktarıldı (Örnek 2 A2 içine, Örnek 3 A3 içine ... örnek 12 A12 içine). Multikanallı pipet kullanarak ilk sıradaki dilüsyonlardan 30 µl alınarak B sırasındaki kuyucuklara aktarıldı (1: 81’lik dilüsyon), Aynı şekilde B sırasından, C sırasındaki (1:729 ‘luk dilüsyon) ve C sırasından D sırasındaki kuyucuklara (1: 6521’lik dilüsyon) aktarıldı.
- 4- Multikanallı mikropipet kullanarak daha önce sulandırma yaptığımız mikropleyitin D sırasındaki(en yüksek dilüsyondan başlayarak) her kuyucuktan 100’er µl miktarında diluent, kit içinde bulunan ELISA mikropleyitinin G ve H sırasındaki

kuyucuklara aktarıldı. Aynı yöntemle diğer sıradaki diluentler aktarıldı.

Sulandırma pleytinin C sırası, test pleytinin E ve F sıralarına; B sırası C ve D sıralarına, A sırası ise A ve B sıralarına aktarıldı. Kontrol stripi için A1,B1,C1 ve D1 kuyucuklarına 100'er µl miktarındaki pozitif kontrol aktarıldı, E1,F1,G1 ve H1 kuyucuklarına da 100'er µl miktarda Hayflick solüsyonu negatif kontrol olarak aktarıldı.

- 5- ELISA mikropleyti Minigrip® çantası içinde ve içerisine bir miktar su emdirilmiş kağıt (Mediumun kurummasını önlemek için) konularak 37 °C'de 3 gün süreyle inkübe edildi.
- 6- 3 günlük zenginleştirme basamağından sonra, yıkama solüsyonu ile pleyt yıkandı. Bu işlem için, mikropleyt ters çevrilerek içerik sodyum hipoklorid solüsyonu içeren bir küvet içerisine boşaltıldı. Tüm içeriğin temizlenmesi için mikropleyt ters çevrilerek temiz bir kurutma kağıdına hafifçe vuruldu. Daha sonra kullanılan kuyucuklar yıkama solüsyonu ile doldurularak tekrar boşaltılıp kurutma kağıdına ters çevrilerek vuruldu bu işlem 3 kez tekrarlandı.
- 7- Dilüsyon buffer ile 1:50 oranında dilüe edilen konjugattan (1 pleyt için 250 konjugat stok solüsyonu , 12.25 ml dilüsyon buffer ile dilüe edildi) her kuyucuğa 100'er µl konuldu. 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 8- 6. basamakta uygulandığı şekilde pleyt yıkandı.
- 9- 9.5 ml(1 mikropleyt için gerekli miktar) substrat solüsyonunun içerisine 12 damla (500 µl) kromojen eklenerek indikatör karışımı hazırlandı. Her kuyucuğa 100'er µl indikatör karışımından konuldu.
- 10- Mikropleyt karanlık ortamda oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
- 11- Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi.
- 12- Mikropleyt spektrofotometrede (ELISA okuyucuda) 450 nm dalga boyundaki filtre ile optikal dansite okundu.

Sonuçların Yorumlanması

Her örneğin net optikal dansitesi, örneğin bulunduğu kuyucuğun optikal dansitesinden negatif kontrolün optikal dansitesi çıkarılarak hesaplandı.

Aynı işlem pozitif kontrol içinde uygulandı. Eğer pozitif kontrol antijeni, test kitinin içinde bulunan kalite kontrol belgesinde verilen değerden daha büyük optikal dansite değeri verirse test validasyonu sağlanmış olur.

Antijen için pozitiflik limiti 0.150' dir. Herhangi bir örnekte optikal dansite 0.150'den büyük ya da eşitse pozitif olarak kabul edildi. Buna karşın 0.150'den daha az optikal dansite veren örnek negatif olarak kabul edildi.

Sandwich ELISA'nın Spesifite ve Sensitivitesinin Değerlendirilmesi

Sandwich ELISA'nın sonuçlarının değerlendirilmesinde Tablo-3 'de belirtilen formüllerden yararlanılarak spesifite ve sensitivite değerleri hesaplandı (195).

Tablo 3. Sandwich ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan formüller

Bakteriyolojik İzolasyon					
Test	var		yok		Toplam
	n	n	n	n	
Pozitif	Gerçek Pozitif (GP)	a	Yanlış Pozitif (YP)	c	a+c
Negatif	Yanlış Negatif (YN)	b	Gerçek Negatif (GN)	d	b+d
Toplam		a+b		c+d	

Sensitivite: Bir test sonucunun hastalığın varlığı durumunda pozitif olma olasılığıdır. Gerçek pozitifleri belirleme oranı olarak da adlandırılabilir, yüzde değer olarak gösterilir (195).

Sensitivite: $a/(a+b)$

Spesifite: Hastalığın olmadığı durumda bir testin sonucunun negatif olma olasılığıdır. Gerçek negatiflik oranı olarak da adlandırılabilir, yüzde değer olarak gösterilir (195).

Spesifite: $d/(c+d)$

BULGULAR

Makroskopik Bulgular

İncelenen 1482 akciğerin 142'sinde ve laboratuvarımıza getirilen akciğer örneklerinin 10'unda makroskopik olarak pnömoni bulgusu gözlemlendi (Şekil-1). Etkilenen akciğer loblarında mermer manzarası görünümünde konsolidasyon sahaları ile grimsi krem renkte, multifokal nekroz alanları görüldü. Bu nekroz alanları yer yer sert kıvamdaydı ve nodüler yapı göstermekteydi. Nekrozun özellikle bronş ve bronşioller etrafındaki akciğer bölgelerini etkilemiş olduğu dikkati çekti. Nekroz alanlarının kesit yüzlerinde bağ dokudan kapsül ile çevrelenmiş nekrotik-irinli bölgeler veya koagülasyon nekrozları gözlemlendi. Bronş ve bronşiol lümenlerinde yer yer irinli eksudat ile karşılaşıldı.

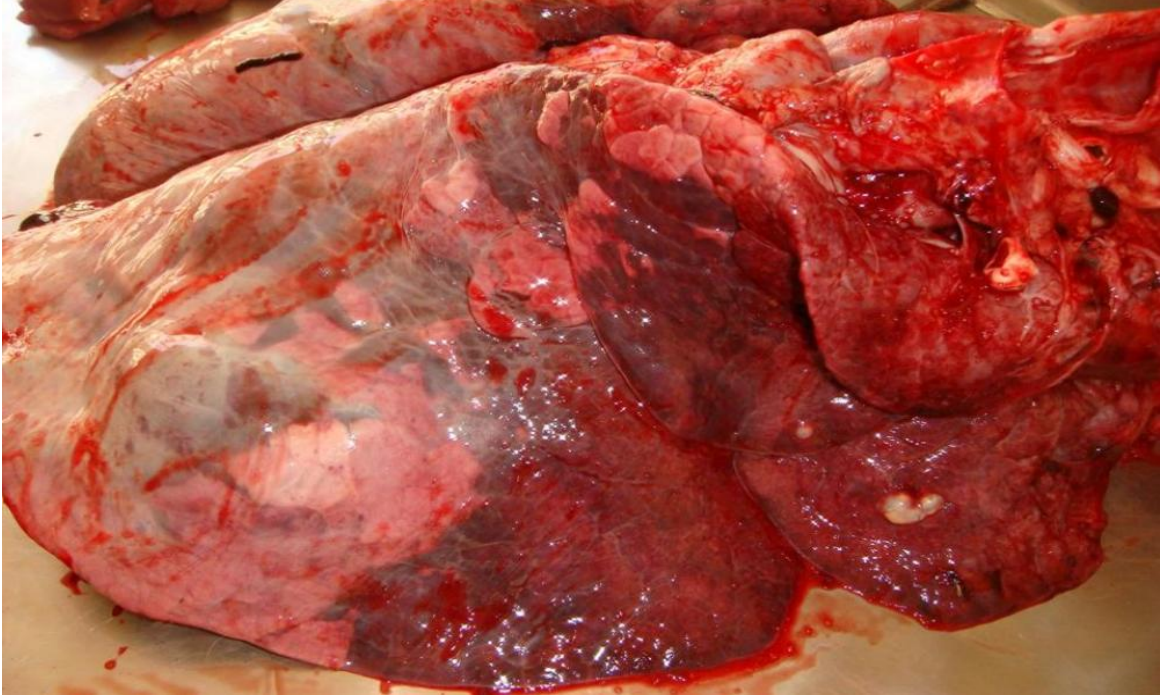
İzolasyon Çalışmaları

Pnömonili 152 akciğer örneğinden 52 tanesinde ilk izolasyonda mycoplasma şüpheli koloniler görüldü. İlk izolasyonda üreme belirtisi gözlemlenmeyen ve 3 kez kör pasajı yapılan besi yerlerinin hiçbirinde Mycoplasma şüpheli koloniler saptanamadı. Mycoplasma şüpheli 52 örneğin 3 kez klonlanmasından ve kanlı agara pasajından sonra tipik sahanda yumurta görünümünü koruyan 39 (% 25.65) örnek *Mycoplasma spp.* olarak değerlendirildi.

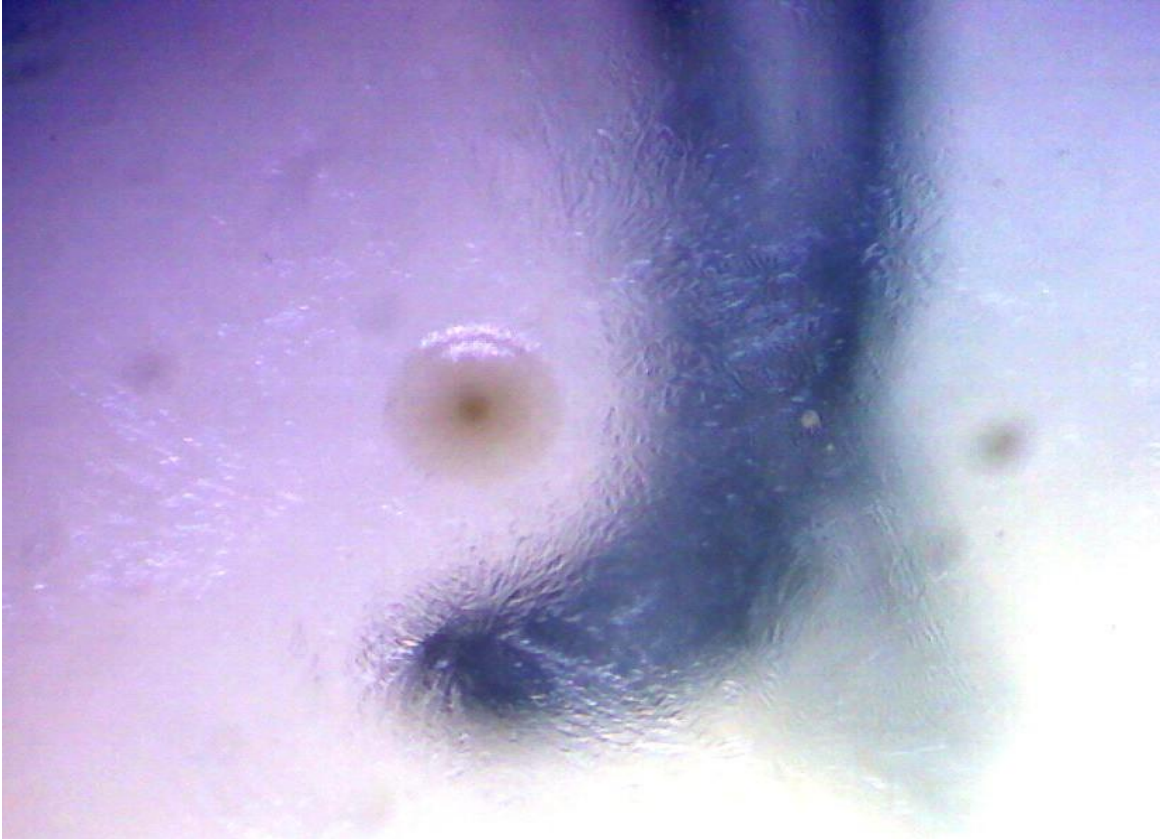
İzole edilen 39 *Mycoplasma* izolatının hepsi hem direkt hem de homojenattan olmak üzere yapılan her iki ekim yöntemi ile de üreme gösterdi. *Mycoplasma* olarak değerlendirilmeyen L formu kontaminantlar 13 örnekte saptandı. Bunların 11 tanesi sadece homojenat yöntemi ile ekim yapılan besiyerlerinde, 2 tanesi de her iki yöntemle ekim yapılan besi yerlerinde saptandı.

