



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

**MARMARA BÖLGESİNDE KOYUN VE KEÇİLERDE *Mycoplasma agalactiae*'nin
BAKTERİYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI**

Hüban GÖÇMEN

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2014



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

MARMARA BÖLGESİNDE KOYUN VE KEÇİLERDE *Mycoplasma agalactiae*'nin
BAKTERİYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

Hüban GÖÇMEN

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN

Bursa-2014

Bu tez, Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2011/57 numaralı proje ile desteklenmiştir.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Araş.Gör.Hüban GÖÇMEN tarafından hazırlanan 'Marmara Bölgesinde Koyun ve Keçilerde *Mycoplasma agalactiae*'nin Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması' konulu Doktora tezi 17/07/2014 günü, 13.30-15.30 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN	
Üye	Prof. Dr. K. Tayfun ÇARLI	
Üye	Prof. Dr. Sezgin ŞENTÜRK	
Üye	Prof. Dr. Ayşin ŞEN	
Üye	Doç. Dr. Funda BAĞCIGİL	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Metin PETEK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	IV
İNGİLİZCE ÖZET	V
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ ve YÖNTEM	28
GEREÇ	28
Klinik Örnekler	28
Standart Suş	29
Mycoplasma besiyerlerinde kullanılan stoklar	29
Antiserumlar	30
Besiyerleri	31
DNA Ekstraksiyon Kiti	34
PCR Miksi ve Reagentleri	35
Primerler	36
Gradient Thermal Cyclers PCR Cihazı	37
Agaroz Jelin Hazırlanmasında Kullanılan Maddeler	37
Horizontal Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı	38
Jel Görüntüleme ve Dökümantasyon Sistemi	39
Diğer Gereçler	40
YÖNTEM	42
Bakteriyolojik İnceleme	42

İzolasyon Çalışmaları	42
Numunelerin Ekimi	42
Pasajlama	43
Kolonilerin Klonlanması	43
İdentifikasyon Çalışmaları	43
Digitonin Sensitivitesi	44
Üre Hidrolizi	44
Glikoz Fermentasyonu	44
Arjinin Hidrolizi	44
Fosfataz Aktivitesi	45
Tetrazolium Redüksiyonu	45
Film ve spot Oluşumu	45
Üreme İnhibisyon Testi	45
Moleküler Çalışmalar	46
DNA Ekstraksiyonu	46
Roche High Pure PCR Template Preparation Kiti ile Direkt Klinik Örneklerin DNA Ekstraksiyon Metodu	46
PCR Parametreleri	47
<i>polC</i> –PCR protokolü	48
<i>uvrC</i> –PCR protokolü	49
Agaroz Jel Hazırlanması ve Dökülmesi	50
Amplifikasyonu yapılan DNA'ların agaroz jele yüklenmesi	50
Amplifikasyonu yapılan DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi	51
BULGULAR	52

Klinik Bulgular	52
İzolasyon Çalışmaları	53
İdentifikasyon Çalışmaları	55
Digitonin Sensitivitesi	55
Üre Hidrolizi	56
Glikoz Fermentasyonu	56
Arjinin Hidrolizi	56
Fosfataz Aktivitesi	56
Tetrazolium Redüksiyonu	57
Film ve spot Oluşumu	57
Üreme İnhibisyon Testi	57
PCR Sonuçları	58
TARTIŞMA ve SONUÇ	61
KAYNAKLAR	67
TEŞEKKÜR	76
ÖZGEÇMİŞ	77

ÖZET

Bu tez çalışmasında, Marmara Bölgesi illerine ait koyun ve keçilerde Bulaşıcı Agalaksi hastalığının başlıca etkeni olan *Mycoplasma agalactiae* (Ma)'nın varlığının bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile teşhis edilmesi amaçlandı.

Çalışmada; Bursa, Balıkesir, Çanakkale ve Edirne illerindeki koyun ve keçilerden 162 adet süt örneği, 147 adet göz svabı, 15 adet eklem sıvısı, 11 adet burun svabı ve 4 adet akciğer dokusu olmak üzere toplam 339 örnek bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile incelendi. Toplanan 339 örneğin 190'ı keçi, 57'si koyun, 19'u oğlak, 6'sı teke, 27'si kuzu ve 6'sı koça ait numunelerdir. Bakteriyolojik incelemede uygulanan biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testleri sonucunda, *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirilen 29 (%8.5) izolatın 25'i *Mycoplasma agalactiae* (%86.20) olarak tanımlanmıştır. Sadece biyokimyasal test sonuçlarına göre 2 izolat *Mycoplasma ovipneumoniae* (%6.89) ve 2 izolat *Mycoplasma arginini* (%6.89) olarak tanımlanmıştır.

Moleküler teşhiste, 234 örneğe uygulanan PCR protokolleri ile *Mycoplasma agalactiae* *uvrC* geni PCR sonuçlarında %9.4 oranında *Mycoplasma agalactiae* pozitif tespit edilirken, *polC* geni ile yapılan PCR sonucunda %13.24 oranında *Mycoplasma agalactiae* pozitif bulundu. Uygulanan *uvrC*-PCR sonuçlarına göre, süt örneklerinin %15.74 oranı ile, eklem sıvı örneklerinin %6.66 oranı ile ve akciğer örneklerinin %25 oranı ile pozitif bulundu. *PolC* -PCR sonuçlarına göre, süt örneklerinin %22.04 oranı ile, eklem sıvı örneklerinin %6.66 oranı ile, göz svabı örneklerinin %1.20 oranı ile ve akciğer örneklerinin %25 oranı ile pozitif bulundu. PCR sonuçları ile bakteriyolojik incelemeler karşılaştırıldığında %10.68 oranında *M.agalactiae* tanımlanmıştır. Aynı zamanda 7 keçi sütünde ve 2 göz svabında bakteriyolojik incelemeler ve/veya *uvrC*- PCR sonucunda *Mycoplasma agalactiae* negatif iken, *polC* -PCR sonucunda bu örnekler pozitif bulundu. PCR sonuçlarına göre, *Mycoplasma agalactiae*'nin %13.24 oranı ile *polC*-PCR metodu uygulayarak en fazla deteksiyon oranı sağlandı.

Sonuç olarak, Marmara bölgesinde Bulaşıcı Agalaksi hastalığının varlığı bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile araştırıldı ve hastalığa neden olan başlıca etkenin *M.agalactiae* olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Koyun, Keçi, *Mycoplasma agalactiae*, mastitis, bakteriyoloji, PCR

SUMMARY

INVESTIGATION OF *Mycoplasma agalactiae* BY BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS IN SHEEP AND GOATS IN THE MARMARA REGION

The aim of this study was diagnosis of main agent '*Mycoplasma agalactiae* (Ma)' of Contagious Agalactia by bacteriological and molecular methods from sheep and goats in Marmara Region.

A total of 339 samples from 162 milk samples, 147 eye swabs, 15 joint fluids, 11 nasal swabs and 4 lung tissue samples was examined by culture and molecular methods for sheep and goats in Bursa, Balıkesir, Çanakkale and Edirne provinces. The 339 samples were collected from 190 adult female goats, 57 ewes, 19 young female goats, 6 male goats, 27 lambs and 6 rams. Among 29 (8.5%) *Mycoplasma* sp. isolates; 25 (86.20%) were identified as *Mycoplasma agalactiae*, 2 (6.89%) as *Mycoplasma ovipneumoniae* and 2 (6.89%) as *Mycoplasma arginini*.

In molecular diagnosis, the 234 samples were analysed using PCR protocols which *uvrC* gene PCR results could be detected *Mycoplasma agalactiae* positive with 9.4 % rate. On the other hand, *polC* gene-PCR detected 13.24% rate. The samples were analysed by *uvrC*-PCR and detected *Mycoplasma agalactiae* positive with 15.74% rate of milk samples, 6.66% rate of joint fluids and 25% rate of lung tissue samples in goats. The result of *polC*-PCR detected *Mycoplasma agalactiae* positive with 22.04% rate of milk samples, 6.66% rate of joint fluids, 1.20% rate of eye swabs and 25% rate of lung tissue samples in goats. When compared between bacteriological examination and PCR, *M. agalactiae* was detected by 10.68% rate.

As a result of this, 7 milk samples and 2 eye swabs were detected positive by *polC*-PCR while negative by bacteriological examination and *uvrC* –PCR. As a result of this *polC*-PCR protocol was to high rate (13.24%) of detection of *Mycoplasma agalactiae* when it was compared to *uvrC*-PCR protocol.

In conclusion, presence of Contagious Agalactia in Marmara region was investigated by bacteriological and molecular methods and *Mycoplasma agalactiae* was diagnosed as primary cause of Contagious Agalactia.

Key words: Goat, Sheep, *Mycoplasma agalactiae*, mastitis, bacteriology, PCR

GİRİŞ

Ülkemizde koyun ve keçi yetiştiriciliğinde son 20 yılda keçi varlığı %52 oranında azalmıştır. 2012 yılında Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre toplam keçi varlığımız 8 357 289 baş olup, sağılan toplam keçi sayısı 2 968 157 baştır. Elde edilen süt miktarı 369 429 ton (%2.12) ve elde edilen et miktarı ise 26 318 ton olarak gerçekleşmiştir. Tarımsal işletmelerde üretilen sütün %3,3'ü ve üretilen kırmızı etin % 4,6'sı keçilerden elde edilmektedir. Toplam koyun sayısı ise 27 425 233 baş ve elde edilen yıllık süt miktarı 1 007 007 ton (%5.7) olarak gerçekleşmiştir (1).

Koyun ve keçi sütünün inek sütünden farkları; sütün bileşiminde bulunan yağ ve proteinlerin daha kolay sindirilebilmesi, vitamin ve mineraller yönünden daha zengin olması ve alerjiye neden olan beta laktoglobulin maddesine sahip olmamasıdır. Türkiye'de toplam süt üretiminde, besinsel değerleri fazla olan koyun ve keçi sütünün artışına ihtiyaç duyulduğu ve ülkemizdeki talebin çok altında üretimin var olduğu bildirilmektedir. Bunun nedenleri arasında sosyo-ekonomik şartlardan kaynaklı hayvancılık üretimindeki kayıplar, beslenme ve bakım şartlarının yeterli olmaması ve özellikle çiftçilerin veya bakıcıların bakım ve hastalıklarla ilgili olarak bilgilendirme eksiklikleri sayılabilmektedir.

Bulaşıcı Agalaksi hastalığı halk arasında 'süt kesen hastalığı' olarak bilinmektedir. Koyun ve keçilerde mastitis, süt kesilmesi, keratokonjunktivitis, artrit gibi tipik semptomlarla ve abort, genital lezyonlar, solunum sistemi sıkıntıları gibi atipik semptomlarla da karşımıza çıkabilmektedir. Hastalığın başlıca etkeni *Mycoplasma agalactiae* (Ma) olmakla birlikte *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) ve *Mycoplasma putrefaciens* (Mp) türleri de hastalığa neden olmaktadır. Bulaşıcı Agalaksi hastalığı, Dünya Hayvan Sağlık Örgütü'nün (OIE) bildirilmesi zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır (2). Koyun ve keçi sürülerine bulaşma; infekte hayvan alımları, kontamine bakıcı elleri, sağım makinaları, diğer sürüler ile etkileşim halinde bulunmaları ve bu etkenlerin kulak yolunda taşınması ile olmaktadır (3). İnfekte hayvanlardan toplanan süt örnekleri, göz, kulak ve burun svapları ve eklem sıvısı örnekleri; bakteriyolojik, serolojik ve moleküler teşhisler ile incelenerek hastalığa neden olan etkenler ortaya konulmalıdır. Türkiye'de Bulaşıcı Agalaksi hastalığının varlığı ile ilgili çok az çalışma mevcuttur. Türkiye'de 1968 yılında yapılan ilk çalışmada; Watson ve arkadaşları(4) , 22 adet sürüden izole ettikleri 246 mikoplazma türünü N, A ve C tipleri olarak isimlendirmişlerdir. A tipinin klasik Bulaşıcı Agalaksi etkeni olduğunu, N tipinin apatojen ve C tipinde keçilerde patojen olduğunu

bildirmişlerdir (5). Aynı yılda Beşe ve Arda (6) , Ankara bölgesindeki koyunlardan topladıkları süt, konjunktiva sıvısı, burun akıntısı ve eklem sıvısı numunelerinden ilk kez *M.agalactiae* izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yürütülen iki çalışmada *M.agalactiae* dışındaki diğer etkenlerinde hastalık vakalarından izole edildiği bildirilmiştir. Özdemir ve Türkaslan (7) yaptıkları çalışmada, Bulaşıcı Agalaksi hastalığı ile şüpheli 22 adet koyun ve keçi sürüsünden toplam 144 örnek almış ve 68 örnekte mikoplazma etkenlerini bakteriyolojik yöntemlerle izole etmişlerdir. İzole edilen türlerin 53 (% 78)'ü *M.agalactiae* (Ma), 6 (%9)'sı *M. mycoides capri* (Mmc), 5 (%7)'i *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc) ve 4 (%6)'ü *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (Mmm LC) olarak tanımlanmıştır. Koyunlardan izole edilen türlerin hepsi Ma, keçilerden izole edilen türler Ma, Mmc, Mcc ve Mmm LC olarak tanımlanmıştır. Koyunlarda Ma izolasyon oranı % 100 olurken keçilerde Ma %60, Mmc %16, Mcc % 13 ve MmmLC %11 oranında bulunmuştur ve coğrafik olarak, Marmara bölgesinde hastalığın Ege ve Akdeniz bölgelerine göre daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir.