Otuz dokuz örneğin stereomikroskoptaki (x40) koloni morfolojilerinin tipik sahanda yumurta görünümünde ortası düğmeli, kenarları yuvarlak ve küçük oldukları görüldü (Şekil-2).

laboratuvara getirilen örnekler ayrıca pnömoniyeye yol açan diğer bakteriyel etkenler yönünden konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle incelendi. Bu inceleme sonucunda 33 örnekten toplam 37 bakteri izolasyonu yapıldı.



Şekil-1. *M. bovis*'in neden olduğu pnömonili akciğerin makroskobik görünümü



Şekil-2. *M. bovis*'in stereomikroskopik görünümü

İdentifikasyon Çalışmaları

Digitonin Sensitivitesi

Mycoplasma agarda yapılan digitonin duyarlılık testinde, izole edilen tüm suşların digitonin diski etrafında 5 mm'den büyük zon oluşturduğu ve digitonine duyarlı oldukları saptandı.

Glikoz Fermentasyonu

İzole edilen suşlardan 1 adedinin (*M. bovirhinis*) glikozlu PPLO buyyonun rengini açık sarıya döndürdüğü görüldü ve glikoz fermentasyonu pozitif kabul edildi. Diğer 38 suşda besiyerinde herhangi bir renk değişikliği görülmediğinden glikoz fermentasyonu negatif olarak değerlendirildi.

Arjinin Hidrolizi

İzole edilen suşlardan hiç birisi arjininli besiyerinin rengini değiştirmedeği için tüm suşlar arjinin hidrolizi yönünden negatif olarak değerlendirildi.

Fosfataz Aktivitesi

İzole edilen suşların fosfataz testi besiyerindeki kolonilerinin üzerine 1 damla 5 Normal Sodyum Hidroksit damlatıldıktan sonra, 38 örnekte 1-2 dakika içinde kırmızı renk oluşumu gözlemlendi ve fosfataz pozitif olarak değerlendirildi. Suşlardan birinde ise renk değişimi gözlenmediğinden fosfataz negatif olarak değerlendirildi.

Tetrazolium Redüksiyonu:

İzole edilen tüm suşlarda hem aerobik hem de anaerobik inkübasyon sonunda tetrazolium besiyerinde üreme olan bölgelerde pembe veya kırmızı renk görüldüğünden tetrazolium redüksiyonu pozitif olarak değerlendirildi.

Film ve Spot Oluşumu

İzole edilen Mycoplasma suşlarının 38'inde 1 haftalık inkübasyondan sonra sıvı besiyerinde film, katı besiyerinde spot oluşumu gözlemlendi. 1 suşta ise film ve spot oluşumu saptanamadı.

Üreme İnhibisyon Testi

Üreme inhibisyon testinde her izolat için yapılan 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar 3 farklı dilusyonda üreme inhibisyon zonunun en iyi belirlendiği dilusyon 10^{-2} olarak tespit edildi. İzole edilen mycoplasma suşlarından 38'inin *M. bovis* antiserumu ile yapılan üreme inhibisyon testinde 2 mm'den fazla üreme inhibisyon zonu oluştuğu görüldü. 1 örnekte ise *M. bovis* antiserumu ile yapılan üreme inhibisyon testinde hiç inhibisyon zonu oluşmadı. Bu örneğin *M. bovirhins* antiserumu ile yapılan testinde 2 mm'den fazla inhibisyon zonu oluştuğu görüldü.

Biyokimyasal testler (Tablo-4) ve üreme inhibisyon testleri sonucunda 39 izolatanın 38 (% 97.43) adedi *M. bovis*, 1 adedi ise *M. bovirhins* (% 2.5) olarak identifiye edildi.

Tablo 4 . İzole edilen Mycoplasma suşlarının biyokimyasal özellikleri

İzole Edilen Suşlar (N)	Digitonin Duyarlılığı	Glikoz Fermentasyonu	Arjinin Hidrolizi	Fosfataz Aktivitesi	Tetrazolium Redüksiyonu	Film/Spot Oluşumu
<i>M. bovis</i> (38)	D	-	-	+	+	+
<i>M. bovirhins</i> (1)	D	+	-	-	+	-

D:Duyarlı

Diğer Bakteriyel Etkenler Yönünden Bakteriyolojik İncelemeler

Diğer bakteriyel etkenler yönünden rutin bakteriyolojik yöntemler kullanılarak yapılan incelemelerde 33 adet örnekten izole edilen 37 bakterinin koloni morfolojisi, gram boyama ve rutin biyokimyasal testler ile identifikasyonları yapıldı. Bunlardan 10'u *Pasteurella multocida*, 6'sı *Mannheimia haemolytica*, 10'u *Arcanobacterium pyogenes*, 6'sı *Streptococcus spp.*, 2'si *Escherichia coli*, 3'ü *Yeast spp.* olarak saptandı. *M. bovis* yönünden pozitif bulunan 38 vakadan 30'unda *M. bovis* izole edilen tek etkendi. Sekiz vakada ise *M. bovis*'in yanı sıra ; 2' sinde *P. multocida* , 2'sinde *M. haemolytica*, 1'inde *Streptococcus spp.*, 1'inde *A. pyogenes*, 1 tanesinde *P. multocida* ve *A. pyogenes* birlikte, 1 tanesinde ise *P. multocida* ve *Streptococcus spp.* birlikte izole edildi (Tablo 5). *M. bovirhins* olarak izole edilen vakada ise herhangi bir başka bakteri izole edilmedi.

Tablo-5. Pnömonili akciğerlerden izole edilen bakterilerin sayıları ve yüzde oranları

BAKTERİ TÜRLERİ	İZOLASYON SAYISI	YÜZDE ORANI *
<i>M. bovis</i>	38	% 25
<i>M. bovirhinis</i>	1	% 0,6
<i>P. multocida</i>	10	% 6,5
<i>M. haemolytica</i>	6	% 3,9
<i>A. pyogenes</i>	10	% 6,5
<i>Streptococcus spp</i>	6	% 3,9
<i>E. coli</i>	2	% 1,3
<i>Yeast spp.</i>	3	% 1,9

*: Toplam 152 pnömonili akciğer sayısına göre değerlendirildi

Sandwich ELISA Sonuçları

İncelenen 44 adet akciğer homojenatınının 38 adedi Sandwich ELISA testinde pozitif, 6 adedi ise negatif sonuç verdi. Akciğer homojenatı örneklerinden izole edilen bakteriler ve Sandwich ELISA testi sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo-6'da sunulmuştur.

Tablo-6. İzole edilen bakteriler ve Sandwich ELISA sonuçları

Sıra No	Örnek NO	İzole Edilen Etken/ Etkenler	Sandwich ELISA sonuçları
1	13	<i>M. bovis</i>	Pozitif
2	14	<i>M. bovis</i>	Pozitif
3	16	<i>A. pyogenes</i>	Test yapılmadı
4	17	<i>M. bovis</i>	Pozitif
5	19	<i>M. bovis</i>	Pozitif
6	20	<i>M. bovis</i>	Pozitif
7	26	<i>M. bovis</i>	Pozitif
8	27	<i>Streptococcus sp.</i>	Test yapılmadı
9	29	<i>M. bovis</i>	Pozitif
10	30	<i>M. bovis</i>	Pozitif
11	33	<i>M. bovis</i>	Pozitif
12	34	<i>M. bovis</i>	Pozitif
13	35	<i>M. bovis</i>	Pozitif

14	36	<i>M. bovis</i>	Pozitif
15	37	<i>M. bovis</i>	Pozitif
16	39	<i>M. bovis</i>	Pozitif
17	40	<i>M. bovis</i>	Pozitif
18	41	<i>P. multocida</i>	Negatif
19	42	<i>M. bovis</i> + <i>M. haemolytica</i>	Pozitif
20	43	<i>M. bovirhinis</i>	Negatif
21	44	<i>Yeast sp.</i>	Test yapılmadı
22	45	<i>M. bovis</i>	Pozitif
23	49	<i>M. bovis</i>	Pozitif
24	51	<i>M. haemolytica</i>	Test yapılmadı
25	54	<i>E. coli</i>	Test yapılmadı
26	55	<i>M. bovis</i>	Pozitif
27	56	<i>M. bovis</i>	Pozitif
28	57	<i>A. pyogenes</i>	Test yapılmadı
29	60	<i>M. bovis</i> + <i>P. multocida</i> + <i>A. pyogenes</i>	Pozitif
30	64	<i>M. bovis</i>	Pozitif
31	65	<i>M. bovis</i>	Pozitif
32	70	<i>M. bovis</i> + <i>Streptococcus sp.</i>	Pozitif
33	73	<i>Streptococcus sp.</i>	Test yapılmadı
34	76	<i>A. pyogenes</i>	Test yapılmadı
35	77	<i>Streptococcus sp.</i>	Negatif
36	78	<i>A. pyogenes</i>	Test yapılmadı
37	79	<i>M. bovis</i>	Pozitif
38	80	<i>M. bovis</i>	Pozitif
39	84	<i>M. bovis</i> + <i>Streptococcus sp.</i> + <i>P. multocida</i>	Pozitif
40	85	<i>A. pyogenes</i>	Test yapılmadı
41	92	<i>M. bovis</i>	Pozitif
42	95	<i>A. pyogenes</i>	Negatif
43	96	<i>A. pyogenes</i>	Test yapılmadı
44	98	<i>M. bovis</i>	Pozitif
45	99	<i>M. bovis</i>	Pozitif
46	101	<i>M. bovis</i>	Pozitif
47	111	<i>M. bovis</i>	Pozitif
48	112	<i>M. bovis</i> + <i>P. multocida</i>	Pozitif
49	115	<i>P. multocida</i>	Test yapılmadı
50	117	<i>M. bovis</i>	Pozitif
51	119	<i>M. bovis</i> + <i>P. multocida</i>	Pozitif
52	121	<i>P. multocida</i>	Test yapılmadı

53	128	<i>P. multocida</i> + <i>Yeast</i> sp.	Test yapılmadı
54	130	<i>P. multocida</i>	Test yapılmadı
55	131	<i>M. haemolytica</i>	Negatif
56	133	<i>Streptococcus</i> sp.	Test yapılmadı
57	134	<i>Yeast</i> sp.	Test yapılmadı
58	148	<i>M. bovis</i> + <i>A. pyogenes</i>	Pozitif
59	144	<i>M. haemolytica</i>	Test yapılmadı
60	145	<i>M. bovis</i> + <i>M. haemolytica</i>	Pozitif
61	146	<i>M. haemolytica</i> + <i>P. multocida</i>	Test yapılmadı
62	147	<i>E. coli</i>	Negatif
63	148	<i>A. pyogenes</i>	Test yapılmadı
64	151	<i>M. bovis</i>	Pozitif

Sandwich ELISA'nın Spesifite ve Sensitivitesi

Sandwich ELISA sonuçları bakteriyoloji sonuçlarına göre değerlendirildiğinde *M. bovis* olarak tanımlanan 38 örneğin hepsi Sandwich ELISA testinde gerçek pozitif sonuç verdi ve yanlış negatif sonuç elde edilmedi. Bakteriyolojide *M. bovis* izole edilmeyen ancak diğer bakteriler yönünden pozitif olan (1 *M. bovirhinis*, 1 *M. haemolytica*, 1 *P. multocida*, 1 *A. pyogenes*, 1 *Streptococcus* sp., 1 *E. coli*) 6 örnek Sandwich ELISA testinde gerçek negatif sonuç verdi, yanlış pozitif sonuç elde edilmedi (Tablo-7). Bu sonuçlara göre Sandwich ELISA testinin sensitivitesi % 100 (38/38), spesifitesi % 100 (6/6) bulunmuştur.

Tablo-7. Sandwich ELISA'nın Spesifite ve Sensitivite Değerlendirmesi

Sandwich ELISA Sonuçları	Bakteriyolojik İzolasyon (<i>M. bovis</i>)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	38 (GP)	- (YP)	38
Negatif	- (YN)	6 (GN)	6
Toplam	38	6	

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır yetiştiriciliğinde en önemli problemlerden birisi pnömonilerdir.

Mycoplasmaların yol açtığı pnömoniler içerisinde dünyada en yaygın olan etken *M. bovis*'tir. Günümüzde bu infeksiyon birçok Avrupa ülkesi de dahil olmak üzere dünyanın her yerinden bildirilmektedir. Görüldüğü ülkeler arasında İsrail (1964), İspanya (1967), Avustralya (1970), Fransa (1974), İngiltere (1975), Çekoslovakya(1975), Almanya(1977), Danimarka(1981), İsviçre (1983), Fas (1988), Güney Kore (1989), Brezilya (1989) Kuzey İrlanda (1993), İrlanda Cumhuriyeti(1994) ve Şili (2000), Güney Afrika(2005), Çek Cumhuriyeti (2007) yer almaktadır (6,12). Dünyada yapılan farklı çalışmalarda sığırlarda pnömoni vakalarından *M. bovis* izolasyon oranları ülkeler arasında değişkenlik göstermektedir. Bu oranlar İrlanda'da % 13-23, Fransa'da % 30, Macaristan'da % 11,8, İtalya'da % 25, Kanada'da % 91-94, Nijerya'da % 23 olarak bildirilmiştir (14, 15,18, 19, 20, 101, 196). Ülkemizde ise Sığırlarda Mycoplasma pnömonileri üzerine sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (22-27, 197, 198). Bu çalışmalarda pnömonili sığır akciğerlerinde *M. bovis*'in yaygınlık oranı % 4 ile % 41.3 arasında değişmektedir (24, 25, 27, 197). En güncel olan çalışmada ise Çetinkaya ve arkadaşları (26) *M. bovis*'i pnömonili sığır akciğerlerinden % 50, solunum yolu hastalığı semptomlu sığırların burun svablarından ise % 81.3 oranında izole etmişlerdir. Bu tez çalışmasında Türkiye'deki sığır popülasyonunun en yoğun olduğu bölgelerden biri olan Marmara bölgesinde Bursa ili ve çevresinde yer alan mezbahalarda kesilen sığırlardaki pnömonilerde *M. bovis* oranının % 25 olduğu ortaya konmuştur.

Bu çalışmada pnömonili akciğerlerden *M. bovis* izole ve identifiye edilmiş ve Antijen-Capture Sandwich ELISA ile direkt dokudan hızlı teşhisi yapılmıştır. Ayrıca sığırlarda pnömoniyeye yol açan diğer bakteriler de rutin bakteriyoloji ile tespit edilmiştir. Çalışma materyali için Bursa ve çevresindeki mezbahalarda kesilen sığırlardan yararlanılmıştır. Çalışmanın deneysel bir çalışma olmaması ve mezbahada kesilen hayvanlarla yürütülmüş olması beraberinde çeşitli güçlükleri de getirmiştir. Hayvanların kesildiği ortamla, karkasın incelendiği ve akciğerlerin karkastan ayrıldığı ortamların birbirinden farklı yerler olması hayvanlardan kan alınmasını ve hayvanlardaki diğer lezyonların takip edilmesini güçleştiren faktörlerdir. Benzer sebeplerden hayvanların orijini ile ilgili detaylı bilgiler alınamamıştır ve yaşlarına ait kesin bilgiler de toplanmamıştır. Mezbaha Veteriner Hekimleri ile yapılan görüşmeler sonucu hayvanların

çoğunun Bursa ve yakın çevrelerde yetiştirilen hayvanlar olduğu ve kesimlik çağa ulaşmış 1 yaşın üzerinde sığırlardan oluştuğu düşünülmektedir.

M. bovis'in diğer bazı mycoplasmalar ile birlikte sağlıklı hayvanların üst solunum yollarında kommensal olarak bulunabildiği ve alt solunum yoluna ulaştığı zaman hastalık oluşturduğu bildirilmektedir (120, 199). Ayrıca klinik örneklerden mycoplasmaların izolasyonu normal sağlıklı hayvanlarda geniş çapta dağılım gösterdiğinden etiyolojik durumu belirlemede konfirme edici değildir (36). Etken izolasyonuna yönelik birçok çalışmada sağlıklı buzağuların akciğerlerinde *M. bovis* enfeksiyonunun prevalansı % 0-7 arasında bulunmuştur (4, 14, 121, 181, 200). Bir çalışmada sağlıklı buzağularda besi ünitesine alınırken enfeksiyon prevalansı % 40-60, 12 hafta sonra neredeyse % 100'e kadar artmış olarak bulunmuştur (74). Pnömonili sığırların akciğerlerinde sağlıklı olanların akciğerlerine göre *M. bovis* daha yaygındır. Yapılan klinik çalışmalarda prevalans değerleri % 20-90 arasında bulunmuştur (15, 20, 74, 121, 128, 133, 138, 201-204). Çalışmamızda pnömoni olgularında *M. bovis* varlığını ortaya koymak için lezyonlu akciğer örneklerinden izolasyon yapılmıştır. Akciğer örnekleri besiyerlerine ekilirken akciğerdeki lezyonlu kısımdan direkt sürme ile ve homojenat hazırlanarak 2 farklı ekim yöntemi uygulanmıştır. İzole edilen 39 Mycoplasma türünün hepsi her iki yöntemle de üreme göstermiştir. Ancak ilk izolasyonda Mycoplasma benzeri koloni oluşturan fakat L-koloni formlarından ayırmak amacıyla antibiyotik içermeyen besiyerine pasajı sonucu L-formu kontaminant olarak saptanan 13 örneğin, 11 tanesi sadece homojenat yöntemi ile ekim yapılan besiyerlerinde, 2 tanesi de her iki yöntemle ekim yapılan besi yerlerinde saptanmıştır. Homojenat hazırlanarak yapılan ekimlerde izolasyon şansı artmakla birlikte, kontaminasyon olasılığının da arttığı ortaya konulmuştur. Kontaminasyon olasılığı yönünden direkt sürme yöntemi ile yapılan ekim homojenat hazırlanarak yapılan ekime göre daha avantajlıdır

Mycoplasmaların stereomikroskop altında koloni morfolojileri türlere göre değişkenlik göstermektedir, koloni morfolojileri besiyeri, kültürün inkübasyon süresi ve pasaj durumuna göre de değişmektedir (134,135). *M. bovis*'in genellikle 2-5 günde küçük (0,1-0.5 mm), koyu ve halesiz koloniler oluşturabildiği bildirilmektedir (140). Bu çalışmada izole edilen *M. bovis* suşlarının küçük, ortası düğmeli, kenarları düzgün koloniler oluşturdukları, ancak inkübasyon süresi arttıkça kolonilerin biraz daha büyük bir form aldığı gözlemlendi. İzole edilen *M. bovirhinis*'in ise koloni morfolojisinin *M. bovis*'e göre daha büyük, kenarları düzgün ve merkezinin daha küçük olduğu gözlemlendi.

Mycoplasma kolonilerinin identifikasyonunda biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır. Cins düzeyinde Acheloplasma ve Ureaplasmalardan digitonin duyarlılığı ve üreaz testleriyle ayrılırlar. Mycoplasmaların identifikasyonunda serolojik yöntemler haricinde glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi ve tetrazolium redüksiyonu gibi biyokimyasal testlerden yararlanır (6, 8, 28, 141). Bu çalışmada izole edilen Mycoplasma suşları digitonin duyarlılığı, glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu özellikleri yönünden incelenmiş. *M. bovis* izolatlarının hepsinin digitonine duyarlı olduğu, glikoz ve arjinin testlerine negatif, fosfataz ve tetrazolium testlerine pozitif yanıt verdiği ayrıca film ve spot oluşturduğu saptanmıştır. Araştırma sonuçlarımız *M. bovis*'in identifikasyonunda belirtilen biyokimyasal özellikleri ile paralellik göstermektedir (6, 12, 196).

Mycoplasmalar diğer bakterilerden farklı olarak komplemente gereksinim duymadan antiserumla inhibe olurlar, spesifik olan bu reaksiyon identifikasyonlarında başarı ile kullanılır. Biyokimyasal testlerin yanı sıra tür spesifik identifikasyon için hiperimmün tavşan serumları kullanılarak üreme inhibisyon, film inhibisyon, fleurosan antikör ve metabolik inhibisyon testleri *M. bovis* identifikasyonunda kullanılabilir (142). Bu çalışmada uygulama kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılan üreme inhibisyon testinden yararlanılmıştır. Üreme inhibisyon testi agar çukur yöntemi ya da antiserum emdirilmiş filtre kağıtları ile yapılabilir (142). Filtre kağıdı ile yapılan test daha ekonomik olmakla birlikte, agar çukur yönteminde antiserum miktarı daha standart olarak kullanılabilir. Bu çalışmada üreme inhibisyon testi için agar çukur yöntemi uygulanmış, izole edilen Mycoplasma suşlarının 38 tanesinin *M. bovis*, 1 tanesinin ise *M. bovirhinis* olduğu tespit edilmiştir. Üreme inhibisyon testinde her izolat için 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar 3 farklı dilusyonda test yapılmıştır, üreme inhibisyon zonunun en iyi belirlendiği dilusyon 10^{-2} olarak tespit edilmiştir.