Türkiye'de en güncel koyun ve keçi mikoplazmaları üzerine araştırmaları Çetinkaya ve arkadaşları (8) öncelikle Keçilerin Bulaşıcı Plöropnömonisi hastalığının etkeni olan *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* 'nin Türkiye'deki yaygınlığı üzerine yapmıştır. Aynı araştırmacılar daha sonra mikoplazma aşısı stratejileri geliştirmek amacıyla Bulaşıcı Agalaksi hastalık etkenlerinin Doğu Anadolu Bölgesinde ki illerde yaygınlığını araştırmışlardır. Süt örneklerinin bakteriyolojik ve Ma spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile incelenmesi neticesinde %81.7'sinde *M. agalactiae* saptamışlardır. 71 süt örneğinin 58'ini *M.agalactiae* - PCR pozitif olarak bulmuşlardır. Bu oran, Bulaşıcı Agalaksi hastalığının Doğu Anadolu Bölgesi'nde diğer bölgelere göre daha endemik olduğunu göstermektedir. Hastalığın yaygınlığı, koyun ve keçi sürülerinin entansif ve ekstansif yetiştiriciliğe göre değişmekte ve önemli rol oynamaktadır.

Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan *Mycoplasma agalactiae* etkeninin bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerle izolasyon ve tanımlanması zaman alıcı prosedürler olması nedeniyle daha hızlı teşhis ve tanımlanması için moleküler metotlara başvurulmaktadır. *M.agalactiae*'nin moleküler teşhisinde kullanılan farklı hedef gen bölgelerini baz alan spesifik primerler ile standart PCR metotları uygulanmıştır (9-11). Tola ve arkadaşları (12) *Mycoplasma agalactiae* etkeninin standart PCR teşhisinde kullanılmak üzere koyun sütünden basit ve hızlı DNA ekstraksiyonu geliştirmiş ve ilk kez direkt süt örneğinden; PCR, Southern Blot Hibridizasyon metotları ve bakteriyoloji metotlarını kullanarak sonuçları karşılaştırmışlardır. Yeni enfekte olmuş 21 sürüden 357

örnek ve geçmişte enfekte olmuş 8 sürüden 87 örneği PCR ve bakteriyolojik yöntemler ile incelemiştir. *M.agalactiae*-PCR metodu ile test edilen örneklerin 175'i pozitif ve bakteriyolojik incelemeler sonucunda ise test edilen örneklerin 153'ünden *M.agalactiae* identifiye etmişlerdir. *M.bovis* ve *M.agalactiae* suşlarının %99 nükleotid benzerliği nedeniyle *M.bovis* ve *M.agalactiae* tip suşlarından *uvrC* geni klonlanarak PCR primer çiftleri tasarlanmıştır. *UvrC* geninin 1.6 kb'lık fragmentinden amplifiye edilen bu primerler ile PCR ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) analizlerini uygulanmıştır (9). Farklı bölge ve ülkelerden topladıkları 41 adet *M.agalactiae* ve *M.bovis* 'e ait tip suşları, Fenol-Kloroform yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve bu suşlara farklı PCR sistemleri uygulanmıştır. *UvrC* geni primerleri ile farklı laboratuvarlarda uygulanan PCR sonuçlarına göre *M.agalactiae* suşlarının %100 identifikasyonu doğrulanmıştır (10). Bununla birlikte Marende ve arkadaşları (11) , *polC* geninden amplifiye edilen primerler ile uygulanan PCR'ın *uvrC* geni ile yapılan PCR' a göre farklı avantaj ve sonuçlarını elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışma ile *uvrC*-PCR amplifikasyonunda annealing sıcaklıklarındaki farklılıkların yanında her iki metotta da *M.agalactiae* ve *M.bovis* suşları arasındaki filogenetik yakınlığa rağmen aynı duyarlılıkta deteksiyonlarını sağlayabilmişlerdir (11,13).

Bulaşıcı Agalaksi, Akdeniz ülkeleri, Asya ve Afrika'da endemik, Amerika'da sporadik olarak seyretmekte ülkemizde ise endemilerle kendini göstermektedir. Akdeniz ülkelerinde ve ülkemizde meydana gelen ekonomik kayıplar, özellikle süt üretiminde azalma ve yüksek morbidite ile kendini göstermektedir. Bu ekonomik kayıplar, hastalığın eradikasyonu için alınan yetersiz önlemler ve aşı stratejilerinin geliştirilmesi gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır.

Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2011/57 numaralı proje ile desteklenen tez çalışmasının amacı, Marmara Bölgesine ait koyun ve keçilerden toplanan göz ve burun svaplarından, süt, eklem sıvısı ve akciğer örneklerinden *M.agalactiae*'nin varlığını bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

Mikoplazma 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 Mikoplazma adı altında isimlendirilmesi uygun bulunmuştur (14).

Mycoplasma agalactiae, koyun ve keçilerde mastitis, artrit ve keratokonjunktivitis ile karakterize, yaklaşık iki yüz yıldır bilinen Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olmaktadır (2). Bu hastalığın ilk olarak 1816’ da Metaxa tarafından tanımlandığı ve 1871 yılında da Brusasco tarafından “Bulaşıcı Agalaksi” olarak isimlendirildiği belirtilmiştir (15). İlk olarak İtalya’da ‘şehir hastalığı’ anlamına gelen ‘mal di sito’ ismiyle tanımlanmıştır (16). Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü’nün (OIE) bildirilmesi zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır (2). Bulaşıcı Agalaksi dünyada yaygın olarak bulunmakta ve birçok ülkeden bildirilmektedir. Fransa, Portekiz, İspanya, Yunanistan ve İtalya, Makedonya, Bulgaristan, Arnavutluk, Türkiye, İsrail, Ürdün, Hindistan, Güney Amerika, Kuzey Afrika, Macaristan, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi ülkelere yıllık olarak hastalık bildirimleri yapılmaktadır. Sadece Okyanusya kıtası ve Çekoslovakya’ nın hastalıktan ari olduğu, Akdeniz ülkeleri, bazı Asya ve Afrika ülkelerinde endemik, Amerika’ da sporadik seyrettiği bildirilmektedir (15-18).

Bulaşıcı Agalaksi’nin ‘klasik’ etiyolojik etkeni, *Mycoplasma agalactiae*’dır ve bilinen ikinci mikoplazma türü olarak 1923 yılında Bridre ve Donatien tarafından keçilerde izole edilmiştir (19, 20). 1931 yılında Wroblewski tarafından orijinal olarak *Anulomyces agalaxie* diye isimlendirilmiştir. Fakat 1957 yılında oluşturulan mikoplazma taksonomisine göre Freundt tarafından ismi *M.agalactiae* olarak değiştirilmiştir.

Hastalığın klasik etkeni olan *M.agalactiae* (Ma); özellikle keçilerde ve koyunlarda önemlidir (19). Bununla birlikte, ‘mycoides cluster’ grubundaki 2 mikoplazma türünde Bulaşıcı Agalaksi hastalığındaki benzer klinik ve patolojik tabloları meydana getirebilmektedir. Bu grup; *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) (Eski adı: *M.mycoides* subsp. *mycoides* LC) ve *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc)

türlerini içermektedir. Ayrıca *Mycoplasma putrefaciens* (Mp), keçilerde benzer klinik tablolarla hastalığa neden olmaktadır (16, 21-23).

Bergey's Manual'in 2011 baskısına göre Mikoplazma türleri, Mollicutes (mollis=yumuşak, cutis=deri) sınıfında, Mycoplasmatales dizisinde Mycoplasmataceae familyasındaki Mycoplasma cinsi içerisinde yer alırlar (24). Mikoplazmalar 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 biyosentetik özellikleri nedeni ile mikoplazmaların nutrisyonel gereksinimleri komplekstir, *invivo* ortamda konakçıya (ekzojen yağ asitleri, amino asitler, nükleik asit prekürsörleri, lipid prekürsor molekülleri ve vitaminler) bağlıdır. Egzojen yağ asitleri ve kolesterole gereksinim duyarlar. Kolesterole gereksinimi, Mycoplasmataceae familyasını benzer organizmalardan ayırır ve digitonine duyarlı hale getirdiği için identifikasyonlarında yararlıdır (25). Bergey's Manual'in 2011 baskısına göre Mycoplasma genusu, 120 den fazla tür içermektedir (26). Patojen mikoplazmaların konakçıları arasında insan, küçük ve büyük ruminant, domuz, kanatlı hayvanları, kedi ve köpekler, balıklar olduğu gibi Amerikan timsahları, California deniz aslanları ve kaplumbağalar da bulunmaktadır (27). Küçük ve büyük ruminantlarda 30' u aşkın mikoplazma türü izole edilmiştir (16). Koyun ve keçilerde önemli hastalıklar oluşturan mikoplazma türleri Tablo-1'de sunulmuştur.

Tablo - 1 Koyun ve Keçilerde Bulunan Patojenik Mikoplazmalar

Mikoplazma türü	Konakçı	Hastalık
<i>M.agalactiae</i>	Koyun/Keçi	Bulaşıcı Agalaksi
<i>M.c.capripneumoniae</i>	Keçi (Koyun)	Keçilerin Bulaşıcı Plöropnömonisi
<i>M.c.capricolum</i>	Keçi (Koyun)	Pnömoni, Bulaşıcı Agalaksi
<i>M.conjunctivae</i>	Koyun/Keçi	Keratokonjunktivitis
<i>M.m.capri</i>	Keçi (Koyun)	Pnömoni, Bulaşıcı Agalaksi
<i>M.ovipneumoniae</i>	Koyun/Keçi	Pnömoni
<i>M.putrefaciens</i>	Keçi (Koyun)	Mastitis, Artritis, Bulaşıcı Agalaksi, Abort

Mikoplazma cinsine dahil türler hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür (25, 28). Mikoplazmalar yapısal olarak basittir. Ribosomlar, DNA ve bunu saran steroller, fosfolipidler ve proteinlerden oluşan trilaminar sitoplasmik membrandan oluşur (25). Peptidoglikan polimerlerinden yoksun olmasından ötürü elektron mikroskopik incelemede 3 tabakalı şekilde görülen bu yapıya “ünit membran” denir (28). Ünit membranın bileşimindeki bu maddeler mikroorganizmanın antijenik yapısından sorumludur. Mikoplazmaların plasma membranına lokalize olan lipoglikanlar; Gram negatif bakterilerin dış membranda lokalize olan lipopolisakkarit yapıya (29) benzerliği ve işleyişleri, bu bakterilerin (30) Gram negatif olarak kabul edilmesine neden olmuştur. Ancak son yıllarda, mikoplazmalarda genom yapısı ve yapısal elementlerin azlığı nedeniyle Gram pozitif bakteri olarak kabul edilmiştir (31-33). Ayrıca peptidoglikan yapısına sahip olmaması sebebiyle beta laktam antibiyotikler gibi tüm “hücre duvar sentez inhibitörleri”ne ve sülfonomidlere doğal dirençlidir. Gram yöntemi ile boyanmazlar; Giemsa, Macchiavello veya Castaneda yöntemleri ile boyanarak mikroskopta incelenirler (28). Fimbria ve pilus yapıları yoktur. Tam aerob olan insan patojeni *Mycoplasma pneumoniae* dışında bir çoğu 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 şeklinde bulunabilirler. Diğer bakterilerden daha küçüktürler. Tüm mikoplazmalar bakteri geçirmeyen (0,45µm) filtrelerden geçebilirler (34). Kokoid formda olan mikoplazmalar diğer bakteriler gibi ortadan bölünerek ürerken, filamentöz olanlar içlerinde elementer cisimcikler oluşturarak ürerler, generasyon süresi 1 ile 6 saat arasında değişir. Mikoplazmalar fiziksel ve kimyasal etkilere duyarlıdır. 37°C’de 30–45 gün, -20°C’de 6–12 ay canlı kalabilirler. Liyofilize şekilde uzun süre saklanabilirler (3–9 yıl). Patojenik türler konakçı dışında, güneş ışığından yoksun olan ortamlarda birkaç gün canlı kalabilirler. Diğer bakterilerin aksine dondurulup çözdürülmeye dirençli, kuruluğa çok duyarlıdır (25, 28).

M.agalactiae etkeni, pleomorfik olup 124-250 nm boyutundadır ve %29,7 mol düşük G+C oranına sahiptir (16). Mikoplazmaların genom büyüklüğü 580-1380 kb arasında değişmekle beraber *M. agalactiae*’nın genomik büyüklüğü 877,438 bp olarak belirlenmiştir (35). Mikoplazmalar; plasma membranı, ribozomları, sirküler çift iplikçikli DNA molekülü ve tipik prokaryotik geni ile minimum organellerini oluşturmuştur.

Mikoplazma türlerini infekte eden fajlar araştırıldığında, *M.arthritis* suşunu infekte eden lizojenik fajı MAV1 tespit edilmiştir. Aynı zamanda mikoplazmalar arasında bilinen tek plazmid; *M. mycoides* subsp. *mycoides* pADP201 ve pKMK1 plazmidleridir (31).

Penisilin ve türevlerine dirençli fakat ozmotik basınca ve deterjanların etkisine karşı hassastır. Sterol eklenmiş özel sıvı ve katı besiyerlerinde iyi üreme göstermektedir. Üremeleri aerobik ortamlarla desteklenmektedir (36). Katı besiyerlerinde üremesi için %5-10 CO₂'li, nemli bir ortama ihtiyaç duymaktadır ve koloniler tipik sahanda yumurta görünümüne sahiptir. İlk izole edildiğinde suşlar yavaş üreme gösterir fakat laboratuvar ortamına adaptasyondan sonra, 37 °C'de sıvı ve katı besiyerlerinin çoğunda üretilmektedir (37-39). *M.agalactiae*, glukozu fermente edemez ayrıca arjinin ve üreyi hidrolize edemez. Nonfermentatif olan *M.agalactiae* ve *M.bovis* gibi mikoplazmalar, enerji kaynağı olarak glukoz yerine piruvatları kullanır (40). Gliserol oksidasyonu, lipid sentezinde rol oynayan glikofosfolipidlerin ve gliseridlerin sentezlenmesinde çok önemlidir.