Mycoplasmaların laboratuvar teşhis prosedürünün diğer bakteriyel etkenlere göre daha güç olması ve daha fazla zaman gerektirdiği için son yıllarda Mycoplasmaların teşhisinde hızlı alternatif metotlar geliştirilmiştir. Ball ve Findlay (145) *M. bovis* spesifik monoklonal antikörleri ile ortamda *M. bovis* antijenini tespit eden bir Sandwich (Capture) ELISA geliştirmişlerdir. Testin şu an ticari şekli de mevcuttur (BIO-X, Belgium). Bu test diğer Mycoplasma türleri ve Acheloplasmalar ile kros reaksiyon vermemektedir (205). *M. bovis*'in teşhisinde Sandwich ELISA yöntemi dünyada çeşitli araştırmacılar tarafından da kullanılmıştır (19, 21, 146, 147, 205). Boothby ve arkadaşları (154) monoklonal

antikorlar ile sütte *M. bovis* tespit etmek için ELISA yöntemini uygulamış ve spesifitesini % 100, sensitivitesini broth zenginleştirme işlemi öncesi % 65 zenginleştirme sonrası % 86 bulmuşlardır. Heller ve arkadaşları (146) süt örneklerinden *M. bovis*'i tespit etmek amacıyla antijen capture ELISA yöntemini uygulamışlar, testin sensitivitesini % 80.6, spesifitesini % 94.9 bulmuşlar ve test öncesi 48 saatlik inkubasyonun testin sensitivitesini % 10 arttırdığını bildirmişlerdir. Tenk ve arkadaşları (147) klinik örneklerden direkt kültür yöntemi ve Sandwich ELISA yöntemini birlikte kullandığı çalışmada iki yöntemle de aynı sonuçları elde etmiş, testin spesifik ve güvenilir bir test olduğunu, daha az zaman gerektirdiğinden *M. bovis*'in teşhisinde kültür yöntemine alternatif olarak güvenle kullanılabileceğini belirtmiştir. Blackburn (21) çalışmada toplam 214 sürüde 1328 numuneden 282 'sinde kültür ve antijen capture ELISA yöntemi ile *M. bovis* tespit etmiştir, testin zenginleştirme basamağında bazı çukurlarda bakteriyel kontaminasyonla karşılaşmış bu örnekleri 0.45 µl filtreden geçirdikten sonra tekrar test etmiş ve bazılarında pozitiflik elde etmiştir. Türkiye'de doku örneklerinden *M. bovis*'in identifikasyonu amacıyla Sandwich ELISA yönteminin kullanımına dair herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Bu çalışmada *Mycoplasma* spp. olarak izole edilen 39 örnek ve *Mycoplasma* yönünden negatif bulunan 5 örnek olmak üzere toplam 44 örnekten hazırlanan akciğer homojenatlarından *M. bovis*'in hızlı tespiti amacıyla Sandwich ELISA testi yapıldı. Testin ilk basamağı olan zenginleştirme işleminde pleyt 3 gün 37°C'de rutubetli ortamda inkübe edilmiş ve Blackburn'un (21) çalışmasının aksine kuyucuklarda herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır. Çalışmada Sandwich ELISA testinde bakteriyolojik olarak *M. bovis* izole edilen 38 örneğin hepsinin pozitif, *M. bovis* izole edilmeyen 6 örneğin hepsi negatif sonuç verdi. Sandwich ELISA testinin sensitivitesi % 100, spesifitesi % 100 olarak bulundu. Bu değerler Tenk'in çalışması ile uyumlu olarak (147) Sandwich ELISA yönteminin sensitivite ve spesifitesinin çok yüksek olduğunu göstermiştir. Sandwich ELISA'nın klasik bakteriyolojik identifikasyon prosedürüne göre 3 gün gibi kısa bir sürede *M. bovis*'i identifiye edebilmesi testin en önemli avantajıdır. Testin tek dezavantajı bir pleytte sadece 11 adet numunenin çalışılabilmesi olmasından ötürü maliyetinin kültür yöntemine göre fazla olmasıdır. Ancak özellikle sürü bazında fazla sayıda örnekle çalışılacağı zaman hızlı bir şekilde sonuç alınabilecek güvenilir bir testtir. Test prosedüründe akciğer doku homojenatlarının yanı sıra, bronkoalveolar lavaj sıvısı, nazal svab, eklem sıvısı ve süt gibi klinik örneklerden de bu testin yapılabileceği bildirilmiştir (145, 146). Özellikle klinik vakalarda *M. bovis* yönünden inceleme amacıyla Sandwich ELISA'nın kullanımının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Sığırlarda pnömoni olgularında mycoplasmaların yanı sıra diğer patojenler de yer almaktadır. Birçok vakada *M. bovis*'e bağlı pnömonilerde diğer patojenler de izole edilmektedir bunlar pnömoni lezyonları oluşumunda *M. bovis*'in rolünü belirlemeyi güçleştirmektedir. Bu çalışma'da diğer bakteriyel etkenler yönünden rutin bakteriyolojik yöntemler kullanılarak yapılan incelemelerde 33 adet örnekten 37 bakteri izole edildi. Bunlardan 10'u *Pasteurella multocida*, 6'sı *Mannheimia haemolytica*, 10'u *Arcanobacterium pyogenes*, 6'sı *Streptococcus* spp., 2'si *E. coli*, 3'ü Yeast spp. olarak saptandı. Bu çalışmada ise pnömonili akciğerlerden *M. bovis* dışındaki solunum yolu patojenleri diğer çalışmalara kıyasla oldukça düşük oranlarda (*P. multocida* % 6.5, *A. pyogenes* % 6.5 ve *M. haemolytica* % 3,9) bulunmuştur. Bunun nedeni olarak kronik solunum hastalığına karşı hayvanlara kesim öncesi yoğun antibiyotik uygulaması yapıldığı düşünülmüştür.

M. bovis'in konakçı savunma sistemini zayıflattığı ve diğer patojenlerin yerleşmesi için akciğerlerde uygun bir ortam oluşturduğu, dolayısıyla mikros infeksiyonların görülebildiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (9, 206). Arcangioli ve arkadaşları (132) *M. bovis*'in hastalık oluşumunun erken safhasında görüldüğünü ve BRD salgınlarının oluşumunda primer ya da başlatıcı etken olabileceğini belirtmişlerdir. *M. bovis*'le birlikte sıklıkla izole edilen bakteriyel etkenler arasında *M. haemolytica*, *P. multocida*, *A. pyogenes* ve daha az sıklıkta *H. somni*, viral etkenler arasında ise bovine herpes virus -1, bovine respiratory syncytial virus ve parainfluenza -3 virusu gibi virüsler yer almaktadır (6). Byrne ve arkadaşları (20) *P. multocida*, *M. haemolytica*, bovine parainfluenza virus 3 (BPV3) ve bovine herpesvirus 1 (BHV1) gibi diğer patojenleri *M. bovis* pozitif vakaların % 66'ından tanımlamışlardır. Haines ve arkadaşları (206) kronik solunum hastalıklı ve tedaviye yanıt vermeyen 49 besi sığırında immunohistokimya yöntemi ile yaptıkları araştırmada 35 akciğerden (% 71) ve 22 eklemde (% 45) *M. bovis* antijeni tespit etmişlerdir. Aynı araştırmada *M. bovis* 19 (% 39) vakada BVDV, 5 (% 10) vakada *H. somni*, 10 (% 20) vakada *M. haemolytica*, 6 (% 12) vakada hem BVDV hem *M. haemolytica* antijeni ile birlikte bulunmuştur. Kuzey İrlanda'da 1995-1998 dönemini kapsayan bir çalışmada *M. bovis*-pozitif 287 hayvanda pnömoni olaylarından izole edilen diğer etkenler *M. haemolytica* (% 20,56), *A. pyogenes* (% 9,06) ve *P. multocida* (% 8,36) olarak bulunmuştur (19). İtalya'da yapılan bir başka çalışmada ise 70 buzağının % 17,14'ünde *M. bovis* tek başına izole edilirken % 5,7'sinde diğer etkenlerle birlikte (3 vakada *P. multocida*, 1 vakada *A. pyogenes*) izole edilmiştir (18). Ülkemizde ise Şahin (196) 109 pnömonili akciğerden 12 mycoplasma suşu (6 *M.*

bovis, 4 *M. bovirhinis*, 2 *M. arginini*) izole etmiş bunların 7'sinin *P. multocida*, *M. haemolytica* ve *Staphylococcus* sp. ile birlikte izole edildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *M. bovis* yönünden pozitif bulunan 38 vakadan 30'unda *M. bovis* izole edilen tek etken iken sekiz vakada ise *M. bovis*'in yanı sıra ; 2' sinde *P. multocida* , 2'sinde *M. haemolytica*, 1'inde *Streptococcus* spp., 1'inde *A. pyogenes*, 1 tanesinde *P. multocida* ve *A. pyogenes* birlikte, 1 tanesinde ise *P. multocida* ve *Streptococcus* sp. birlikte izole edildi. *M. bovis* izole edilen vakaların % 79'unda etkenin tek başına bulunması sığır pnömoni olgularında *M. bovis*'in en önemli patojenlerden biri olduğunu ve bakteriyolojik analizlerde *M. bovis*'in göz ardı edilmemesi gerektiğini göstermektedir. *M. bovis* izole edilen olguların sadece % 21'inde diğer bakteriyel etkenler ile koenfeksiyon saptanmıştır. *M. bovis* ile birlikte lezyonlardan en fazla izole edilen etken *P. multocida* (% 10.5) olmuştur. İncelendiğinde hem bizim çalışmamızda, hem de diğer çalışmalarda *M. bovis*'e bağlı pnömoni gelişen hayvanlarda izole edilen diğer etkenlerin benzer oldukları görülmektedir. Her mezbahanın farklı çalışma ortamlarının oluşu, zaman kısıtlaması ve kesim yapılan yer ile organların incelendiği yerlerin farklı olması gibi nedenlerden ötürü hayvanlardan kan alımı işlemi gerçekleştirilememiş bu yüzden sığırlarda pnömoniyeye yol açan viral etkenler yönünden serolojik inceleme yapılamamıştır.

Bu çalışmada Bursa ve çevresinde hizmet vermekte olan 5 ayrı mezbahada Ocak-Nisan 2008 tarihleri arasında kesilen, 1492 sığıra ait akciğerin makroskobik incelenmesi sonucu renk, kıvam ve kesit yüzünde gözlenen patolojik değişiklikler göz önünde bulundurularak pnömoni odağı olduğundan şüphe edilen 142 akciğer örneği ile Anabilim Dalı laboratuvarımıza teşhis amacıyla getirilen 10 akciğer örneği olmak üzere toplam 152 (% 10,18) pnömonili akciğer örneğinden 39 (% 25.65) *Mycoplasma* spp. izole edildi. *Mycoplasma* spp. olarak değerlendirilen 39 izolatin biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testleri ile yapılan identifikasyonlarında; 38'i (% 97.43) *M. bovis*, 1 tanesi *M. bovirhinis* (% 2.5) olarak tanımlandı. Bu veriler altında *M. bovis*'in pnömonili sığırlarda yaygınlık oranı 38/ 152 (% 25) olarak tespit edilmiştir. *M. bovis*'in sığır pnömonilerindeki yaygınlığına yönelik olarak çalışmamızda elde ettiğimiz oran, etkene yönelik olarak Avrupa ülkelerinde daha önce yapılmış olan çalışmalarla uyumludur. Avrupa'da pnömonili akciğerlerde *M. bovis*'in yaygınlığı konusunda bakteriyoloji ve PCR gibi etkeni direkt ortaya koymaya yönelik yapılan araştırmalarda Hollanda'da % 20 (5), Fransa'da % 30 (14), Macaristan'da % 11,8(15), İtalya'da % 25 (18), Kuzey ve Güney İrlanda'da %13-23 (19, 20), Bosna-Hersek'de % 12,5 (200) oranında bulunmuştur. Ülkemizde ise daha önce yapılan çalışmalarda pnömoni olgularında *M. bovis*'in

yaygınlığı; Trakya ve Marmara'da % 7,5 (24), Kars'ta % 4 (25), Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nde (27) yapılan çalışmada % 41.3, Doğu Anadolu'da % 50 (26) ve % 100 (198) olarak bildirilmiştir. Doğu Anadolu'da bildirilen yüksek oranlara karşılık çalışmamızda elde ettiğimiz % 25'lik oranın nedenleri arasında bu tez çalışmasında hayvanlara ait anamnez bilgilerinin bulunmayışı ve başta antibiyotik uygulanması gibi klinik girişimler konusunda bilginin olmamasının çalışmamızda elde edilen izolasyon oranlarını etkilemesi ve ayrıca Doğu Anadolu'daki çalışmalarda (26, 198) bu çalışmaya kıyasla çok az sayıda pnömomonili akciğer örneğinin değerlendirilmesi olabilir. Yukarıda bildirilen çalışmalardan en güncel olanları Pendik'te ve Doğu Anadolu'da yapılan çalışmalar ve bu çalışmada elde edilen sonuçlar *M. bovis*'in bölgemizde ve Türkiye'de en yaygın solunum sistemi patojenlerinden biri olduğunu ortaya koymaktadır. Yönetim koşulları bakımından pek çok eksiğin bulunduğu ülkemizde etkenin bu kadar yaygın olmasının sebepleri arasında yönetimsel hataların ve kötü bakım şartlarının göz ardı edilmemesi gereklidir.

Sonuç olarak bu çalışma ile *M. bovis*'in bölgemizdeki sığır pnömonilerinde yaygın (% 25) olarak bulunan bir etken olduğu ortaya konmuştur. *M. bovis* bu pnömonilerin önemli bir oranında tek başına izole edilirken 30/152 (% 19.7), bazı vakalarda 8/152 (% 5.2) *M. bovis* ile birlikte koenfekte olarak diğer bakteriyel etkenler de izole edilmiştir. Pnömoni olgularında *M. bovis*'in primer etken olarak değerlendirilebileceği ve rutin laboratuvar analizlerinde diğer bakteriyel etkenlerle birlikte *M. bovis*'in de varlığının araştırılması gerekliliği ortaya konmuştur. *M. bovis*'in teşhisinde Sandwich ELISA yönteminin yüksek spesifite (% 100) ve sensitiviteye (% 100) sahip olduğu ve rutin olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. *M. bovis*'in Türkiye çapında yaygınlığının ve dağılımının ortaya koyulması, izole edilen suşların moleküler olarak tiplendirilmesi ve *M. bovis* infeksiyonundan korunmada dünyada yaygın olarak kullanılan aşılama için yerel suşlardan aşı elde edilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU.
http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&ust_id=13 (Giriş tarihi: 6 Ocak 2011).
2. VIRTALA AMK, MECHOR GD, GROHN YT, ERB HN, DUBOVI EJ.
Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in diary heifers during the first three months of life. Journal of the American Veterinary Medical Association 208(12): 2035, 1996.
3. REEVE-JOHNSON L. The impact of Mycoplasma infections in respiratory disease in cattle in Europe. Editörler: STIPKOVITS L, ROSENGARTEN R, FREY J. Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, volume 3, Brussels: European Commission, page 18-31, 1999.
4. TER LAAK EA, NOORDERGRAAF JH, BOOMSLUITER E. The nazal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. Journal of Veterinary Medicine Series B, 39:610-616, 1992.
5. TER LAAK EA, NOORDERGRAAF JH, DIELTJES RP. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves. Journal of Veterinary Medicine Series B, 39: 553-562, 1992.
6. NICHOLAS R. Bovine Respiratory Disease. In: Mycoplasma Disease of Ruminants: Disease, Diagnosis and Control, CABI publishing ,Wallingford, Oxon, GBR; 132-168, 2008.
7. PFÜTZNER H, SACHSE K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. Revue Scientifique et Technique, 15: 1477-1494, 1996.
8. WALKER RL. Mollicutes, Editorler: HIRSH DC, ZEE YC. Veterinary microbiology, third edition, Blackwell Publishing, Iowa, page 165-172, 1999.
9. GOURLAY RN, THOMAS LH, WYLD SG. Increased severity of calf pneumonia associated with the apperance of *Mycoplasma bovis* in rearing herd. Veterinary Record, 124(16): 420-2, 1989.

10. AYLING RD, BASHIRUDDIN SE, NICHOLAS RAJ. *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990-2000. *Veterinary Record*, 155: 413-416, 2004.
11. CASWELL CL, ARCHAMBAULT M. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Animal Health Research Review*, 8: 161-186, 2008.
12. NICHOLAS RA, AYLING RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, 74: 105-112, 2003.
13. ROSENGARTEN R, CITTI C. The role of ruminant *Mycoplasmas* in systemic infection. Editorler: STIPKOVITS L, ROSENGARTEN R, FREY J. *Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, volume 3, Brussels: European Commission, pages 14-17, 1999.
14. GRAND DL, CALAVAS, BRANK M, CITTI C, ROSENGARTEN R, BEZILLE P, POUMARAT F. Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France. *Veterinary Record*, 150: 268-273, 2002.
15. TENK M, STIPKOVITS L, HUFNAGEL L. Examination of the role of *Mycoplasma bovis* in bovine pneumonia and a mathematical model for its evaluation. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52: 445-456, 2004.
16. GHADERSOHI A, FAYAZI Z, HIRST RG. Development of a monoclonal blocking ELISA for the detection of antibody to *Mycoplasma bovis* in dairy cattle and comparison to detection by PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104: 183–193, 2005.
17. NICHOLAS RAJ, WOOD E, BAKER S, AYLING RD. *Mycoplasmas* isolated from ruminants in Britain 1995–2000. Editorler: Poveda, JB, FERNANDEZ A, FREY J, JOHANSSON KE. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 5. European Commission, Brussels, 116–120, 2001.
18. RADAELLI E, LUINI M, LORIA GR, NICHOLAS RAJ, SCANZIANI E. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Research in Veterinary Science*, 85: 282-290, 2008.

19. BRICE N, FINLAY D, BRYSON DG, HENDERSON J, McCONNELL W, BALL HJ. Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland, 1995 to 1998. *Veterinary Record*, 146(22): 643-644, 2000.
20. BYRNE WJ, McCORMACK R, BRICE N, EGAN J, MARKEY B, BALL HJ. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical samples in the Republic of Ireland. *Veterinary Record*, 148(11): 331-333, 2001.
21. BLACKBURN P, BROOKS C, McCONNELL W, BALL HJ. Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland from 1999 to 2005. *Veterinary Record*, 161: 452-453, 2007.
22. DİNLER U, SAĞLAM YS. Pneumoni'li sığır akciğerlerinde *Mycoplasma* spp. ve *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, identifikasyonu ve patolojik araştırmalar. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 14: 133-145, 1998.
23. ÜLGEN M, ÖZBİLGİN S, KAHRAMAN MM, ÖZMEN Ö. Bursa Yenişehir'de danalarda görülen bulaşıcı pneumoni salgını üzerinde bakteriyolojik ve patolojik incelemeler. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 8(3): 134-140,1996.
24. ERDAĞ O, ERDOĞAN İ, TÜRKASLAN J, GÜREL A. Buzağı ve dana pneumonilerinde *Mycoplasma* ve bakteriyel etkenlerin izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılıkları. *Animal Informasyon*, 112: 115-119, 1995.
25. ÖZEN H, KARAMAN M, ŞAHİN M, ÖZCAN K. PCR detection of *M. bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* and *M. mycoides* subsp. *mycoides* (small colony type) and investigations of pathological findings in pneumonic cattle. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15: 125-133, 2009.
26. ÇETİNKAYA B. KARAHAN M., KALIN R., ATIL E. Türkiye'nin doğusundaki ruminant mikoplazmalarının biyoçeşitliliği: Aşı ve kontrol stratejileri için uygulamalar. IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi(Uluslar arası katılımlı), Kongre özet kitabı, sayfa 4-7, 2010.
27. ÖZDEMİR Ü, TÜRKYILMAZ MA. Buzağılarda önemli pnömoni etkenlerinden *Mycoplasma bovis*'in izolasyonu ve identifikasyonu, VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Van, sayfa 82, 2008.
28. İZGÜR M. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acheloplasma*, *Spiroplasma* ve *erysipelothrix* infeksiyonları. Editorler: AYDIN N, PARACIKOĞLU J. *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar) İlke-Emek Yayınları ANKARA*, sayfa 293-304, 2006.

29. HALE HH, HELMBOLDT CF, PLASTRIDGE WN, STULA EF. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Veterinarian*, 52: 582-591, 1962.
30. ASKAA G, ERNO H. Elevation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to species rank *Mycoplasma bovis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26:323-325,1976.
31. GOURLAY RN, THOMAS LH, HOWARD CJ. Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. *Veterinary Record*, 98: 506-507, 1976.
32. GARRITY GM, BELL JA, LILBURN TG. Taxonomic outline of the Prokaryotes, *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, second edition, DOI 10.1007/bergeysoutline, 166, release 5 May 2004.
33. QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJC, LEONARD FC. *Mycoplasmas*, Editorler: QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJC, LEONARD FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Blackwell Publishing, Iowa, page 189-195, 2002.
34. MATTSSON JG, GUSS B, JOHANSSON KE. The phylogeny of *Mycoplasma bovis* as determined by sequence analysis of the 16S rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters*, 115: 325-328, 1994.
35. TOLA S, IDINI G, ROCCHIGIANI AM, MANUNTA D, ANGIOI PP, ROCCA S, COCCO M, LEORI G. Comparison of restriction pattern polymorphism of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by pulsed field gel electrophoresis. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 46: 199-206, 1999.
36. SONGER JG, POST KW. The genera *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: *Veterinary Microbiology, Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*, 1st edition, Saunders, chapter 39: 305-317, 2004.
37. QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR. *Clinical Veterinary Microbiology* 4th Edition, Mosby International Limited, London, page 320-326, 2000.
38. ROSENDAL S, VALDIVIESO-GARCIA A. Enumeration of mycoplasmas after acridine orange staining. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 1000–1002, 1981.

39. JASPER DE, ROSENDAL S, BARNUM DA. Acridine orange staining for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cow milk. *Journal of Clinical Microbiology* 20: 624–625, 1984.
40. HERMANN R. Genome structure and organization. Editör: MANILOFF J. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society of Microbiology, Washington DC, page 157-168, 1992.
41. MILES RJ, WADHER BJ, HENDERSON CL, MOHAN K. Increased yields of *Mycoplasma* spp. in the presence of pyruvate. *Letters in Applied Microbiology*, 7: 149-151, 1988.
42. NAGATOMO H, TAKEGAHARA Y, SONODA T, YAMAGUCHI A, UEMURA R, HAGIWARA S, SUEYOSHI M. Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. *Veterinary Microbiology*, 82: 223–232, 2001.
43. BUTLER JA, SICKLES SA, JOHANNS CJ, ROSENBUSCH RF. Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feed calves: thermal effects on various mycoplasma. *Journal of Dairy Science*, 83: 2285–2288, 2000.
44. MCAULIFFE L, ELLIS RJ, MILES K, AYLING RD, NICHOLAS RAJ. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology (Reading)*, 152: 913–922, 2006.
45. PFÜTZNER H, SCHERWA B, TRUBNER S. Sensitivity of *Mycoplasma bovis* to disinfection agents applied to the udder area. *Archiv für Experimentelle Veterinarmedizin*, 37: 485-489, 1983.
46. LYSNYANSKY I, RON Y, YOGEV D. Juxtaposition of an active promoter to vsp genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in *Mycoplasma bovis*. *Journal of Bacteriology*, 183(19): 5698-708, 2001.
47. SACHSE K, HELBIG JH, LYSNYANSKY I, GRAJETZKI C, MULLER W, JACOBS E, YOGEV D. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infection and Immunity*, 68:680-687, 2000.
48. MCAULIFFE L, KOKOTOVIC B, AYLING RD, NICHOLAS RA. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom

- shows two genetically distinct clusters. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4556–4565, 2004.
49. THOMAS A, LEPRINCE P, DIZIER I, BALL H, GEVAERT K, DAMME JV, MAINIL J, LINDEN A. Identification by two dimensional electrophoresis of a new adhesin expressed by a low-passaged strain of *Mycoplasma bovis*. *Research in Microbiology*, 156: 713–718, 2005.
 50. POUMARAT F, LE GRAND D, SOLSONA M, ROSENGARTEN R, CITTI C. Vsp antigens and vsp-related DNA sequences in field isolates of *Mycoplasma bovis*. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 103–110, 1999.
 51. NUSSBAUM S, LYSNYANSKY I, SACHSE K, LEVISOHN S, YOGEV D. Extended repertoire of genes encoding variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* strains, *Infection and Immunity*, 70(4): 2220–2225, 2002.
 52. LYSNYANSKY I, ROSENGARTEN R, YOGEV D. Phenotypic switching of variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* involves high-frequency chromosomal rearrangements. *Journal of Bacteriology*, 178: 5395–5401, 1996.
 53. LYSNYANSKY I, RON Y, SACHSE K, YOGEV D. Intrachromosomal recombination within the vsp locus of *Mycoplasma bovis* generates a chimeric variable surface lipoprotein antigen. *Infection and Immunity*, 69: 3703– 3712, 2001.
 54. FLITMAN-TENE R, MUDAHI-ORENSTEIN S, LEVISOHN S, YOGEV D. Variable lipoprotein genes of *Mycoplasma agalactiae* are activated in vivo by promoter addition via sitespecific DNA inversions. *Infection and Immunity* 71: 3821– 3830, 2003.
 55. LE GRAND D, SOLSONA M, ROSENGARTEN R, POUMARAT F. Adaptive surface antigen variation in *Mycoplasma bovis* to the host immune response. *FEMS Microbiology Letters*, 144: 267–275, 1996.
 56. THOMAS A, SACHSE K, FARNIR F, DIZIER I, MAINIL J, LINDEN A. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 34:141–148, 2003.
 57. VANDEN BUSH TJ, ROSENBUSCH RF. Characterization of a lympho-inhibitory peptide produced by *Mycoplasma bovis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315: 336–34, 2004.