M.agalactiae sıcaklık artışına duyarlıdır. 60 °C'de 5 dk.'da ve 100 °C'de 1 dk.'da inaktive olabilmektedir. 8 °C sıcaklığa 4 ay kadar ve oda sıcaklığında bir iki haftaya kadar dayanabilmektedir. -20 °C'de 8-9 ay virulent kalabilmektedir. Aynı zamanda ultraviyole ışınlar duyarlıdır. Bu organizmalar kokuşmuş ortamlarda hemen inaktive olmakta ve ölmektedir. Kloramin, potasyum hidroksit ve formalin gibi genel olarak kullanılan dezenfektan konsantrasyonlarında 15-20 dk. da yıkımlanmaktadır (21,41).

Mikoplazmaların çoğu tür-spesifik konakçı-etken ilişkisine sahiptir ya da bazı anatomik bölgelere tropizm gösterir (25). Konakçı hücrelere adhezyonu sağlayan ve antikorlardan kaçışta önemli rol oynayan değişken membran yüzey proteinleri, T hücre yanıtını ortaya çıkartan süperantijenler ve konakçı hücre membranına oksidatif zarar veren hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri mikoplazmaların virulens özelliklerini ortaya çıkartmaktadır (27, 31).

M.agalactiae 'nın virulens faktörleri; değişken membran yüzey lipoproteinleri (vpma), yüzey antijenik lipoproteinleri P48 (Makrofaj stimule protein), P30, P80, sitadhezin proteini P40 (Konakçı adhezyon antijeni) (42) ve biyofilm formasyonu (43), antimikrobiyal üretimi ve ortam adaptasyonunu sağlayan *Opp* genleridir (16). Vpmalar; sitadhezinlerle konakçı hücreye bağlanarak patogeneizde başlıca rol oynamaktadır. Çoğu mikoplazma patojenlerinde olduğu gibi *M.agalactiae*'nin yüzey proteinlerinin antijenik

varyasyonu; konakçılar arasında yayılmasına ve konakçılar içinde mücadele etmesine olanak sağlamaktadır.

M.agalactiae moleküler ağırlıkları 18 ile 80 kDa arasında olan 10'dan az membran proteinine sahiptir. Tola ve arkadaşları (44) bu proteinlerin 80 ve 50 kDa ağırlığındaki antijenlerini hücre yüzeylerine maruz bırakmış ve *M.agalactiae* etkenine karşı bir aşı üreterek fayda sağlamışlardır.

M.agalactiae'nin faz varyasyonları geçiren değişik membran yüzey proteinleri, poliklonal ve monoklonal antiserumlar kullanılarak karakterize edilmiştir. *Mycoplasma bovis* ile *M. agalactiae*'nin yakın filogenetik akrabalıkları nedeniyle *M.bovis*'te bulunan *vsp* ve *M.agalactiae*'da bulunan *vpma* genleri homolog sistemleri temsil etmektedir (45).

M.agalactiae, 'in vitro' biyofilm oluşturması nedeniyle ile kurumaya, ısıya ve komplement aracılı lizise karşı dirençlidir. Biyofilm oluşumu iki adımda gerçekleşmektedir. Başlangıçta, uygun bir maddeye bağlanması ve organizmanın burada birikerek yığılması ve yığılan bakterilerin bu topluluktan ayrılması ile meydana gelmektedir (27). Ayrıca biyofilmin başlıca komponenti, ekzopolisakkarit (EPS) ya da glikokaliks tabakadır. Bakteri hücrelerini kurumaya karşı korur, antibiyotiklerin penetrasyonunu geciktirir, konakçı hücre savunmasında rol oynar ve diğer yapısal ve fizyolojik rollere sahiptir. EPS, diğer bakterilerde 'slime' faktör olarak tanımlanmaktadır ve hücre yüzeyine bağlanmamaktadır (43).

Mikoplazmalar ile konakçı immün sistem arasındaki etkileşim, mikoplazma-uyarıcı spesifik ve nonspesifik immün reaksiyonları içermektedir. Spesifik koruyucu savunma mekanizması; farklı sınıf ve alt sınıflara ait lokal anti-mikoplazmal antikorların üretimi, hücresel immün yanıt stimülasyonu ve mikroorganizmanın fagositozis ile opsonizasyonunu içermektedir. Konakçıda meydana gelen spesifik reaksiyonlar; mikoplazma etkenlerine karşı korunmak ve direnç sağlamak amacıyla ortaya çıkmaktadır. Bu reaksiyonlar, lezyonların gelişmesinde ve hastalığın şiddetlenmesinde önemli bir role sahiptir. Buna ek olarak, anti-mikoplazmal immün yanıtın ortaya çıkmasında ise mikoplazmaların immün sistem hücreleri üzerine nonspesifik immunomodülatör etkilerini kullanması ile açıklanmaktadır. Mikoplazmalar, immün yanıtta B ve T lenfositleri baskılaması ya da poliklonal stimülasyon ile kendini göstermektedir. Sonucunda; sitokin sekresyonuna, makrofaj, NK ve T hücrelerinin sitotoksitesinde artışa, hücre reseptörlerinin ekspresyonunda artışa ve komplement aktivasyonuna sebep olmaktadır. Mikoplazmaların;

konakçı immun yanıtı üzerine immunmodülasyon etki göstermeleri, patojenik özelliklerine katkı sağlamaktadır. Bu etki ile konakçı savunma mekanizmasını baskılamakta ya da konakçı savunmasından kaçış yeteneğini sağlamaktadır. Bu nedenle kronik ve kalıcı enfeksiyonlar meydana gelebilmektedir (31).

Bulaşıcı Agalaksi ile enfekte hayvanlardan etken başlıca süt, göz- burun akıntısı, açılmış eklemlerin akıntıları ile saçılmakta ve ayrıca dışkı, idrar ve genital sistem akıntıları da etken kaynağı olabilmektedir. Etken, klinik belirtiler ortadan kalkana kadar sütle minimum 12 ay saçılmakta, hayvanların klinik olarak iyileşmesinden sonra da etken bir yıldan fazla vücutta kalabilmektedir. Sürülerde böyle asemptomatik taşıyıcıların bulunması ciddi bir risk olarak görülmektedir. Asemptomatik taşıyıcılarda etken, genellikle dişilerin ve erkeklerin genital yollarında ve çoğunlukla keçilerin ve az sıklıkla da koyunların dış kulak kanalında taşınmaktadır. Bu olağan dışı bölgelerde konakçı savunma mekanizması iyi çalışmadığı için etkene avantaj sağlamaktadır. Gerek enfekte gerekse taşıyıcı hayvanlardan duyarlı hayvanlara etken meme, konjunktiva, sindirim, solunum, genital ve deri gibi birçok yolla bulaşabilmektedir. Özellikle meme, sindirim ve solunum en önemli bulaşma yollarıdır.

Laktasyondaki dişilere etken, genellikle süt makinalarından, süt sağıcılarının ellerinden ya da altlıktan bulaşarak meme yoluyla girmektedir. Ağız yoluyla bulaşma ise oğlak ve kuzularda süt emme sırasında ve kontamine suların alınması ile meydana gelmektedir. İntensif yetiştiricilik yapılan işletmelerde solunum semptomları ile birlikte damlacık enfeksiyonu daha fazla önem kazanmaktadır. Taşıyıcı hayvanların duyarlı bir sürüye konulması ile hastalığın morbiditesi %30-60, mortalitesi ise özellikle kuzu ve oğlaklarda %40-70 olabilmektedir (3, 15, 16, 34).

Mikoplazmal hastalıkların iki tip patogenezi bulunmaktadır. Birincisi, kan yolu ile yayılarak invaziv enfeksiyonlarla sonuçlanması ve ikincisi başlıca lokalize olduğu bölgeden enfeksiyonun yayılmasıdır. Invaziv mikoplazmalar, epitelyal bariyere penetrasyon kabiliyetine sahiptir ve kan yoluna giriş yaparlar ve diğer faktörler ile enfeksiyonu şiddetlendirebilmektedirler. Etkenin girişinden sonra serozal boşluklarda ya da eklemlerde lokalize olur ve inflamasyona neden olur. Bu durum poliserozitis, tenosinovitis ya da artritis ile kendini göstermektedir. Daha generalize enfeksiyonlar ve akut septisemi meydana gelebilmektedir. Septisemik hastalıklar, akut ve ateşle seyrederek ve ölümcüldür.

Poliserozitis ve artritise yol açan infeksiyonlar, persiste ve kronik inflamasyona neden olmaktadır.

M.agalactiae; invaziv karakterde bir infeksiyona neden olarak başlıca şiddetli bir mastitisten sonra kan yoluyla yayılarak eklemlerde lokalize olabilmektedir (27).

Hastalığın inkübasyon periyodu bir iki haftaya kadar sürmekte ve klinik hastalık akut, subakut veya kronik formlarda görülmektedir. Klasik olarak Bulaşıcı Agalaksi özellikle laktasyondaki dişilerde meme, eklem ve göz semptomları ile karakterizedir. Bu üç semptom bir hayvanda aynı anda gözlenmemekle birlikte aynı sürüde farklı hayvanlarda da görülebilmektedir. Ayrıca bulaşıcı agalaksi patojenleri; respiratorik semptomlar gösteren hayvanların nekropsi materyalleri veya bronkoalveolar lavajlarından (46,47), asemptomatik olarak koç ve tekelerin sperma (48,49) ve prepusyal svaplarından (50) ayrıca dişilerde genital lezyonlardan ve abort materyallerinden (51) izole edilmiştir.

Mikoplazma mastitisleri memede hızlı gelişir ve memeden purulent akıntı gelmesiyle karakterizedir. Mastitis genellikle bilateral gelişir, memeler sıcak, şiş ve ağrılı, meme lenf yumruları hipertroftiktir (52). Sütün rengi sarımsı, sulu ya da kanlı olabilmekte, süt üretiminde düşüş ve bazen tam bir kesilme ve zamanla meme dokusunda fibrosis oluşumu gözlenmektedir. Arthritis özellikle gençlerde görülmekte, karpal, tarsal ve diz eklemleri etkilenmekte, poliarthritis de gelişebilmektedir, eklemler şiş ve synovial sıvı ile doludur. Topallık ve yürümede zorluk en belirgin semptomdur. Göz lezyonları konjunktivitisten paransimatöz keratitise kadar değişen formlarda bir ya da iki gözü etkileyebilmektedir. Genellikle geçici olan göz lezyonları bazen bir yada iki gözde körlüğe sebep olmaktadır (15,16). (Tablo-2)

Deneysel olarak *M.agalactiae* inokule edilen keçilerin meme dokusunda kronik *M.agalactiae* infeksiyonlarına yol açan kalıcı bakteriyel yanıtın neden olduğu immun reaksiyon kinetikleri incelenmiştir. Laktasyon döneminde bulunan 15 adet keçiye sağ meme lobu bezlerine 10^{10} cfu *M.agalactiae* inokule edilmiş 5, 15 ve 45. günlerde kanda *M.agalactiae* antikor titreleri, süttten izole edilen mikoplazma koloni sayısı ve somatik hücre sayıları izlenmiştir. Meme bezlerinde ve sütte kolonize olan *M.agalactiae* sayısı, 5 gün içinde 10^{12} cfu/ml artmıştır. Bu periyotta, doğal immun yanıtın içerdiği nötrofiller ve makrofajlar gözlenmiş ve *M.agalactiae* antijenleri asiner epitelyumda dejenerasyonlar meydana getirmiştir. Spesifik antikor yanıtı ile 7. günden sonra sütteki canlı mikoplazma sayısında azalma meydana gelmiştir. Inokulasyondan 37 gün sonra humoral immun yanıt

sınırlanmış ve tüm hayvanlarda anti-Ma antikörleri negatif olarak bulunmuştur ve yaklaşık 10^8 cfu/ml saçılım gerçekleşmiştir. Bunu takiben patolojik bulgularda 8. günde sağ lobda şiddetli şişme ve genişleme, 15. günde meme bezi yüzeyinin kesilmesi sonucunda meme kanallarında purulent eksudatlar ve 45. günde meme bezlerinin kesilmesiyle şiddetli intersitisyel fibrosis ve inflamasyon eksudatın bulunmaması dikkati çekmiş ve şiddetli atrofi meydana gelmiştir. *M.agalactiae* inokulasyonu ile erken fazda görülen immun yanıt, mikoplazmal invazyonun kontrolünü sağlayamamıştır. Humoral yanıtta ise mikoplazmalarda düşüş meydana getirirse de kronik, persiste infeksiyona yol açmıştır (53).

Deneyssel olarak yapılan diğer bir immunoinflamatör yanıtın immunohistokimyasal çalışmasında; meme dokusunda lizozim, myeloid-histiyoit antijeni (Mac387), MHC sınıf II antijeni, Ig G, Ig A ve CD3, CD4, CD8 lenfositleri tespit edilmiştir. İlk 5 günde, doğal immun yanıtta bol miktarda Mac387 ve lizozimler gözlenmiş ancak Ma infeksiyonunun kontrolünde ve engellenmesinde başarılı olamamıştır. 15. günde spesifik immun yanıtta ise bu immun yanıt hücrelerinin artışı yangı prosesinin subakut fazında gözlenmiştir. Ancak bu bulgular kandaki yoğun antikör yanıtı ile ilişkili bulunmamıştır. 45. günde ise kronik faza geçmiş ve CD4/CD8 oranında düşüş meydana gelmiştir (54).