58. BEHRENS A, POUMARAT F, GRAND DL, HELLER M, ROSENGARTEN R. A newly identified immunodominant membrane protein (pMB67) involved in *Mycoplasma bovis* surface antigenic variation. *Microbiology (Reading)* 142: 2463–2470, 1996.
59. SACHSE K, GRAJETZKI C, ROSENGARTEN R, HANEL I, HELLER M, PFÜTZNER H. Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 284: 80-92, 1996.
60. GEARY SJ, TOURTELLOTTE ME, CAMERON JA. Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*: isolation and characterization. *Science*, 212: 1032-1033, 1981.
61. BROOKS BW, LUTZE-WALLACE CL, LU P, ROBERTSON RH. Identification and serological specificity of a polysaccharide component from *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Research Communications*, 28: 197–208, 2004.
62. KHAN LA, MILES RJ, NICHOLAS RAJ. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of in vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H₂O₂. *Veterinary Research Communications*, 29: 181–188, 2005.
63. SCHERM B, GERLACH GF, RUNGE M. Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigations concerning their role in immunity and infection. *Veterinary Microbiology*, 89: 141–150, 2002.
64. BENNETT RH, JASPER DE. Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals. *Cornell Veterinarian*, 67: 361–373, 1977.
65. PFÜTZNER H, SCHIMMEL D. *Mycoplasma bovis* isolation in the offspring of cows with *M. bovis* mastitis and its epizootiological significance. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 32: 265-279, 1985.
66. PFÜTZNER H, KIELSTEIN P, MARTIN J, SCHIMMEL D. Mycoplasma infection of calves. 2. Experimental infection of calves with *Mycoplasma bovis*. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*, 37: 445-451, 1983.
67. STIPKOVITS L, RIPLEY P, VARGA J, PALFI V. Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection, *Acta Veterinaria Hungarica*, 48: 387-395, 2000.

68. ROMVARY J, ROZSA J, STIPKOVITS L, MESZAROS J. Incidence of diseases due to *Mycoplasma bovis* in a cattle herd. I. Pneumo-arthritis syndrome in calves. *Acta Veterinaria Hungarica*, 27: 29-37, 1977.
69. THOMAS CB, WILLEBERG P, JASPER DE. Case-control study of bovine mycoplasmal mastitis in California. *American Journal of Veterinary Research*, 42: 511-515, 1981.
70. PFÜTZNER H. Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie Supplement*, 20: 394–399, 1990.
71. STIPKOVITS L, GLAVITS R, RIPLEY P, MOLNAR T, TENK M, SZEREDI L. Pathological and immunohistochemical studies of pneumonia in calves experimentally induced by *Mycoplasma bovis*. Edtörler: BERGONIER D, BERTHELOT X, FREY J. *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*. Brussels: European Commission, page 27–30, 2000.
72. ADEGBOYE DS, HALBUR PG, NUTSCH RG, KADLEC RG, ROSENBUSCH RF. *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and arthritis complicated with pyogranulomatous tenosynovitis in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209: 647–649, 1996.
73. BOOTHBY JT, JASPER DE, ZINKL JG, THOMAS CB, DELLINGER JD. Prevalence of mycoplasmas and immune responses to *Mycoplasma bovis* in feedlot calves. *American Journal of Veterinary Research*, 44: 831–838, 1983.
74. ALLEN JW, VIEL L, BATEMAN KG, ROSENDAL S. Changes in the bacterial flora of the upper and lower respiratory tracts and bronchoalveolar lavage differential cell counts in feedlot calves treated for respiratory disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56: 177–183, 1992.
75. ROSENBUSCH R. *Mycoplasma*: What we know about mastitis and systemic Disease, Proceedings of the Minnesota Dairy Health Conference College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, 2003.
76. KREUSEL S, BOCKLISCH H, PFÜTZNER H, BRYNS A, LEIRER R, ZIEGENHALS U. Experimental infections of bulls with *Mycoplasma (M.) bovis* and *M. bovis genitalium*. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*, 43: 705-712, 1989.

77. EAGLESOME MD, GARCIA MM. The effect of *Mycoplasma bovis* on fertilization processes in vitro with bull spermatozoa and zona-free hamster oocytes. *Veterinary Microbiology*, 21: 329-337, 1990.
78. RICHTER A, PFÜTZNER H. Detection of mycoplasmas in experimentally-infected bull sperm. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*, 43: 721-724, 1989.
79. HORVATH GY, STIPKOVITS L, VARGA ZS, ZOLDAG L, MESZAROS J. Infection of cows by *Mycoplasma bovis*. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*, 37: 401-403, 1983.
80. DYER NW, KROGH DF, SCHAAN LP. Pulmonary Mycoplasmosis in Farmed White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 40(2):366-370, 2004.
81. BOCKLISCH H, KREUSEL S, BRYS A, PFÜTZNER H. Experimental infection of the udder of ewes due to *Mycoplasma bovis*. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 38: 385-390, 1991.
82. RODRIGUEZ F, SARRADELL J, POVEDA JB, BALL HJ, FERNÁNDEZ A. Immunohistochemical characterization of lung lesions induced experimentally by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in goats. *Journal of Comparative Pathology*, 123: 285-293, 2000.
83. EGWU GO, AMEH JA, ALIYU MM, MOHAMMED FD. Caprine Mycoplasmal mastitis in Nigeria. *Small Ruminant Research*, 39: 87-91, 2001.
84. MADOFF S, PIXLEY BQ, DELGIUDICE RA, MOELLERING RC Jr. Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 9: 709-711, 1979.
85. ONGOR H, KALIN R, KARAHAN M, CETINKAYA B, McAULIFFE L, NICHOLAS RAJ. Isolation of *Mycoplasma bovis* from broiler chickens in Turkey. *Avian Pathology*, 37(6): 587-588, 2008.
86. SACHSE K, PFÜTZNER H, HELLER M, HANEL I. Inhibition of *Mycoplasma bovis* cytoadherence by a monoclonal antibody and various carbohydrate substances. *Veterinary Microbiology*, 36: 307-316, 1993.

87. LOPEZ A, MAXIE MG, SAVAN M, RUHNKE HL, THOMSON RG, BARNUM DA, GEISSINGER HD. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with bovine virus diarrhoea or *Mycoplasma bovis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 46: 302–306, 1982.
88. THOMAS LH, HOWARD CJ, PARSONS KR, ANGER HS. Growth of *Mycoplasma bovis* in organ cultures of bovine foetal trachea and comparison with *Mycoplasma dispar*. *Veterinary Microbiology*, 13: 189–200, 1987.
89. THOMAS CB, VAN ESS P, WOLFGRAM LJ. Adherence to bovine neutrophils and suppression of neutrophil chemiluminescence by *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 27: 365–381, 1991.
90. HOWARD CJ. Comparison of bovine IgG1, IgG2 and IgM for ability to promote killing of *Mycoplasma bovis* by bovine alveolar macrophages and neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 6: 321–326, 1984.
91. HOWARD C J, TAYLOR G, COLLINS J, GOURLAY R N. Interaction of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma agalactiae subsp. bovis* with bovine alveolar macrophages and bovine lacteal polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*, 14: 11–17, 1976.
92. BRYSON DG, BALL HJ, BRICE N, FORSER F, POLLOCK DS. Pathology of induced *Mycoplasma bovis* calf pneumonia in experimentally vaccinated animals. Editörler: STIPKOVITS L, ROSENGARTEN R, FREY J. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. European Commission, Belgium, volume 3, page 128–132, 1999.
93. NAGATOMO H, SHIMIZU T, HIGASHIYAMA Y, YANO Y, KUROKI H, HAMANA K. Antibody response to *Mycoplasma bovis* of calves introduced in a farm contaminated with *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle 183 the organism. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58: 919–920, 1996.
94. TSCHOPP R, BONNEMAIN P, NICOLET J, BURNENS A. Epidemiological study of risk factors associated with *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 143: 461–467, 2001.
95. VANDEN BUSH TJ, ROSENBUSCH RF. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 94: 23–33, 2003

96. NICHOLAS RA, AYLING RD, STIPKOVITS LP. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine*, 20: 3569–3575, 2002.
97. HOWARD CJ, PARSONS KR, THOMAS LH. Systemic and local immune responses of gnotobiotic calves to respiratory infection with *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 11: 291–300, 1986.
98. BEHRENS A, HELLER M, KIRCHHOFF H, YOGEV D, ROSENGARTEN R. A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infection and Immunity*, 62: 5075–5084, 1994.
99. ROBINO P, ALBERTI A, PITTAU M, CHESSA B, MICILETTA M, NEBBIA P, GRAND DL, ROSATI S. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, 109: 201–209, 2005.
100. HOWARD CJ. Mycoplasmacidal action of bovine complement mediated by bovine IgG1, IgG2 or IgM. *Veterinary Microbiology*, 6: 317–330, 1981.
101. SHAHRIAR FM, CLARK EG, JANZEN E, WEST K, WOBESER G. Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Canadian Veterinary Journal*, 43: 863–868, 2002.
102. GAGEA MI, BATEMAN KG, SHANAHAN RA, VAN DREUMEL T, MCEWEN BJ, CARMAN S, ARCHAMBAULT M, CASWELL JL. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 29–40, 2006.
103. THOMAS LH, HOWARD CJ, STOTT EJ, PARSONS KA. *Mycoplasma bovis* infections in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. *Veterinary Pathology*, 23: 571–578, 1986.
104. STIPKOVITS L, RIPLEY PH, TENK M, GLAVITS R, MOLNAR T, FODOR L. The efficacy of valnemulin (Econor®) in the control of disease caused by experimental infection of calves with *Mycoplasma bovis*. *Research in Veterinary Science*, 78: 207–215, 2005.
105. JUNG TW, KRAMPE M, SILEGHEM M, GROIT C AND NICOLET J. Differential and strain-specific triggering of bovine alveolar macrophage effector functions by mycoplasmas. *Microbial Pathogenesis*, 21: 487–498, 1996.