Tablo - 2 Bulaşıcı Agalaksi Semptomları

Semptomlar	<i>M.agalactiae</i> (PG-2)*	<i>M.mycooides</i> subsp. <i>mycooides capri</i> (Y-goat)	<i>M.c.capricolum</i> (California kid)	<i>M.putrefaciens</i> (KS-1)
Laktasyondaki dişilerde gözlenen başlıca semptomlar	Memelerde, daha az eklem ve gözlerde	Memelerde, solunum sisteminde ve daha az gözlerde	Eklemlerde, solunum sistemi ve memelerde, daha az gözlerde	Memelerde, daha az eklemlerde
Laktasyondaki dişilerde gözlenen diğer semptomlar	Abort ve solunum sisteminde	Abort	Abort	Abort

Genç hayvanlarda gözlenen semptomlar	Solunum sistemi, eklem ve gözlerde, daha az sıklıkla septisemi	Eklem, solunum sistemi ve septisemi, daha az sıklıkla gözlerde ve sinir sisteminde	Eklem, gözlerde, solunum sisteminde ve septisemi, daha az sıklıkla sinir sisteminde	Artritis
Yetişkin hayvanlarda gözlenen semptomlar	Eklem, daha az sıklıkla gözlerde, nispeten solunum sistemi ve abort	Eklem ve solunum sistemi, daha az gözlerde ve abort	Eklem ve solunum sistemi, daha az gözlerde ve abort	Eklemlerde ve abort
Atipik formları	Genital ve özellikle solunum sistemi	Genital	Genital	

*Suş Tipi

Bu tablo Corrales ve arkadaşları (34) kaynağından.

Bulaşıcı Agalaksi hastalığında epidemiyolojik bulgular ve klinik belirtilerin varlığı teşhise yardımcı olmaktadır. Sürülerde, mastitis, keratokonjunktivitis ve eklem lezyonları gibi tipik üç klinik bulgu gözlemlendiğinde teşhis nispeten daha kolay olmaktadır. Bununla birlikte şayet hastalığın sadece bir formu bulunuyorsa klinik teşhis çok zor olabilmektedir. Klinik teşhis laboratuvar teşhis ile doğrulanmalıdır. Laboratuvara gönderilecek en iyi materyal süttür, sonra göz-burun svapları, eklem eksudatları vajinal svaplar, kulak svapları, kan ve idrardır (15). *Mycoplasma agalactiae* izolasyonu için, sıvı örnekler santrifüj edilmeli ve dipteki pellet inokulasyon için kullanılmalıdır. Özellikle süt numuneleri için santrifüj sonrasında krema katmanından ve pıhtılaşma söz konusu ise bir miktar pıhtıdan inokulasyon için kullanılmalıdır. Kontaminasyon şüphesi varsa örnekler 0.45 µm'lik filtreden geçirilmelidir. Ayrıca süt sıvısı gibi örneklerde bulunan antikor, antibiyotik, bakteri ve diğer inhibitörleri elimine etmek için buyyon içerisinde seri dilusyonlar yapılmalı ve her dilusyon subkültüre edilmelidir (56).

Mikoplazmaları laboratuvarında 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 maya ekstraktı 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 talyum asetat eklenmelidir.

Kültürde ise, mikoplazmaların gelişimini destekleyen sıvı ve katı besiyerlerine ekim yapılmaktadır. *M.agalactiae*, ‘film ve spot’ olarak adlandırılan test ile merkezi koloniler meydana getirmektedir. Mikoplazma identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler, zaman alıcıdır ve değerlendirilmesi zordur(37). *M.agalactiae* izolasyonunda; PPLO agarda (Eaton’s, Hayflick, N-agar) iyi üreyebilmekte (55) , saf kültür elde etmek için filtrasyon ya da seri dilüsyon yöntemi ile izolatlar en az 3 kere klonlanmalıdır (55, 47) . *M.agalactiae*, 4-5 günde orta-büyük koloniler oluşturur ve Hayflick, Eaton’s gibi özel besiyerlerinde film ve spot oluşturur (56). Mikoplazmalar genelde, pH 7-8 arasında optimal üreme gösterirler (58) ve tipik bir besiyerinin pH’ı 7.6’dır. Mikoplazmaların üremesinde meydana gelen herhangi bir pH değişimi mikoplazmaların üremesini durdurur. pH 6.5’den düşük olması ya da pH 8.0’in üstüne çıkması, şeker fermentasyonu nedeniyle bakteri üremeleri sınırlandırır ve hücre ölümü gerçekleşir. (56).

Bakterilerin L- formlarından ayırmak için; mikoplazma şüpheli koloniler, anti bakteriyel madde içermeyen besi yerlerine pasajlanırlar. L- formları bu ortamda normal koloni morfolojilerine dönerken mikoplazmalar tipik görünümünü muhafaza ederler. Ayrıca kolonileri Dienes boyası ile boyandığında dekolore olmaz iken, L-formu koloniler 15 dakika içinde dekolore olmaktadır. Mikoplazma kolonilerinin agara gömülü olarak üreyen merkezleri daha yoğun olarak koyu mavi boyanır, periferleri ise az yoğun olarak açık mavi boyanır (21, 22). Cansız ortamlar dışında mikoplazmaları embriyolu yumurta ve hücre kültürlerinde de üretmek mümkündür (56).

Mikoplazmalar cins düzeyinde Acholeplasma ve Ureaplasma’lardan digitonin duyarlılığı ve üreaz testleriyle ayrılırlar. İzole edilen Mikoplazma türlerinin identifikasyonunda glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi ve tetrazolium redüksiyonu gibi biyokimyasal testlerden yararlanılır. (16, 25, 28, 59, 60). *M.agalactiae*’nın C8-esteraz aktivitesini ortaya çıkartan hızlı ve kullanışlı bir biyokimyasal testte mevcuttur. Mikoplazma kolonileri, kromojenik substrat (SLPA-octanoate) eklenen agarda 1 saat içinde kırmızı koloniler meydana getirmektedir (61). *M.agalactiae* ve *M.bovis*’i ayırmada biyokimyasal testler yeterli olmamaktadır, her ikisi de glukozu fermente etmez, arjinin hidrolize etmezken, laktat ve piruvat gibi organik asitleri kullanarak, broth’da turbidite oluşturmadan turuncu renk oluşturur, etanolü oksidize eder, lipolitik aktivite sonucu besiyerinde film ve spot oluşturur. (10, 62). Bulaşıcı Agalaksi

hastalığına neden olan başlıca *Mycoplasma agalactiae* ve diğer patojenlerinin biyokimyasal özellikleri aşağıda sunulmuştur (37) (Tablo 3).

Tablo - 3 Bulaşıcı Agalaksi Patojenlerinin Biyokimyasal Özellikleri

Mikoplazma türleri	Glikoz/mannoz katabolizması	Arjinin hidrolizi	Fosfataz	Film ve spotlar	Tetrazolium indirgenmesi
<i>M.agalactiae</i>	-	-	+	d	+
<i>M.capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	+	d	+	-	+
<i>M.mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> <i>capri</i>	+	-	-	-	+
<i>M.putrefaciens</i>	+	-	+	+	+

d, suşun % 11-89' u pozitif
Bu tablo Corrales ve arkadaşları (34) kaynağından.

Türkiye'de 1968 yılında yapılan ilk çalışmalarda; Watson ve arkadaşları (4), 22 adet sürüden izole ettikleri 246 mikoplazma türünü N, A ve C tipleri olarak isimlendirmişler A tipinin klasik bulaşıcı agalaksi etkeni olduğunu N tipinin apatojen C tipinde keçilerde patojen olduğunu bildirmişlerdir (5). Aynı yılda Beşe ve Arda (6) , Ankara bölgesindeki koyunlardan topladıkları süt, konjunktiva sıvısı, burun akıntısı ve eklem sıvısı numunelerinden ilk kez *M.agalactiae* izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Tür spesifik identifikasyon için hiperimmün tavşan serumları kullanılarak üreme inhibisyon, film inhibisyon, peroksidaz ve metabolik inhibisyon testleri (63) *M.agalactiae* identifikasyonunda kullanılabilir (3, 37, 60, 64) . Bu teknikler relatif olarak yavaş olması ve antiserumların ticari olarak elde edilmesi ve laboratuvarda üretilme zorluğu yüzünden yoğun emek gerektirmektedir. Bu testlerin avantaj ve dezavantajları, Lambert tarafından tartışılmıştır (37). PG2 referans şusuna karşı hazırlanan poliklonal antiserum kullanılarak membran filtrasyon dot-immunobinding yöntemi de kullanılabilir (65, 66). MF Dot-ImmunoBinding metodu ile *M.agalactiae* ve *M.putrefaciens* etkenlerinin

serolojik identifikasyonu kolay olurken (67), *M.agalactiae* ve *M.bovis* gibi yakın olan türler arasındaki kros-reaksiyonlar nedeniyle zayıf reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, *M.mycooides* subsp. *mycooides* LC ve *M.capricolum* subsp. *capricolum* suşlarının ayırt edilmesinde bazı zorluklar yaşanmaktadır.

Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan patojenlere karşı birçok serolojik test geliştirilmiştir. Spesifik antikorlar geliştirilerek uygulanan İmmunofloresan testi (68) ya da İmmunohistokimyasal çalışmalarda monoklonal antikorlar kullanılarak meme dokusundan *M.agalactiae* tespiti mümkün olmuştur (69). İndirekt Hemaglütinasyon (70) ve Flow-Sitometri (71) testleri de *M.agalactiae* identifikasyonu için kullanılan yöntemler arasındadır. OIE (2)' ye göre başlıca kullanılan serolojik testler, Komplemant Fiksasyon (CF) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testleridir. Bu teknikler, serumdan antikor deteksiyonu ile hastalığın hızlı teşhisini sağlamaktadır. Ancak kronik olarak infekte olan sürülerde sensitivitesi düşüktür. Rutin olarak İndirekt ELISA, *M.agalactiae* yönünden taranan sürülerde kontrol programı olarak kullanılabilir.

CF testi, *M.agalactiae* için ilk 1970ler de çalışılmaya başlanmış fakat zayıf spesifiteli sitoplazmik antijenleri içeren antijenler kullanılması nedeniyle birçoğu yanlış pozitiflik ya da kros-reaksiyonlar meydana getirmiştir. Yanlış pozitiflik veren reaksiyonlar, Mmm LC ve Mcc arasındaki kros reaksiyonlara karşı başlıca *M.agalactiae*'da meydana gelmiştir. Antikorlar serumda; ilk semptomlar görüldükten ve yetişkin hayvanlara Ma inokulasyonundan 3-15 gün sonra tespit edilmiştir (64).

M .agalactiae etkenine karşı oluşan antikorların tespitinde, sonik ya da Tween 20 antijenleri kullanılan ELISA testlerinin sensitivitesi CF testine göre daha yüksektir (2). Sürü teşhisinde antijen ELISA (Sandwich ELISA) (72) testi ekonomik ve nispeten daha hızlı bir alternatiftir. Ancak mikoplazmalar arasında kros reaksiyonlar vermesi spesifitelerini sınırlamaktadır. Aynı zamanda antikor arayan ELISA testlerinde, antikor titreleri infeksiyonun başlangıcından 10-14 gün sonra ortaya çıkması nedeniyle mikoplazma teşhisi sınırlı olmaktadır ve sensitivitesi kronik olarak infekte olan taşıyıcıları tanımlama için yeterli olmamaktadır (73). Bu teknikler, hızlı teşhis yöntemleri olmasına rağmen spesifite problemlerine ve aşılı ya da aşısız antikorları ayıramamaları gibi problemlere sahiptir. *M.agalactiae* için kullanılan birçok ticari indirekt ELISA kitleri (Pourquier, Fransa) mevcuttur. Fransa'da ve İngiltere'de geniş çaplı analizler için bu kitler kullanılmıştır (2). Bulaşıcı Agalaksi hastalığından şüpheli koyun (74) ve keçilerde (75)

ticari ELISA kitleri kullanılmış ve böylelikle bölgesel suşlar arasında karşılaştırma yapılmıştır. İlk çalışmada, ELISA kiti yaklaşık %100 sensitivite gösterirken, ikinci çalışmada Ma (%99) ve Mmm (%100) suşlarına karşı antikolar yüksek serolojik sensitivite sağlamıştır. Spesifiteleri sırayla %80 ve %78 bulunmuştur. Ancak Assunção ve arkadaşları (75) sonuçların yüksek spesifiteli çıkması nedeniyle ticari ELISA kitlerinin Bulaşıcı Agalaksi yönünden serolojik olarak negatif olan hayvanların izlenmesi için kullanılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Bulaşıcı agalaksi teşhisinde bu tekniklerin kullanımı antijenin nasıl hazırlandığına bağlıdır. Sonic antijen metotları, daha düşük sensitivitede ve laboratuvar şartları altında daha zor hazırlanmaktadır (34).

M.agalactiae'nın spesifik antikolarını tespiti için iki farklı ticari ELISA-1 (bakteriyel antijen) ve ELISA-2 (rekombinant P48 lipoproteini) testinin, CF ve Western Blot (WB) yönteminin karşılaştırmalarını yapmışlar ve ELISA testlerinin WB ve CF testlerine göre avantajlarının daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu serolojik metotların Bulaşıcı Agalaksi infekte sürülerin izlenmesi için uygun olduğu ancak infekte hayvanların bireysel tespiti için kullanışlı olmadığını ileri sürmüşlerdir (76).

Serolojik teknikler; epidemiyolojik çalışmalarda ve sürü sağlığının takip edilmesinde yararlı ve kullanışlı yöntemlerdir ancak *M.agalactiae* yönünden negatif çıkan hayvanlarda doğrulama amacıyla diğer diyagnostik metotlar da kullanılmalıdır. Pozitif çıkan hayvanlarda ise bakteriyolojik yöntemler ile etken izole ve identifiye edilmeli ve moleküler metotlar ile deteksiyonu sağlanmalıdır.

Bakterilerde üç çeşit ribozomal RNA bulunmaktadır bunlar: 5S, 16S ve 23S rRNAdır ve bu moleküllerin genetik bilgileri genomda rRNA operonları tarafından organize edilmektedir. *M.agalactiae* genomu; 34 tRNA genine ve iki 16S-23S operonları ve iki 5S operon kümeleri ile birlikte iki grup rRNA genlerine sahiptir (16). rRNA moleküllerinin nükleotid sekanslarında, farklı evrimsel çeşitlilikte tanımlanan segmentler yer almaktadır söz konusu 16 S rRNA molekülünde; universal (U), yarı-korunaklı (S) ve değişken (V) bölgeler bulunmaktadır. Bu bölgelerdeki nükleotidlerin yer değiştirme oranları değişkenlik gösterebilmektedir (77). Filogenetik çalışmalarda 1500 nükleotidli 16 S rRNA (*rrs*) gen sekansı en çok tercih edilen bölgedir. Hem korunan hemde değişken bölgeleri bulundurması, geniş çaplı spesifitelerde (sınıf spesifik-tür spesifik) primerlerin seleksiyonuna izin vermektedir (73).

Tipik bakteriyel rRNA operonu ;

5'----16S rRNA----spacer region---23S rRNA----5S rRNA----trailer region----3'

(ayırıcı bölge)

Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan *Mycoplasma agalactiae* etkeninin bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu zaman alıcı prosedürler olduğu için daha hızlı teşhis ve identifikasyon aracı olan moleküler metotlara başvurulmaktadır. Özellikle mikoplazmaların kültürde nazlı ve yavaş üremeleri, serolojik teşhislerde en erken infeksiyondan 10-14 gün sonra sonuç vermesi, kronik vakalarda yetersiz sensitivite ile karşılaşılması ve yanlış pozitiflikleri meydana gelmesi, immunosupresyon ve antibiyotik tedavileri geleneksel diyagnostik mikrobiyolojik analizlerinde önemli sorunları ortaya çıkartmaktadır.

Mikoplazmaların hızlı teşhisi ve identifikasyonu için PCR tabanlı teşhis analizleri geliştirilmiş olup, amplifikasyon analizlerinde hedef gen, hem korunan hem de değişken sekansları içeren 16 S rRNA genleri olmuştur (73) . 1990'larda *M.agalactiae* tespiti için ilk olarak nükleik asit probları tasarlanmıştır (78) . Spesifitesi yüksek ve dikkate değer avantajlar sağlamıştır ancak sensitivitesi daha yüksek olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), bulaşıcı agalaksiye neden olan etkenlerin moleküler teşhisinde en çok tercih edilen yöntemlerden biri olmuştur.

PCR, klinik örneklerden infeksiyöz patojenlerin hızlı teşhisinde kullanılan yüksek sensitiviteye sahip ve hastalığa neden olan etkenlerin düşük miktardaki nükleik asitlerini kolayca tespit edebilen bir metottur. PCR ile yakın türler arasında ya da alt tipler arasında ayırım yapılabilir ve direkt klinik örneklerden hızlı teşhis mümkün olmaktadır (12)

En önemli avantajlarının arasında transport nedeniyle ölmüş olan bakterilerin ve özellikle kronik infeksiyonlara neden olan *M.agalactiae* etkenlerinin PCR ile teşhisinin mümkün olmasıdır (16). PCR, bakteri,virüs gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asitin primer adı verilen spesifik komplementer oligonukleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan özgün ve güvenilir bir tekniktir kısacası hedef gen bölgesinin komplementeri olan primerler ile amplifikasyonunu sağlayan bir analizdir. Bir PCR döngüsü; denatürasyon (Denaturation), primerlerin bağlanması (Annealing) ve uzama (Extension) olarak

adlandırılan üç aşamadan oluşur (79). İlk aşamada, 90 °C'de çift zincirli DNA ikiye ayrılır (denaturation) sonra 50-60 °C'lerde oligonükleotid primerler ile hedef DNA ile bağlanmaya başlar (annealing) ve en sonunda 70-78 °C'lerde zincir uzaması meydana gelir ve DNA zinciri oluşur. Bu sıcaklık değişimleri 30-40 kez tekrarlanarak 2ⁿ sayıda yeni hedef DNA oluşumu sağlanır. Amplifiye olan PCR ürünün görüntülenmesi agaroz jel elektroforez ya da uygun problemlerin hibridizasyonu ile gerçekleştirilir (79, 80).

PCR analizlerinin spesifiteleri ve sensitiviteleri bir çok değişkene bağlıdır. Bunlar; hedef gen bölgeleri, primer sekanslamaları, PCR teknikleri, DNA ekstraksiyon prosedürleri ve PCR ürününün deteksiyon metodunu içermektedir. Rutin PCR uygulamalarında kontaminasyondan kaynaklı yanlış pozitiflikler ve yanlış negatiflikler kolaylıkla meydana gelebilmektedir. Kullanılan reagentler, pipetleme aletleri, labortuvar yüzeyleri, çalışan kişinin kıyafeti ve derisi bile yanlış pozitifliklere yol açmaktadır. Çalışılacak olan örneklerin ekstraksiyon aşamaları ayrı odalarda ya da biyogüvenlikli kabinetlerde reaksiyonun gerçekleşeceği yerden ayrı bir şekilde hazırlanmalıdır.

Yanlış negatiflikler ise amplifikasyona klinik örnekte bulunan inhibitörlerin karışması ile karşımıza çıkmaktadır. Sonuçların yorumlanmasında pozitiflikler maskelenebilir bunun için uygun DNA ekstraksiyon metodunun seçimi çok önemlidir (81).

İnhibitörler genel olarak DNA üzerinde; DNA ekstraksiyonu için gerekli hücre lizisinin engellenmesi, nükleik asit degradasyonunun engellenmesi ve hedef DNA'nın amplifikasyonu için taq polimeraz enzim aktivitesinin engellenmesi ile etki göstermektedir (82).

PCR öncesinde kullanılacak olan marazi maddenin DNA'ları saflaştırılmalıdır. Genetik materyalle yapılacak araştırmalarda öncelikle yüksek molekül ağırlıklı DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilebilmesi gereklidir. PCR tekniğinde örneklerden DNA ekstraksiyonu yapılarak analitik ve diyagnostik duyarlılık artmaktadır (81).

M.agalactiae teşhisi için özellikle süttten, göz ve burun svaplarından ve eklem sıvıları gibi çeşitli örneklerden direkt ya da kültürden yapılan ekstraksiyon metotları mevcuttur (9, 12). Örnekler; hemoglobin, laktoferrin, CSF, kemik iliği aspiratı, dışkı, heparin ve SPS gibi antikoagulan inhibitörlerini içermektedir. DNA ekstraksiyon metodunun dikkatli seçimi inhibitörlerin etkisini minimize etmektedir. Bazı *M.bovis* PCR protokollerinde , süt örneklerine sürfektanların eklenmesi direkt ekstraksiyonda yararlı olmuştur (83).

Mikoplazmaların teşhisinde, özellikle süt örneklerinden bakteriyel DNA'nın ekstraksiyonu zor olabilmektedir. Bunun nedenleri arasında mikoplazmaların küçük boyutta hücreler olması ya da adheziv özellikleri sayılabilmektedir. Yapılan araştırmalarda mikoplazmalar üzerinde ekstraksiyon metotları çalışılmış ve karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu amaçla; soğuk ve sıcak fenol ekstraksiyonu, Tween 20 ile muamele, Proteaz sindirimi, ticari DNA ekstraksiyon kitleri ve enzimatik kombinasyonlar ve DNA'nın selektif membrane binding metodu kullanılmıştır (73). Süt örneklerinden *M.bovis* etkeninin teşhisi için direkt ekstraksiyon yönteminde antijen yakalamayı sağlayan ön-PCR zenginleştirilmesi yapılarak bakteri DNA'sının deteksiyon limitini düşürmeyi başarmışlardır (84).

PCR'ın temel bileşenleri hedef DNA(templeyt), taq DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksiniükleotidler, PCR reaksiyon tamponu ve Mg^{+2} iyonlarıdır (79, 82). PCR reaksiyonundaki optimal olmayan koşullar birçok nedenden kaynaklanabilir. Uygun olmayan primerler, zaman ve sıcaklık koşullarında yapılan hatalar (özellikle annealing sıcaklığı), taq polimeraz enzim kalitesi ve Mg^{+2} konsantrasyonu önemli parametrelerdir. Reaksiyon koşullarının optimize edilmesi ve reaksiyon karışımına koyulan tüm maddelerin uygun miktarları için denemeler yapılarak en uygun koşullar sağlanarak inhibitor etkiler azaltılabilir. Bu faktörlerin optimizasyonu pozitif kontrolle erime noktasına göre farklı sıcaklıklarda reaksiyon çalışılarak ya da bu maddelerin çeşitli oranda sulandırılmalarıyla denemeler yapılarak sağlanabilmektedir (85, 86).

Bulaşıcı Agalaksi hastalığının başlıca etkeni olan *Mycoplasma agalactiae* 'nın moleküler teşhisinde birçok kez PCR analizleri yapılmıştır ve ekstraksiyon metotları, PCR protokolleri, hedef gen bölgeleri ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Tola ve arkadaşları (12). *Mycoplasma agalactiae* etkeninin standart PCR teşhisinde kullanılmak üzere koyun sütünden basit ve hızlı DNA ekstraksiyonu geliştirmiş ilk kez direkt süt örneğinden; PCR, Southern Blot Hibridizasyon metotları ve bakteriyoloji metotlarını kullanarak sonuçları karşılaştırmışlardır. Yeni enfekte olmuş 21 sürüden 357 örnek ve geçmişte enfekte olmuş 8 sürüden 87 örnek test etmişlerdir. Test edilen örneklerin 175'i *M.agalactiae* PCR pozitif iken, kültür ile 153 örnekte *M.agalactiae* izole etmişlerdir. PCR metotlarında direkt olarak nazal, konjunktival, sinoviyal, doku ve süt örnekleri kullanılabildiği gibi kültürden yapılan PCR analizleri de mevcuttur (2,73). Tola ve arkadaşları (12,87) çoğu çalışmalarında *M.agalactiae* teşhisi için 16 S rRNA gen bölgesinden tasarladıkları FS1 ve FS2 primerlerini kullanmışlardır. Tasarlanan bu primerlerle kültürden ekstraksiyon yapılan

DNA örnekleri ile PCR analizleri de mevcuttur (67). Ancak *M.bovis* ile fenotipik benzerlikleri nedeniyle farklı gen bölgelerini baz alan primerler dizayn edilerek farklı PCR protokolleri çalışılmıştır.

Mycoplasma agalactiae ve *Mycoplasma bovis* türlerinin ayırımında 16 S rRNA gen sekans analizleri yetersizdir. Bunun nedeni bu genin değişken bölgelerinde sadece 8 nükleotid farklılığı ile birbirine çok yakın olan bu iki türün filogenetik olarak %99 nükleotid benzerliği göstermesidir. Bu nedenle hem Polimeraz Zincir Reaksiyonu hem de Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) metotları uygulanmaktadır (9).

'Housekeeping' ya da konstitütif genler tüm canlı organizmalarda ifade edilmektedir. Bu genler; replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi temel fonksiyonları sağlamaktadır ve türler arasında genetik farklılıkları ortaya çıkartabilmektedir. *Escherichia coli* için DNA onarımını içeren 127 gen bilinmektedir. *Mycoplasma genitalium* ve *Mycoplasma pneumoniae* gibi küçük genoma sahip bakterilerde bu işlev için replikasyondan sorumlu olan sadece 12 gen bulunmuştur. (88).

UvrC, deoxyribodipirimidine photolyase enzimini kodlayan temel genlerden biridir. Bu enzim DNA-onarım sisteminde eksizyondan (kesip-çıkarma) sorumludur. *Uvr ABC*; zarar görmüş DNA segmentlerini ATP-bağımlı enzim sistemleri ile ortadan kaldırmaktadır (89). Bu sistem tüm canlı organizmalarda ve en küçük genoma sahip olan insan patojeni *M.genitalium* etkeninde test edilerek bulunmuştur (90).

Subramaniam ve arkadaşları (9), *M.bovis* ve *M.agalactiae* tip suşlarından *uvrC* genini (housekeeping gen) klonlayarak PCR primer çiftleri tasarlamış ve *uvrC* geninin 1.6 kblık fragmentinden amplifiye edilen bu primerler ile PCR ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) analizlerini uygulamışlardır (*Ddel* enzim). 2010 yılında Türkiye'de Çetinkaya ve ark. Doğu Anadolu Bölgesinde koyun ve keçilerden toplanan 71 süt örneğinin 58'ini *M.agalactiae* - PCR pozitif bulmuşlardır (8).

M. bovis ve *M.agalactiae* etkenlerinin farklı gen bölgeleri baz alınarak (16SrRNA, oppD/F, *uvrC*) uygulanan PCR-REA (restriksiyon enzim analizi) ve standart PCR analizlerinde *Mycoplasma agalactiae* suşlarının identifikasyonu %100 doğrulanmaktadır (10).

M.agalactiae (PG2) ve *M.bovis* (PG45) etkenlerinin tip suşlarını da içeren diğer bir çalışmada ise, DNA polymerase III alpha alt birimlerini kodlayan *pol C* 'housekeeping' geninden sekanslanan tür-spesifik primerler ile bu iki tür arasındaki farklılıklar ve benzerlikler ortaya konmuştur (11).

Bulaşıcı Agalaksi hastalığının moleküler teşhisinde; farklı PCR metodları, PCR protokolleri, ekstraksiyon metodları ve farklı hedef DNA'ları baz alan komplementer oligonükleotid primerleri içeren birçok çalışma mevcuttur. Bulaşıcı Agalaksi yönünden endemik bölgede bulunan ve klinik semptom göstermeyen keçiler üzerinde yapılan bir çalışmada, kulak svapları toplanmış ve PCR metodu uygulanmıştır. Bunun sonucunda, *M.agalactiae* ve *Mmc* etkenlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (91). Diğer bir çalışmada ise standart PCR metodu ile farklı prezervatif maddeler içeren keçi sütlerinde *M.agalactiae*'nin varlığı araştırılmıştır (92).

M.agalactiae'nin diyagnostik moleküler teşhislerinde sonraki yıllarda geliştirilen 'Pulsed Field' Jel Elektrofrezisi (PFGE) ile her bir izolata ait bant profilleri görünür hale getirilir ve bant profilleri değerlendirilerek suşların birbirine olan yakınlıkları ortaya koyulmaktadır. Tola ve arkadaşları (44), 1990-1995 yılları arasında İtalya'da farklı bölgelerden topladıkları 81 izolata genomik DNA'larını *SmaI*, *NruI*, *SalI*, *XhoI*, *BssHII* ve *KpnI* RE enzimleri ile keserek PFGE profillerini çıkartmışlardır.