106. FINCH JM, HOWARD CJ. Inhibitory effect of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma bovis* on bovine immune responses in vitro. Editörler: STANEK G, CASSELL GH, TULLY JG, WHITCOMB RF. Recent Advances in Mycoplasmaology. Stuttgart– New York: Gustav Fischer Verlag, pp. 563–569, 1990.
107. AL-HADDAWI M, MITCHELL GB, CLARK ME, WOOD RD, CASWELL JL. Impairment of innate immune responses of airway epithelium by infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116: 153– 162, 2007.
108. THOMAS CB, METTLER J, SHARP P, JENSEN-KOSTENBADER J, SCHULTZ RD. *Mycoplasma bovis* suppression of bovine *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle 185 lymphocyte response to phytohemagglutinin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 26: 143–155, 1990.
109. POUMARAT F, BELLI P, CALAVALAS D. Immunoprophylaxis of experimental *Mycoplasma bovis* arthritis in calves. International Symposium ‘Mycoplasmas of Ruminants’. COST Action 826, Toulouse, France June 2–4. 1999.
110. POLLOCK CM, CAMPBELL JR, JANZEN ED, WEST K, COLLEEN M, POLLOCK DVM. Epidemiological features of the ‘chronic pneumonia-polyarthritis syndrome’ of calves in a Western Canadian feedlot. In: Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge, Colorado, USA, 6–11 August 2000.
111. STALHEIM OH, STONE SS. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae subsp. bovis* from arthritic cattle in Iowa and Nebraska. *Journal of Clinical Microbiology*, 2(3):169–172,1975.
112. STIPKOVITS L, RADY M, GLAVITS R. Mycoplasmal arthritis and meningitis in calves. *Acta Veterinaria Hungarica*, 41: 73–88, 1993.
113. MAEDA T, SHIBAHARA T, KIMURA K, WADA Y, SATO K, IMADA Y, ISHIKAWA Y, KADOTA K. *Mycoplasma bovis* associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *Journal of Comparative Pathology*, 129: 100–110, 2003.

114. WALZ PH, MULLANEY TP, RENDER JA, WALKER RD, MOSSER T, BAKER JC. Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9: 250–254, 1997.
115. AL-ABDULLAH , FADL EA. *Mycoplasma mastitis* in diary herds in Saudi Arabia. *Veterinary Record*, 159: 88-89, 2006.
116. HOULIHAN, MG, VEENSTRA B, CHRISTIAN MK, NICHOLAS R, AYLING R. Mastitis and arthritis in two diary herds caused by *M. bovis*. *Veterinary Record*, 160(4): 126-127, 2007.
117. LEVISOHN S, GARAZI S, GERCHMAN I, BRENNER J. Diagnosis of a mixed mycoplasma infection associated with a severe outbreak of bovine pinkeye in young calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16: 579–581, 2004.
118. ALBERTI A, ADDIS MF, CHESSA B, CUBEDDU T, PROFITI M, ROSATI S, RUIU A, PITTAU M. Molecular and antigenic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 41–51, 2006.
119. LAFAUNCE NA, MCENTEE K. Experimental *Mycoplasma bovis* seminal vesiculitis in the bull. *Cornell Veterinarian*, 72: 150–167, 1982.
120. ROSENDAL S, MARTÍN SW. The association between serological evidence of mycoplasma infection and respiratory disease in feedlot calves. *Canadian Journal of Veterinary Resesarch*, 50: 179–183, 1986.
121. THOMAS A, BALL H, DIZIER I, TROLIN A, BELL C, MAINIL J, LINDEN A. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tractof healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *The Veterinary Record*, 151: 472–476, 2002.
122. NICHOLAS RAJ, HANNAM DAR, BAKER SE, WEAVER CR, TERLAAK EA. *Mycoplasma canis* in a British calf. *Veterinary Record*, 137(17): 443-444, 1995.
123. RODRIGUEZ F, BRYSON DG, BALL HJ, FORSTER F. Pathological and immunohistochemical studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. *Journal of Comparative Pathology*, 115: 151-162, 1996.

124. ADEGBOYE DS, HALLBUR PG, CAVANAUGH DL, WERDIN RE, CHASE CC, MISKIMINS DW, ROSENBUSCH RF. Immunohistochemical and pathological study of *Mycoplasma bovis* associated lung abscesses in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 333–337, 1995.
125. RODRIGUEZ F, KENNEDY S, BRYSON TDG, FERNANDEZ A, RODRIGUEZ JL, BALL HJ. An immunohistochemical method of detecting *Mycoplasma* species antigens by use of monoclonal antibodies on paraffin sections of pneumonic bovine and caprine lungs. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 43: 429–438, 1996.
126. MURRAY PR, BARON EJ. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C. American Society for Microbiology, page 2310, 2003.
127. THOMAS A, DIZIER I, TROLIN A, MAINIL J, LINDEN A. Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Veterinary Research Communications*, 26: 333–339, 2002.
128. ALLEN JW, VIEL L, BATEMAN KG, ROSENDAL S, SHEWEN PE, PHYSICK-SHEARD P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: association between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55: 341-346, 1991.
129. SCHREIBER P, THOMAS A, LINDEN A, MAINIL J, COLLARD A. Comparison of bacteria isolated from lower airway fluids obtained by transtracheal route or bronchoalveolar route in calves. *Annales De Medecine Veterinaire*, 144 (3): 173-177, 2000.
130. WIGGINS MC, WOOLUMS AR, SANCHEZ S, HURLEY DJ, COLE DJ, ENSLEY DT, PENCE ME. Prevalence of *Mycoplasma bovis* in backgrounding and stocker cattle operations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230 (10):1514-1518, 2007.
131. GODINHO SK, SARASOLA P, RENOULT E, TILT N, KEANE S, WINDSOR GD, ROWAN TG, SUNDERLAND SJ. Use of deep nasopharyngeal swabs as a predictive diagnostic method for natural respiratory infections in calves. *Veterinary Record*, 160: 22-25, 2007.
132. ARCANGIOLI MA, DUET A, MEYER G, DENBURG A, BEZILLE P, POUMARAT F, LE GRAND D. The role of *Mycoplasma bovis* in bovine

- respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots, *The Veterinary Journal*, 177: 89-93, 2008.
133. GAGEA MI, BATEMAN KG, VAN DREUMEL T, MCEWEN BJ, CARMAN S, ARCHAMBAULT M, SHANAHAN RA, CASWELL JL. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 18–28, 2006.
134. NICHOLAS R, BAKER S. Recovery of Mycoplasmas from Animals. Editorler: MILES, RJ, NICHOLAS RA. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 104: *Mycoplasma Protocols*, Humana press Inc., Totowa, NJ. pp. 37-44. 1998.
135. NICHOLAS R. Isolation and Growth of mycoplasmas from ruminants. In *Mycoplasma Diseases of Ruminants: Disease, Diagnosis and control*, Wallingfor, Oxon, GBR; CABI publishing, 3, 2008.
136. FRANCOZ D, FORTIN M, FECTEAU G, MESSIER S. Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Veterinary Microbiology*, 105:57-64, 2004.
137. WAITES KB. Mycoplasma and ureaplasma. Editörler: MURRAY PR, BARON EJ. *Manual of Clinical Microbiology: Mycoplasmas and Obligate Intracellular Bacteria*. Washington, D.C, American Society of Microbiology, 1004–1020, 2007.
138. SHIMIZU, T. Selective medium for the isolation of *Mycoplasma bovis* from nasal discharges of pneumonic calves. *Research in Veterinary Science*, 34: 71-373, 1983.
139. WINDSOR GD, BASHIRUDDIN JB. Coloured colonies of Mycoplasmas Frequently Isolated from Ruminants on Solid Agar Medium. In: COST action 826 “Ruminant Mycoplasmoses”, Tolouse, France, 1999.
140. TULLY JG. Cloning and filtration techniques for mycoplasmas. Editörler: TULLY JG, RAZIN S. *Methods in Mycoplasmology*. *Mycoplasma Characterization*. Vol. I. New York: Academic Press, pp. 173–177, 1983.
141. POVEDA JB. Biochemical Charactristics in Mycoplasma Identification. editörler: MILES, RJ, NICHOLAS RA. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 104: *Mycoplasma Protocols*, Humana press Inc., Totowa, NJ. pp. 69-78. 1998.
142. POVEDA J B, NICHOLAS RA. Serological Identification of Mycoplasmas by Growth and Metabolism Inhibition Tests. editörler: MILES, RJ, NICHOLAS RA.

- Methods in Molecular Biology. Vol. 104: Mycoplasma Protocols,. Humana press Inc, Totowa, NJ. pp. 105-112. 1998.
143. THOMAS A, DIZIER I, LINDEN A, MAINIL J, FREY J, VILEI EM. Conservation of the *uvrC* gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis. Veterinary Journal, 168: 100–102, 2004.
144. BASHIRUDDIN JB, FREY J, KONIGSSON MH, JOHANSSON KE, HOTZEL H, DILLER R, SANTIS PD, BOTELHO A, AYLING RD, NICHOLAS RAJ, THIAUCOURT F, SACHSE K. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. Veterinary Journal, 169: 268–275, 2005.
145. BALL HJ, FINDLAY D. Diagnostic applications of monoclonal antibody-based sandwich ELISAs. Editörler: MILES, RJ, NICHOLAS RA. Methods in Molecular Biology. Vol. 104: Mycoplasma Protocols, Humana press Inc., Totowa, NJ. page 127-132. 1998.
146. HELLER M, BERTHOLD E, PFUTZNER H, LEIRER R, SACHSE K. Antigen capture ELISA using a monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. Veterinary Microbiology, 37: 127–133, 1993.
147. TENK M, BALL H, STIPKOVITS L. Capture ELISA test and a selective-differentiating medium for the detection of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. Annual meeting of the Hungarian Society for Microbiology. Proceedings. Balatonfüred, october, 2002.
148. BIO-X PULMOTEST *Mycoplasma bovis*, test prosedürü, Bio-X diagnostics- Site du Complexe des Postes- 49, rue J Wauters- 5580- Jemelle –Belgium, <http://www.biox.com/Default.aspx?tabid=64&udtid=179> (giriş tarihi: 14.01.2011).
149. ASSUNCAO P, ROSALES RS, RIFATBEGOVIC M, ANTUNES NT, DE LA FE C, RUIZ DE GALARRETA CM, POVEDA JB. Quantification of mycoplasmas in broth medium with sybr green-I and flow cytometry. Frontiers in Bioscience, 11: 492–497, 2006.
150. FLORES-GUTIERREZ GH, INFANTE F, SALINAS-MELENDZ JA, THOMAS CB, ESTRADA-BELLMANN PC, BRIONES-ENCINIA F. Development of an immunobinding assay with monoclonal antibodies to diagnose

- Mycoplasma bovis* in semen. Veterinary Research Communications, 28: 681–686, 2004.
151. INFANTE F, INFANTE JR F, FLORES-GUTIÉRREZ GH. Improved immunobinding test using monoclonal antibodies for detection of *Mycoplasma bovis* in milk. Canadian Journal of Veterinary Research, 66: 282–284, 2002.
152. INFANTE MARTINEZ F, JASPER DE, STOTT JL, CULLOR JS, DELLINGER JD. Immunobinding assay for detection of *Mycoplasma bovis* in milk. Canadian Journal of Veterinary Research, 54: 251–255, 1990.
153. NIELSEN KH, STEWART RB, GARCIA MM, EAGLESOME MD. Enzyme immunoassay for detection of *Mycoplasma bovis* antigens in bull semen and preputial washings. Veterinary Record, 120: 596–598, 1987.
154. BOOTHBY JT, MUELLER R, JASPER DE, THOMAS CB. Detecting *Mycoplasma bovis* in milk by enzyme-linked immunosorbent assay, using monoclonal antibodies. American Journal of Veterinary Research, 47: 1082–1084, 1986.
155. UHAA IJ, RIEMANN H P, THURMOND M C, FRANTI CE. The use of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in serological diagnosis of *Mycoplasma bovis* in dairy cattle. Veterinary Research Communications, 14: 279-285, 1990.
156. AYLING RD, NICHOLAS RJ, JOHANSSON KE. Application of the polymerase chain reaction for the routine identification of *Mycoplasma bovis*. Veterinary Record, 141: 307–308, 1997.
157. BYRNE WJ, BALL HJ, BRICE N, MCCORMACK R, BAKER SE, AYLING RD, NICHOLAS RA. Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. Veterinary Record, 146: 368-369, 2000.
158. BEIER T, HOTZEL H, LYSNYANSKY I, GRAJETZKI C, HELLER M, RABELING B, YOGEV D, SACHSE, K. Intraspecies polymorphism of *vsp* genes and expression profiles of variable surface protein antigens (Vsps) in field isolates of *Mycoplasma bovis*. Veterinary Microbiology, 63: 189- 203, 1998.