Greco ve arkadaşları (93) multiplex PCR metodu ile BA semptomları gösteren koyun ve keçilerde, *M.agalactiae* primerleri ve *M.mycoides* cluster (Mm cluster) primerleri kullanılarak, 56 örneğin (44 süt örneği, 2 burun svabı, 6 göz svabı, 3 vaginal svap ve 1 fibrinli eklem sıvısı) 35'inde Ma, 12'sinde Mm.cluster ve 4'ünde hem Ma hemde Mm.cluster suşlarını tanımlamışlardır.

Mikoplazma türlerinde geliştirilen Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR) metodu, sonuçların hızlı bir şekilde elde edilmesinin yanında mikroorganizma miktarının belirlenmesini de mümkün kılmaktadır (81). *M.agalactiae* etkeninin p81 lipoprotein genini esas alarak uygulanan Real Time PCR ile direkt süt örneklerinden *M.agalactiae*'nin DNA deteksiyonu ve miktarı belirlenmiştir. Sensitivitesi oldukça yüksektir ve sütte 10 µl kalıpta, 10 kopya tespit edilmiştir (95).

Mikoplazma türlerinin identifikasyonunu sağlamak için denatüre gradient jel elektroforez (DGGE) (95), amplifiye rDNA restriksiyon analizleri (ARDRA) (96) ve reverse line blot (97) metotları geliştirilmiştir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün (OIE) de belirttiği gibi Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan tüm etkenleri identifiye edebilen DGGE metodu yeni bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. PCR - DGGE metodu ile mikoplazmaların 16S rDNA geninin V3 bölgesinden sekanslanan primerler kullanılarak 27 türe ayrılması sağlanmıştır (95, 98). PCR/DGGE yöntemi ile bir seferde birçok mikoplazma türünün varlığı araştırılabilmektedir. Karışık mikoplazma kültürlerinin klasik bakteriyolojik yöntemlerle tespit edilmesi, mikoplazma kolonilerinin türler arasında diğer bakterilerde olduğu gibi belirgin morfolojik farklılık göstermemesi ve identifikasyon için saf kültür elde etmek amacıyla genellikle tek bir koloninin seçilmesi nedeniyle zordur. Ayrıca nispeten hızlı üreyen tür diğerini baskılayabilmektedir. PCR/DGGE ise karışık kültürleri de tespit edebilme kabiliyetine sahiptir. Yöntemin diğer bir avantajı, daha önce keçilerde tespit edilmemiş türler veya bilinmeyen mikoplazma türlerini tespit edebilme potansiyeline sahip olmasıdır. Mikoplazmalar in vitro olarak çok yavaş üremekte bu nedenle de hastalık teşhisi uzun sürmektedir. PCR/DGGE ise; direkt marazi maddeden, kültüre gerek olmadan hastalık etkenini tespit ederek hastalıkların çok hızlı teşhisini sağlayabilmektedir. Kültivasyonu çok zor olan türleri kolayca saptayabilmekte, miks mikoplazmal infeksiyonları, daha önce o hayvan türünde tespit edilmemiş türleri ve bilinmeyen türleri de tespit edebilmektedir (95, 99).

Antibiyotik tedavisi ile klinik belirtilerin ortadan kalkması ya da semptomların azalması sağlanabilmektedir. Bulaşıcı Agalaksi hastalığında antibiyotik tedavisinin yetersiz olduğu durumlarla karşılaşılsa da antibiyotik sağaltımı; subakut infeksiyon geçiren hayvanların klinik semptomlarında çözüm olabilmektedir ve hastalığın klinik formları gelişen hayvanlarda etkili olabilmektedir. Sağaltım sürüde bulunan tüm hayvanlara ve özellikle semptomları göstermeyen hayvanlara uygulanmalıdır. Sağaltımda sadece klinik belirti gösteren hayvanlar tedavi edilirse, Bulaşıcı Agalaksi salgınlarının kontrolü zor olacaktır. Yükselen ateş ya da kesikli süt atılımı gösteren infekte hayvanlarda aktif olarak mikoplazmaların saçılımı farkedilemeyebilir. Antibiyotik tedavisinin uzun sürmesi ve tedavide yeterli doz kullanılması; klinik semptomları ortadan kaldırabilmekte veya en aza indirgeyebilmektedir (34). Sağaltımda seçilen antibiyotikler; hücre duvarı bulunmayan bakterilere karşı aktif olmalı, plazma da uzun süre bulunabilmeli, dokulara yeterli

difüzyonu sağlamalı, kandan süte yüksek miktarlarda geçişi (süt bezlerini de içeren) olmalı ve çok düşük miktarda minimum inhibisyon konsantrasyonuna sahip olmalıdır (19).

Antibiyotiklerin seçimi küçük ruminantlarda kullanılan ilaçların azlığı nedeniyle sınırlı hale gelmiştir. Loria ve arkadaşları (100) sağaltımda, tylosine, erythromycin ve spiramycin gibi macrolidlerin ve lincomycin gibi lincosamidlerin ve enrofloksasin gibi fluorokinolonların kullanımından bahsetmişlerdir. Yaptıkları çalışmada her ne kadar spiramycin ortalama yüksek MIC değeri gösterse de antibiyotik değerlendirmelerinde kuvvetli dirençlilik göstermemiştir. Sütten izole ettikleri suşlarda oksitetrasiklin nispeten daha yüksek değerler göstermiş, enrofloksasin en düşük ortalama değeri vermiştir. İnfekte hayvanlarda macrolidlerin ve tetrasiklinlerin kullanımı klinik açıdan ilerleme sağlasa da asemptomatik taşıyıcı olarak ortaya çıkma tehlikesi her zaman bulunmaktadır. Buna ek olarak; küçük ruminantlarda eritromisin ve tylosinin kullanımı, süt üreten dokuları yıkımlamasına ve zarar vermesine neden olmuştur.

Çeşitli antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri mikoplazma çalışmalarında da kullanılmıştır. Agar dilüsyon MIC testi referans metot olarak kullanılmaktadır. Bu teknik az sayıdaki izolatların test edilmesinde pratik değildir. Agar disk difüzyon yöntemi mikoplazmaların yavaş üremesi ve zon çapları ile MIC değerleri arasında korelasyon olmaması sebebiyle pratikte kullanışlı değildir. Microbroth dilüsyon yöntemi, ekonomikliği ve aynı mikrotitre pleyti içinde çeşitli antibiyotikleri test etme olanağına sahip olması sayesinde en pratik ve en yaygın kullanılan metottur. Ancak metodun bazı zahmetli noktaları mevcuttur bunlar; dilüsyonların önceden hazırlanması ve titrenin zamana bağlı olarak değişebilmesidir. Mikrodilüsyon metodunun “sensitier” versiyonu tekniğin zahmetli yanını ortadan kaldırmış ve *M.bovis* izolatları için uygulanabilirliği tespit edilmiştir (101). 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.agalactiae* suşları ve izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemede kullanılmaktadır (102-103).

Metodun ne olduğuna bakılmaksızın, mikoplazma antimikrobiyal duyarlılık testlerini gerçekleştirmede uluslararası kabul görmüş bir rehber bulunmamaktadır. Veteriner Hekimlikte çeşitli araştırmacılar tarafından farklı tekniklerle *M.agalactiae* minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri belirlenmiştir (102-104). Mikoplazma 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 (104).

Antunes ve arkadaşlarının (103) yaptığı bir çalışmada 26 adet *M.agalactiae* suşunda 16 antimikrobiyal ajanın Microbroth dilüsyon metodu ile etkileri araştırılmıştır. MIC₉₀ değerlerini baz alan en etkili antimikrobiyaller; fluorokinolonlar, tetrasiklinler ve macrolidler olarak bulunmuştur. İki suşta, tetrasiklinlere karşı dirençlilik meydana gelirken, tüm suşlar streptomycin, erythromycin and nalidixic asite karşı dirençlilik göstermiştir.

Garnica ve arkadaşlarının (102) yaptığı diğer bir çalışmada, *M.agalactiae* izolatlarında kinolonların etkisi araştırılmış ve clindamycin'nin en etkili antimikrobiyal olduğu gözlenmiştir. Bulaşıcı Agalaksi sağaltımında erythromycin diğer bir alternatiftir (19). Oxytetracycline MIC değerleri çok yüksek bulunmuş ve tylosin MIC değerleri daha az bulunmuştur. Yeni jenerasyon macrolidlerinden tulathromycinde, suşa bağımlı olarak nispeten daha değişken sonuçlar (MIC aralıkları 1 ve 8 $\mu\text{g/ml}^{-1}$) elde edilmiştir. Diğer antimikrobiyallerle karşılaştırıldığında MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri daha yüksek çıkmıştır (102).

Önat ve arkadaşları (105) *M.agalactiae* ile doğal enfekte bir keçi işletmesinde tylosinin etkilerini değerlendirmiş ve laktasyon sonrasında süt ile saçılımın azaldığını belirtmişlerdir. Bununla beraber klinik bulgularının iyileşmesi yönünde olumlu etkilerini ortaya çıkartmışlardır.

Antibiyotik sağaltımının yanında eş zamanlı olarak kullanılan nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar, hastalığın şiddetlenmesini engellemekte ve hayvanlarda klinik olarak iyileşme meydana gelmektedir. Bununla birlikte antimikoplazmal ilaçların, laktasyon sonunda ve kuru periyodun başlangıcında uygulanması tavsiye edilmektedir (29,34)

Temizel ve arkadaşları (106), ölü *M.agalactiae* aşısı ile aşılanmış keçilerde kullanılan levamisole ve ranitidin'nin immunomodülatör etkilerinin var olduğunu bildirmişlerdir. Aşılama ile bu ilaçların kombinasyonunun yararlı ve ucuz bir metot olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bulaşıcı Agalaksi hastalığına karşı aşuların etkinlikleri kapsamlı bir şekilde tartışılmaktayken konvansiyonel aşuların kullanımı halen devam etmektedir. Aşılama; enzootik olarak etkilenen özellikle düşük sosyal ve ekonomik standartlı bölgelerde, etkili uygulamaların ve radikal önlemlerin zor alınacağı bölgelerde etkin olarak

değerlendirilmektedir. Böyle ülkelerde Bulaşıcı Agalaksi hastalığına karşı yeni jenerasyon aşuların geliştirilmesinin yararlı olacağı aşıkardır (15).

M.agalactiae'nın neden olduğu Bulaşıcı Agalaksi hastalığından korunmak amacıyla Güney Avrupa ve Orta Doğu ülkelerinde aşular geniş kapsamlı olarak kullanılmaktadır. Ancak evrensel olarak kabul edilmiş ve hazırlanmasında standart bir metodu olan tek bir aşı yoktur.

Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nde üretilen *M.agalactiae*'nin canlı aşularını yıllarca kullanılmış ve koyunlarda ve yavru­larda inaktif aşıya göre daha etkili bir koruma sağlamıştır (19, 2). Bununla beraber, mikoplazmaların saçılımı ile bulaşıcı infeksiyonlar meydana getirdiği ve laktasyondaki hayvanlarda tavsiye edilmediği bildirilmektedir.

Ülkemizde Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü tarafından Bulaşıcı Agalaksi hastalığına karşı *M.agalactiae* içeren ölü ve canlı attenüe aşular (Agalaksipen) üretilmektedir. Canlı attenüe aşular, gebeliğin son 2 ayında ve laktasyonun ilk 2 ayında uygulanmaz. Ölü aşular ise koyun ve keçilerde koç katımından evvel yapılması gereklidir.

Avrupada, canlı Ma aşularını kabul edilmemekle birlikte alüminyum hidroksit gibi yağlı adjuvan ve formalin içeren ölü aşuların kullanımı dikkat çekmektedir. İnaktif aşular­da, inaktivasyondan önce preparatların titresini (10^8 - 10^{10} cfu/ml) çok yüksek olmalı ve bu aşular, laboratuvar suşlarından elde edilmelidir (16).

Fe ve arkadaşları (108) *M.agalactiae* ve *M.mycoides* subsp. *mycoides*' i içeren inaktif aşular ile saha denemeleri yapmışlar ve bu aşının klinik semptomları önlediğini belirtmişlerdir.

Ma, MmLC ve Mmc suşları ile kombine edilmiş, 2 ml de 10^{10} cfu dozda ve alüminyum hidroksit adjuvanını içeren Aglovax (Intervet, Boxmeer, Netherlands) adında trivalent bir aşıda bulunmaktadır. Ayrıca infekte koyun materyalinin sütünden, beyninden ve meme bezi homojenatından otojen aşular hazırlanmış ve her ne kadar güvenilir olmasa da yıllarca İtalya'da kullanılmıştır. Ancak koyunlarda ve keçilerde kontamine beyinden kaynaklı şiddetli scrapie salgınlarına neden olduğu için bu aşuların kullanımı son bulmuştur (109).

İspanya'da deneysel *M.agalactiae* infeksiyonu geçiren keçilerde, 6 yıl boyunca her yıl 3 kez aşı­lama yapılmış ancak buna rağmen formalin içeren aşının tam koruma sağlayamadığı göz­lenmiştir ve doğal infekte hayvanların sürüye girişini takiben klinik

hastalıklar önlenememiştir (110). Bunun yanında mücadele kontrollerinde uygulanan formalinli aşilar, sütte Ma saçılımını azaltamamıştır (111).

Gil ve arkadaşları (112) hayvanlara uygulanan aşilar ile meydana gelen korunmadaki yetersizliğin, Bulaşıcı Agalaksi sendromuna neden olan diğer dört mikoplazma etkenin biri ile infekte olma olasılığına bağlamışlardır.

Çetinkaya ve arkadaşları(8) Türkiye’de Bulaşıcı Agalaksi’li koyun ve keçilerde *M.agalactiae* dışındaki tüm mikoplazma türlerini içerecek şekilde yeni bir aşı hazırlanması gerekliliğini vurgulamışlardır.

Fenol ya da saponin ile inaktive olan aşilar, deneysel infeksiyonlara karşı formalin, sodyum hipoklorit ya da ısı ile muamele edilmiş inaktive aşilarla karşılaştırıldığında üstün koruma sağladığı görülmüştür (113, 114).

Ma’ya karşı yağlı, emülsifiye inaktif aşiların kullanımı, koyunlarda aşılama sonucunda gelişen yüksek seviyedeki antikor yanıtının geliştiği ve mücadele edildiği saha denemelerinde Ma kolonizasyonundan ve hastalık belirtilerinden koruyarak gelecek çalışmalar için umut vaat etmiştir (115, 116).

M. mycoides capri ve *M. putrefaciens* infeksiyonları şiddetli seyretse de prevalansları nispeten daha düşüktür ancak bu infeksiyonlara karşı koruyucu aşı denemeleri hiçbir çalışmada vurgulanmamıştır.

Saha denemelerinde, Ma ve Mmc içeren bir aşı pratikte yeterli olsa da dört mikoplazma etkenini içeren multivalent, formalin-inaktif bir aşinin da yararlı olduğu görülmüştür (117).

Subunit aşilar ise direkt olarak immunojenik proteinleri tanıfiye etmesi ile yararlı olabilmektedir. Son zamanlarda epitop mapping çalışmalarında immunojenik proteinlerin tanıfiye edilmesi ile aşı çalışmalarını kolaylaştıracağı düşünülmektedir. *M.agalactiae* ‘nın güçlü immunojeniteye sahip olan yüzey lipoproteini, AvgC, infekte koyunların serumlarında spesifik antikorları stimüle ederek yüzeyde açığa çıktığını göstermiştir. Bu proteinin ileride subunit aşilar için kullanımı muhtemeldir (118).

Hastalıktan ari olan ülke ve bölgelerde her zaman infekte sürüler kesime gönderilmelidir. 2002-2003 yılları arasında Kuzey Ürdün’de 100’ aşkın keçi ve koyun sürüsünde bulaşıcı agalaksi ile seyreden risk faktörleri araştırılmıştır. Seropozitif sürülerde, üretim ve sürü sağlığı yönetimi uygulamalarını içeren 31 değişken risk faktörü test edilmiştir. Sonuçlarında, diğer sürülerden gelen koçlar, uygun olmayan süt sağım cihazlarının temizliği ve klinik olarak etkilenen anneden yavruyu ayırmamak risk faktörlerini artırdığı görülmüştür (16).

Sütçü keçi sürülerinde mikoplazmaların teşhisi sistematik olmalıdır. Çiftçiler, klinik mastitisli hayvanlardan örnek toplama ve örneklerin saklanması ile bilgilendirilmelidir. Yıllık olarak subklinik meme yangılı hayvanların süt örneklerinden CMT ya da somatik hücre sayımı yapılmalıdır ve meme patojenleri için nonselektif kültür ve mikoplazmalar için selektif kültür metotları uygulanmalıdır.

Düzenli laboratuvar takipleri ve infeksiyöz hastalıkların izlenmesi, hayvan sürülerine hastalığın girişini ya da hastalığın yayılmasını engellemeye yardım etmektedir. Hayvanların serumlarına uygulanan serolojik metotlar ile ve bireysel olarak ya da tanklardan toplanan süt örneklerine uygulanan kültür ya da PCR metotları ile takipler gerçekleştirilir. Monitoring (izleme ve müdahale) programları bulunmayan sürülerde, hijyenik süt uygulamaları ya da yavruların beslenmeden önce pastörize süt kullanımını gibi hijyenik önlemler yerine getirilmelidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇ

Etik Kurul İzin Belgesi

Tez çalışması sırasında hayvanlardan alınan süt, eklem sıvısı, göz ve burun svap örnekleri için gerekli izin Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 10.05.2011 tarihli ve 2011-05/03 nolu karar ile onaylandı. Aydınlanmış Gönüllü Onam Formu hayvan sahiplerine doldurulmak suretiyle imzalatıldı.

1. Klinik Örnekler

Ağustos 2010 ve Eylül 2012 tarihleri arasında Bursa, Balıkesir, Çanakkale ve Edirne illerine ait 22 adet koyun ve keçi işletmesinden 339 örnek toplandı. Toplam 339 örneğe ait 162 adet süt örneği, 147 adet göz svabı, 15 adet eklem sıvısı, 11 adet burun svabı ve 4 adet akciğer dokusu bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle incelendi. Bu örneklerin 190'ı keçi, 57'si koyun, 19'u oğlak, 6'sı teke, 27'si kuzu ve 6'sı koç'a ait numunelerdir. Örnekler işletme veya sürü sahibinin şikayetleri üzerine toplanarak aynı sürüde klinik semptom göstermeyen hayvanlardan da numuneler alındı. Gebeliğin son aylarında yavru atmış olan koyun ve keçilerden de numuneler toplandı. Klinik belirti gösteren ve göstermeyen işletmelerden alınan örnekler Tablo-5'de gösterilmiştir.

Süt örnekleri: Süt kesilmesi ve mastitis olgusu gözlenen koyun ve keçilerden toplam 162 adet süt örneği alındı. Meme ve meme başı %70'lik alkol ile antisepsis sağlanarak temizlendikten sonra ilk birkaç sağım atıldı ve steril tüplere süt örnekleri alındı. Örnekler buz kalıpları ile laboratuvara getirildi ve aynı gün çalışıldı.

Göz ve burun svapları: Steril, pamuk svaplar hayvanların burun boşluğuna veya gözlerine sürüldü ve transport medium ile laboratuvara getirildi. Toplam 305 adet hayvana ait 147 adet göz svabı ve 11 adet burun svabı laboratuvara buz kalıpları içerisinde ulaştırıldı.

Eklem sıvısı örnekleri: Arthritis semptomları veya artritisten kaynaklı topallama görülen hayvanların eklemelerinden steril enjektör ile 15 adet eklem sıvısı örnekleri alınarak laboratuvara getirildi.

Akciğer Örnekleri: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilen marazi maddelerden pnömoni bulgusu taşıyan 4 adet akciğer örneği değerlendirmeye alındı.

2. Standart Suş: *Mycoplasma agalactiae* AIK, NCTC 10123 suşu Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Mikoplazma Laboratuvarı 'ndan sağlandı.

3. Mikoplazma Besiyerlerinde Kullanılan Stoklar (60):

Talyum asetat (%5)

5 gr Talyum asetat (Merck)100 ml distile su içinde eritildi. 0.20 µm çaplı Filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek 10 ml miktarında steril tüplere aktarılarak +4°C'de saklandı.

Maya ekstraktı solüsyonu (%25)

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

Glikoz solüsyonu (%50)

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

Fenol red solüsyonu (%0.5)

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

Arjinin solüsyonu (%10):

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

Sodium phenolphthalein diphosphate solüsyonu (%1):

0,5 gr phenolphthalein diphosphate tuzu (Sigma) 50 ml distile su içinde eritildi,

0.20 µm çaplı filtre (Sartorius-minisart) ile sterilize edilerek +4°C de saklandı.

Tetrazolium solüsyonu (%2):

2 gr 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.

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.

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

Üre solüsyonu: 100 ml distile su içerisinde 1 gr üre (MERCK 1.08487.1000) ve 0.8 gr MnCL₂.4H₂O (Mangan(II) chlorid-Tetrahydrat MERCK 1.05927.1000) çözdürüldü. Sonra 0,20µm Minisart filtrelerinden geçirilerek sterilize edildi. +4 C de muhafaza edildi.

Steril At serumu (Biochrom AG- S9135)

Kristal Penicillin (Kristapen-Deva)

4. Antiserumlar: İzolatların Üreme İnhibisyon testi ile identifikasyonunda kullanıldı.

4.1 *M.agalactiae* antiserumu: Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü, Mikoplazma Laboratuvarı , İstanbul, Türkiye ve Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Mycoplasma Group, Weybridge, İngiltere’den sağlandı.

4.2 *M.mycoides subsp mycoides capri* antiserumu: Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü, Mikoplazma Laboratuvarı , İstanbul, Türkiye’den sağlandı.

4.3 *M.capricolum subsp. capricolum* antiserumu: Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Mycoplasma Group, Weybridge, İngiltere’den sağlandı.

4.4 *M.putrefaciens* antiserumu (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Mycoplasma Group , Weybridge, İngiltere'den sağlandı.

5. Besiyerleri

5.1. Mikoplazma Selektif Besiyeri:

Hayflick's medium: Şüpheli süt, akciğer, eklem sıvısı, göz ve burun svabı örneklerinden Mycoplasma cinsi bakterilerin izolasyonu ve suşların çoğaltılıp saklanması amacıyla kullanıldı (55).

Hayflick's Buyyon

Bakteriyolojik pepton.....	10.0 g/ml
'Lab-Lemco' powder (Et ekstraktı)....	10.0 g/ml
Sodium chloride.....	5.0 g/ml
Mineral Supplement.....	0.5 g/ml

Hazırlanışı: 2,04 gr PPLO broth (Oxoid, CM0403) 80 ml distile su içinde benmaride 100°C'de eritilip pH 7,8±0.2'ye ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. 50 °C 'ye kadar soğutulup içerisine Mycoplasma Selektif Supplement ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Besiyerleri steril vidalı kapaklı cam tüplere 9'ar ml paylaştırıldı. Sterilite kontrolü için 37 °C'de 1 gün inkübe edildikten sonra, kontaminasyon sonucu üremeye bağlı renk değişimi ve bulanıklık yönünden incelendi. Renk değişimi ve bulanıklık görülmeyen steril besiyerleri +4 °C 'lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde mikoplazma izolasyonu amacıyla kullanıldı (55).

Hayflick's Agar

Bakteriyolojik pepton.....	10.0 g/ml
'Lab-Lemco' powder (Et ekstraktı)....	10.0 g/ml
Sodium chloride.....	5.0 g/ml
Mineral Supplement.....	0.5 g/ml
Agar.....	10 g/ml

Hazırlanışı: 2,84 gr PPLO broth (Oxoid, CM0401) 80 ml distile su içinde benmaride 100°C’de eritilip pH 7,8±0.2’ye ayarlanarak otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildi. 50 °C ‘ye kadar soğutulup içerisine 20 ml Mycoplasma Selektif Supplement ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Besiyerleri 9 cm çaplı steril cam petri plaklarına 25’şer ml döküldü. Sterilite kontrolü için 37 °C’de 1 gün inkübe edildi. Steril olan besiyerleri +4 °C ‘lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde mikoplazma izolasyonu amacıyla kullanıldı (55).

Mycoplasma Selektif Supplement (Penisilinli)

Oxoid Mycoplasma Supplement (katolog no : SR0059) , Oxoid Mycoplasma Agar Base ve Oxoid Mycoplasma Broth Base içerisine 20’şer ml katılacak şekilde hazırlandı.

Oxoid Mycoplasma Selective Supplement

At Serumu20 ml
Maya ekstraktı (25 % w/v).....10 ml
Talyum asetat 25 mg.....25 mg
Penisilin.....20,000 IU

Hazırlanışı: 1 şişe içerisine 20 ml distile su katılıp karıştırılarak homojen hale geldikten sonra 50 C’de bulunan 80 ml Mycoplasma broth’a ya da 80 gr Mycoplasma agarın içerisine ilave edildi.

5.2. Biyokimyasal Test Besiyerleri

Aşağıda belirtilen formülasyonlar, Mycoplasma Protocols (60) kitabında bildirildiği gibi hazırlanmıştır.

Glikoz Fermentasyonu Testi Besiyeri:

A.

PPLO broth 70 ml
Maya ekstraktı (%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

Talyum asetat % 50.4 ml
Fenol red (%1'lik solüsyonu)0.5 ml

B. Besi yeri glikozsuz olarak hazırlandı.

A ve B besi yerleri hazırlandıktan sonra 5 ml miktarında şişelere aktarıldı (60).

Arjinin Hidrolizi Besiyeri:

A.

PPLO broth (pH 7.0).....70 ml
Maya ekstraktı (%25'lik solüsyonu).....10 ml
İnaktive at serumu20 ml
L arjinin HCl (%10'luk solüsyonu).....5 ml
Talyum asetat % 50.4 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml).....0.5 ml
Fenol red (%1'lik solüsyonu).....0.5 ml

B. Yukarıdaki besi yeri arjininsiz olarak hazırlanır.

A ve B besiyerleri hazırlandıktan sonra 5 ml miktarında şişelere aktarıldı (60).

Fosfataz Aktivitesi Besiyeri

PPLO agar70 ml
İnaktive at serumu20 ml
Maya ekstraktı (%25'lik solüsyonu)..... 10 ml
Sodium phenolphthalein diphosphate (%1 w/v sol.). 1 ml
Talyum asetat % 50.4 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml).....0.5 ml
15-18 ml miktarında petri kutularına taksim edildi.

- Serumdan ve maya ekstraktından gelen fosfataz aktivitesini engellemek amacıyla At serumu ve maya ekstraktı solüsyonu benmaride 56° C'de 1 saat inaktive edildi (60).

Tetrazolium Redüksiyonu Besiyeri

PPLO agar70 ml
İnaktive at serumu20 ml

Maya ekstraktı (%25'lik solüsyonu).....10 ml
Tetrazolium solusyonu (%2 w/v sol.)1 ml
Talyum asetat % 50.4 ml
Kristal penisilin (200 000 IU/ml).....0.5 ml
15-18 ml miktarında petri kutularına döküldü (60).

5.3. Genel Besi Yeri

Kanlı Agar: Blood Agar Base No:2 (Oxoid-CM0271) üretici firmanın formülasyonuna göre hazırlanıp, toplanan örneklerden izole edilen mikoplazma şüpheli kolonileri L formlarından ayırmak amacıyla kullanıldı.