159. PINNOW CC, BUTLER JA, SACHSE K, HOTZEL H, TIMMS LL, ROSENBUSCH RF. Detection of *Mycoplasma bovis* in preservative-treated field milk samples. *Journal of Dairy Science*, 84: 1640–1645, 2001.
160. CAI H, BELL-ROGERS P, PARKER L, PRESCOTT J. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17: 537–545, 2005.
161. CHAVEZ GONZALEZ, YR, ROS BC, BOLSKE G, MATTSSON JG, FERNANDEZ MC, JOHANSSON KE. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Veterinary Microbiology*, 47:183-190, 1995.
162. VASCONCELLOS CARDOSO M, BLANCHARD A, FERRIS S, VERLENGIA R, TIMENETSKY J, FLORIO DA CUNHA RA. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Veterinary Microbiology*, 72:241-250, 2000.
163. HIROSE K, KAWASAKI Y, KOTANI K, TANAKA A, ABIKO K, OGAWA H. Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63: 691-693, 2001.
164. FREY J, SUBRAMANIAM S, BERGONIER D, NICOLET J. DNA repair genes *uvrC* as genetic targets for discrimination of closely related mycoplasmas. Editörler: STIPKOVITS L, ROSENGARTEN R, FREY J. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 3. European Commission, Brussels, page 40–43, 1999.
165. HOTZEL H, SACHSE K, PFUTZNER H. Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 505–510, 1996.
166. SUBRAMANIAM S, BERGONIER D, POUMARAT F, CAPAUL S, SCHLATTER Y, NICOLET J, FREY J. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 12: 161–169, 1998.
167. MARENDA MS, SAGNE E, POUMARAT F, CITTI C. Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*

- genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiology (Reading)* 151: 475–489, 2005.
168. FODDAI A, IDINI G, FUSCO M, ROSA N, DE LA FE C, ZINELLU S, CORONA L, TOLA S. Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 207–212, 2005.
169. GHADERSOHI A, COELEN RJ, HIRST RG. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, 56: 87–98, 1997.
170. HAYMAN B, HIRST RG. Development of a semi-nested PCR for the improved detection of *Mycoplasma bovis* from bovine milk and mucosal samples. *Veterinary Microbiology*, 91: 91–100, 2003.
171. TENK M, BALINT A, STIPKOVITS L, BIRO J, DENCSE L. Detection of *Mycoplasma bovis* with an improved PCR assay. *Acta Veterinaria Hungarica*, 54: 427–435, 2006.
172. SACHSE K, GRAJETZKI C, PFUTZNER H, HASS R. Comparison of *Mycoplasma bovis* strains based on SDS PAGE and immunoblot protein patterns. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 39: 246–252, 1992.
173. LORIA GR, CASCONI G, CATANIA S, SPARACINO L, LUINI M, SCANZIANI E, CHURCHWARD C, AYLING R, NICHOLAS RAJ. Molecular Epidemiology and Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma bovis* infections in Italy. *Large Animal Review*, 13(5): 195-199, 2007.
174. HIRSH DC. *Mycoplasmas*. Editörler: PRESCOTT JF, BAGGOT JD, WALKER RD. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Iowa State University Press, Ames, page 466–468, 2000.
175. POUMARAT F, GRAND DL, PHILIPPE S, CALAVAS D, SCHELCHER F, CABANIE P, TESSIER P, NAVETAT H. Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. *Veterinary Microbiology*, 80: 23–35, 2001.
176. BELLI P, POUMARAT F, PERRIN M, MARTEL JL. Evaluation of the in vivo activity of enrofloxacin in experimental *Mycoplasma bovis* infection of calves. *Medicina Veterinaria*, 10: 85–88, 90–91, 1993.

177. HENDERSON JP, BALL HJ. Polyarthritis due to *Mycoplasma bovis* infection in adult dairy cattle in Northern Ireland. *Veterinary Record* 145: 374–376, 1999.
178. GODINHO KS, RAE A, WINDSOR GD, TILT N, ROWAN TG, SUNDERLAND SJ. Efficacy of tulathromycin in the treatment of bovine respiratory disease associated with induced *Mycoplasma bovis* infections in young dairy calves. *Veterinary Therapeutics*, 6: 96–112, 2005.
179. STIPKOVITS L, RIPLEY PH, VARGA J, PALFI V. Use of valnemulin in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions. *Veterinary Record* 148: 399–402, 2001.
180. HANNAN PCT. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Veterinary Research*, 31: 373–395, 2000.
181. HIROSE K, KOBAYASHI H, ITO N, KAWASAKI Y, ZAKO M, KOTANI K, OGAWA H, SATO H. Isolation of mycoplasmas from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 50: 347–351, 2003.
182. TER LAEK EA, NOORDERGRAAF JH, VERSCHURE MH. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27:317–321, 1993.
183. THOMAS A, NICOLAS C, DIZIER I, MAINIL J, LINDEN A. Antibiotic Susceptibilities of Recent Isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium. *Veterinary Record*, 153: 428-431, 2003.
184. AYLING RD, BAKER SE, PEEK ML, SIMON AJ, NICHOLAS RA. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Record*, 146: 745–747, 2000
185. ROSENBUSCH RF, KINYON JM, APLEY M, FUNK ND, SMITH S, HOFFMAN LJ. in vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various of the United States from 2002 to 2003. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17: 436-441, 2005.

186. BALL HJ, REILLY GAC, BRYSON DG. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* strains isolated in Northern Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 48: 316–318, 1995.
187. WAITES KB, CRABB DM, DUFFY LB, CASSELL GH. Evaluation of the E test for detection of tetracycline resistance in *Mycoplasma hominis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 27: 117-122, 1997.
188. ROSENBUSCH RF. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* strains recovered from mycoplasmal pneumonia and arthritis in feedlot cattle, Beef Research Report-Iowa State University, 1998.
189. VOGEL GJ, LAUDERT SB, ZIMMERMAN A, GUTHRIE CA, MECHOR GD, MOORE GM. Effects of tilmicosin on acute undifferentiated respiratory tract disease in newly arrived feedlot cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 212: 1919-1924, 1998.
190. DUFF GC, GALYEAN ML. Board-invited review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *Journal of American Science*, 85; 823-840, 2007.
191. THOMSON DU, WHITE BJ. Backgrounding beef cattle. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 22: 373–398, 2006.
192. URBANECK D, LIEBIG F, FORBRIG T, STACHE B. Experiences with the use of herd-specific vaccines against respiratory infections with *Mycoplasma bovis* in a large cattle herd. *Der Praktische Tierarzt*, 81: 756–763, 2000.
193. BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, Inc. http://www.bivetmedica.com/product_sites/PulmoGuardMpB/reference.html (Giriş tarihi: 3 ocak 2011).
194. MUNSELL FP, DONOVAN GA, RISCO C, BROWN MB. Field Evaluation of A *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine*, 27: 2781-2788, 2009.
195. DİKER KS. Seroloji. Editör: DİKER KS. *İmmunoloji*, İkinci baskı. Medisan, ANKARA, sayfa 287-299, 2005.
196. AJUWAPE ATP, IKHELOALJO, OJO MO, ALAKA OO, ADETOSOYE AI. biochemical and serological identification of *Mycoplasmas* isolated from pneumonic bovine lungs in Nigeria. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 58:2-3, 2003.

197. ŞAHİN M. Kars yöresinde sığır pnömonilerinden Mikoplazmaların izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji dergisi, 9: 2, 1997.
198. KARAHAN M, KALİN R, ATİL E, ÇETİNKAYA B. Detection of *Mycoplasma bovis* in cattle with mastitis and respiratory problems in Eastern Turkey. Veterinary Record, 166: 827-829, 2010
199. CURRIN JF, CURRIN N, WHITTIER DW. Mycoplasma in Beef Cattle, Virginia Cooperative extension Publication, page 300-304, 2007.
200. RIFATBEGOVIC M, ASSUNCAO P, POVEDA JB, PASIC S. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina, Veterinary Record, 160: 484-485, 2007.
201. KUSILUKA LJ, OJENIYI B, FRIIS NF. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. Acta Veterinaria Scandinavica, 41: 139–146, 2000.
202. VOGEL G, NICOLET J, MARTIG J, TSCHUDI P AND MEYLAN M. Bacterial flora isolated from the lungs of calves with pneumonia and their resistance patterns to antimicrobial drugs. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde, 143: 341–350, 2001.
203. LUINI M, GUALDI V, MAIETTI L, VEZZOLI F, MALFA C, RADAELLI E, SORIOLO A, ALBERTON A, FIN M, RODEGHIERO M. *Mycoplasma bovis* in fattening cattle with respiratory disease. Large Animal Review, 12(6):11-15, 2006.
204. KNUDTSON WU, REED DE, DANIELS G. Identification of Mycoplasmatales in pneumonic calf lungs. Veterinary Microbiology, 11: 79-91, 1986.
205. BALL H J, FINLAY D, REILLY GA. Sandwich ELISA detection of *Mycoplasma bovis* in pneumonic calf lungs and nasal swabs. Veterinary Record, 135: 531-532, 1994.
206. HAINES DM, MARTIN KM, CLARK EG, JIM GK, JANZEN ED. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. Canadian Veterinary Journal, 42: 857-860, 2001.

TEŞEKKÜR

Doktora çalıőmam boyunca benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam sayın Prof.Dr. Mihriban ÜLGEN olmak üzere Anabilim Dalımızın değerli Öğretim Üyeleri Prof.Dr. K. Tayfun ÇARLI, Prof.Dr. Ayőin ŐEN, Prof.Dr. Cengiz ÇETİN'e, çalışma arkadaşlarım Uzman Dr. Esra BÜYÜKCANGAZ, Araő.Gör.Dr. Serpil KAHYA ve Dokt.Öęr. Hüban GÖÇMEN'e sonsuz sevgi, saygı ve teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalıőmam boyunca yardımlarını gördüğüm Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Mycoplasma bölümüne ve sayın Dr. Ümit ÖZDEMİR'e, laboratuvar aőamasında büyük destek gördüğüm Laborant Ayőe UYAR'a, numune alma aőamasında beraber çalıőtığımız sayın Yard. Doç. Dr. Rahőan YILMAZ'a, sonsuz destek ve sabırlarından ötürü eőime, doktora eğitimime baőlamamda en büyük destekçilerim olan anneme ve babama, son olarak en büyük moral kaynağım biricik oğlum Kartal Bora'ya teőekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

10.01.1980 tarihinde Bandırma'da dünyaya geldim. İlk ve orta öğrenimimi Bandırma'da tamamladım. 1999 yılında Uludağ üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım. X. Yarıyılıda Veteriner Hekimliği Özel Eğitim-Öğretimini Kanatlı Hayvan Hekimliği ve Yetiştiriciliği grubunda tamamladım. 2004 yılında Veteriner Fakültesi'nden Mezun oldum. 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım, aynı yıl Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevime devam etmekteyim. Yabancı dilim İngilizce'dir. Evli ve bir çocuk babasıyım.