6.DNA Ekstraksiyon Kiti: ROCHE marka (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Kod: 11 796 828 001, Mannheim, Almanya). *M.agalactiae* AIK suşu ve klinik örneklerin DNA'sını izole etmek amacıyla kullanıldı. Kit 15-25 °C'de muhafaza edildi. DNA Ekstraksiyon Kitinde bulunan ve DNA Ekstraksiyon Kitinde bulunmayan ancak içeriğinde kullanılan maddeler aşağıdaki gibidir:

DNA Ekstraksiyon kitinde bulunanlar:

- Binding Buffer
- Proteinase K
- Inhibitor Removal Buffer
- Wash Buffer
- Elution Buffer

DNA Ekstraksiyon kitinde bulunmayanlar:

- Ethanol
- İsoopropanol
- Phosphate Buffer Saline (PBS)

7.Spektrofotometre: Nanodrop ND-1000 V3.3 Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA). İzole edilen DNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesinde kullanıldı.

8. Deiyonize ve Ultra Saf Su Sistemi: MILLIPORE marka (ELIX 5, katalog no : ZLXS5V05Y, MILIQ Synthesis A10, katalog no: ZMQ55VFT1, Fransa). Özellikle PCR ve moleküler deneyler için gerekli olan reagentlerin hazırlanmasında suyun kalitesi bütün sistemden alınacak sonuçları direkt olarak etkileyebileceği için son derece büyük öneme sahip bu sistem kullanılmıştır.

9. PCR Miksi ve Reagentleri: Roche Marka (katalog no: 04 738 381 001). PCR reaksiyonu Roche FastStart *Taq* DNA Polymerase, dNTPack miksi ve reagentleri ile gerçekleştirildi. Farklı dNTP miktarlarının kullanıldığı PCR protokolü için Roche marka dNTP set (katalog no: 11969064001) kullanıldı. PCR reaksiyonunda kullanılırken, kit reagentleri özel soğutucu racklar kullanıldı. Miks ve reagentler kullanılmadığı zaman -20 °C’de saklandılar.

PCR miksi ve reagentler aşağıdaki gibidir:

- 1- FastStart *Taq* DNA Polymerase (5 U/μl)
- 2- 10 X PCR Reaksiyon Buffer 20 mM MgCl₂ ile
- 3- 10 X PCR Reaksiyon Buffer (MgCl₂’süz)
- 4- 25 mM MgCl₂ stok solüsyonu
- 5- GC Zenginleştirme Solüsyonu 5X konsantrasyon
- 6- PCR Grade Nükleotid Miksi (10 mM dNTP)

Deoxynucleoside Triphosphate Set içeriği

- dATP, PCR Grade,Sodium salt, 100 mM
- dCTP, PCR Grade,Sodium salt, 100 mM
- dGTP, PCR Grade,Sodium salt, 100 mM
- dTTP, PCR Grade,Sodium salt, 100 mM

AHVLA, İngiltere’de yapılan PCR miksinde kullanılan reagentler:

- 1- 5x Go *Taq* Green Buffer (Promega, UK)
- 2- 5U/μl Ampli*Taq* Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)
- 3- 10 mM dNTP’s (Promega, UK)

4- 1.5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems)

10.Primerler: PCR reaksiyonunda kullanılan primerler Dr. Zeydanlı tarafından Alpa DNA, Montreal’de sentezletildi.

M.agalactiae uvrC geni için;

76,488 pmol/μl MAGAUVRC1-L ve 81,763 pmol /μl MAGUVRC1-R oligonükleotid sentezleri gerçekleştirilmiştir (9) (Tablo-6).

MAGAUVRC1-L: 5’-CTCAAAAATACATCAACAAGC-3’

MAGUVRC1-R : 5’- CTTCAACTGATGCATCATAA-3’

Primerlerin 100 pmol /μl stok solüsyonları hazırlandı ve 25 μl stok primer ile 75 μl ultra deiyonize saf su ile karıştırılarak 25 pmol / μl hazırlandı. Primerlerin amplifiye ettiği PCR ürünü 1624 baz çifti olarak hesaplandı. Stok primer solüsyonu ve sulandırılmış primer solüsyonu -20 °C’de saklandı.

M.agalactiae polC geni için;

82,504 pmol/ μl MAPol-1F ve 79,956 pmol/μl MAPol-5R oligonükleotid sentezleri gerçekleştirilmiştir (11) (Tablo-6).

MAPol-1F: 5’-CATTGAACCTCTTATGTCATTTACTTTG-3’

MAPol-5R: 5’-CTATGTCATCAGCTTTTGGGTGA-3’

Primerlerin 100 pmol /μl stok solüsyonları hazırlandı ve 10 μl stok primer ile 90 μl ultra deiyonize saf su ile karıştırılarak 10 pmol/μl hazırlandı. Primerlerin amplifiye ettiği PCR ürünü 265 baz çifti olarak hesaplandı. Stok primer solüsyonu ve sulandırılmış primer solüsyonu -20 °C’de saklandı.

Tablo-4 Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler

Hedef gen	Primer Çifti	Oligonükleotid Sekansı (5'-3')	Molekül ağırlığı	Sıc. ^a	Referans
<i>polC</i>	MAPoI-1F MAPoI-5R	CATTGAACCTCTTATGTCATTTACTTTG CTATGTCATCAGCTTTTGGGTGA	265bp	49 °C	(Marenda <i>et.al.</i> ,2005)
<i>uvrC</i>	MAGAUVRC1-L MAGAUVRC1-R	CTCAAAAATACATCAACAAGC CTTCAACTGATGCATCATAA	1624bp	60 °C	(Subramaniam <i>et.al.</i> ,1998)

^aPCR analizlerinde kullanılan annealing sıcaklıkları

11. PCR mikrotüpleri: PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için, kullanılan PCR Reagentlerinin konulduğu 0,2ml, ince duvarlı, düz kapaklı, DNase, Rnase ,Pyrogen free mikrotüpler (Axygen) kullanıldı.

12. Gradient Thermal Cycler PCR Cihazı : PCR reaksiyonları, Gradient Thermal cycler (Techne TC-3000G, Bibby Scientific, UK) PCR makinesinde gerçekleştirildi. 48 bloklu bu cihazın 8 sütununda sıcaklık optimizasyonu sağlanmakta ve 6 sırasında reagentleri ve primer konsantrasyonlarının optimizasyonu ayarlanabilmektedir. Annealing sıcaklıkları, 20 ve 80 °C gradient özellikleri arasında optimize olabilmektedir. Her bir bloğun sıcaklık oranı saniyede 3.3 °C hızlanmaktadır.

13. PCR soğutucu sistem, Buzlu Rack : Eppendorf PCR cooler (katalog no: Z606634-1EA) marka buzlu rack ile PCR reaksiyonu hazırlanırken reagentleri ve örneklerin DNA'larını PCR reaksiyonu başlatılana kadar soğukta tutulması sağlandı.

14. Agaroz Jelin Hazırlanmasında Kullanılan Maddeler

- Tris-Acetate- EDTA (TAE) Buffer: Agaroz Jel hazırlanırken ve DNA'ların jelde yürütülmesini sağlamak amacıyla 1X TAE kullanıldı.

50X TAE buffer hazırlanışı: 750 ml deiyonize su içerisine 242 gr Tris-base katıldı ve çözdürüldü. 100 ml 0,5 M EDTA ve 57,1 ml glasiyal asetik asit katılarak iyice karıştırıldı. 25 °C'de pH 8.3'e ayarlandı ve stok solüsyonu olarak kullanıldı. Bu stok solüsyonundanda 1X TAE hazırlanarak jel hazırlanmasında kullanıldı.

- Agaroz (Prona Agarose, Biomax, lot no: 104514R): Hazırlanan jelin yüzde oranına göre farklı miktarlarda hassas terazide tartılarak kullanıldı.

15. Horizontal Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı: Thermo Scientific marka horizontal tank, jelin dökülmesinde kalıp olarak ve jelde DNA'ların yürütülmesinde kullanıldı. Elektroforez tankı, anot ve katot uçlarına gelen elektrik akımı ile DNA'ların jelde hareket etmesini sağlamaktadır. Thermo Scientific marka güç kaynağı ise, tanka elektrik akımını sağlamaktadır. Elektroforez aşamasında, PCR protokolüne göre volt, miliamper ve süre değişiklikleri ayarlandı.

16. E-Gel Agaroz Jel Elektroforez Sistemi (Invitrogen, Life Sciences): Hazır kaset jeller ile kısa sürede elektroforez sağlayan bu mini sistem az örnekli çalışmalarda kullanıldı. *UvrC* geni PCR optimizasyon denemeleri bu sistem ile yapıldı.

17. DNA Ladder (markır) ve DNA loading dye (yükleme tamponu): Thermo Scientific Gene Ruler 100bp DNA ladder (katalog no: SM0242) paket içeriğinde bulunan 6X DNA loading dye, 1X konsantrasyonunda ayarlandı ve örneklerin DNA'ları bu yükleme tamponu ile boyandı. Thermo Scientific Gene Ruler 100bp DNA ladder (0,5-1 µg), 100 ve 1000 bp'lik DNA fragmentleri arasındaki bölgeler için kullanıldı.. 100 ve 1500 bp'lik DNA fragmentleri arasındaki bölgeler için Roche DNA molecular weight marker XIV (katalog no:11 721 933 00) kullanıldı. Çalışılan DNAların molekül ağırlıkları, markırları ile karşılaştırıldı.

18. Parafilm: Elektroforez aşamasından önce DNA'ların loading dye ile karıştırılmasında kullanıldı.

19. Etidyum Bromür: Thermo Scientific (MK1481772) marka etidyum bromür ile jelde yürütülen DNA bantlarının görüntülenmesi sağlandı.

20. UV Transillüminatör: Yürütülen DNAların UV ışığıyla kontrolleri yapılarak görüntülendi (Vilber Lourmat (312 nm) ECX-F26-MX, Fransa).

21. Jel Görüntüleme ve Dökümantasyon Sistemi: Vilber Lourmat Quantum 1100 marka Jel Görüntüleme ve Dökümantasyon Sistemi, beyaz ışık ve UV ışığı altında nükleik asit ve proteinlerin görüntülenmesi, bakterilerin kolonilerinin sayılmasına imkan sağlayan bilgisayarlı bir sistemdir. Elektroforez sonrasında meydana gelen DNA bantlarının görüntülenmesinde kullanıldı ve 2 megapiksel bir CCD kamerası ile bilgisayara aktarılan görüntüler 'Infinity-Capt software ve Bio 1D' programları aracılığı ile analiz edildi. Elde edilen görüntülerin elektronik ortamda çeşitli formatlarda değerlendirildi ve printer aracılığı ile çıktısı alındı.

22. Isıtıcı Bloklar: Techne marka (Dri-Block , model : FDB 02DD, seri no: 155248 A,UK) ve Labnet (AccuBlok D1200, USA) marka cihazlar kullanıldı. DNA ekstraksiyonu sırasında, reagentlerin uygun sıcaklığa getirilmesi ve bu sıcaklıklarda gereken beklemenin yapılması amacıyla kullanıldı.

23. Vorteks : IKA Lab Dancer marka vorteks DNA ekstraksiyon sırasında ve PCR reagentlerinin karıştırılmasında kullanıldı.

24. Otomatik pipetler: 0.1-2.5 µl , 0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 10-1000 µl (Eppendorf)' lik pipetler bakteriyoloji ve moleküler çalışmaları sırasında kullanıldı.

25. Hassas terazi: Sartorius AG (ED224S, Germany) marka terazi *M. agalactiae* izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

26. Transport mediumlu svaplar: Cultiplast marka stuart besiyeri içeren svaplar (katolog no: 101A20) mycoplasmaların muhafazası için uyumlu svaplardır. Bu svaplar, gözden ve burundan alınan örnekler sürülerek kullanılmıştır.

27. Steril süt tüpleri: Steril 15 ml'lik plastik santrifüj tüplerine süt örnekleri alındı ve santrifüj yapıldı.

28. Karbondioksitli Etüv: ShelLab, 2300 CO₂ inkübatör mikoplazmaların bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyonunda kullanıldı.

29.Mikro Santrifüj: Beckman Coulter marka (Microfuge 18,California) ve Sigma Edition 1-14ED marka. DNA ekstraksiyonunda ve PCR yapılırken reagentlerin santrifüj edilmesi amacıyla kullanıldı. Hettich universal 30RF marka santrifüj ise toplanan süt örneklerinin santrifüjünde kullanıldı.

30.İnkübasyon Jarı

31.Mikroaerofilik Ortam Zarfı (Oxoid CD0025)

32. Etüv(37°C) (Nüve EN 500)

33.Stereo Mikroskop (Olympus SZ2-ILST)

34.Binokuler Mikroskop (Olympus CH20BIMF200)

35.Su banyosu (Elektro-mag M2535-6)

36.pH metre (Merck)

37.Derin Dondurucu (Arçelik yatay derin dondurucu)

38.Buzdolabı (Arçelik Çift kapılı No-frost)

39.Otoklav (Nüve OT 4060)

40.Steril tek kullanımlık pipet (1 ml, 2ml, 5ml, 10ml) (LP Italiana SPA)

41.Steril pastör pipeti

42. 0.20 µl'lik Membran Filtre (Sartorius- minisart)

43. 0.45 µl'lik Membran Filtre (Sartorius- minisart)

44. Viyal 9mm'lik

45. Laminar Flow Cabinet (Nüve MN 120)

46. Cam petri kutuları (7 cm çaplı)

47. Mikrodalga fırın (Beko MD1510)

YÖNTEM

A. Bakteriyolojik İnceleme

1. İzolasyon Çalışmaları

İzolasyon amacıyla laboratuvara getirilen süt örnekleri, eklem sıvıları, akciğer örnekleri, göz ve burun svaplarının sıvı besiyerinde 10^{-1} 'lik dilüsyonları hazırlanarak veya direkt sürme şeklinde ekim yöntemleri uygulandı. Süt örnekleri 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra ekimleri yapıldı (55).

1.1 Numunelerin Ekimi

Numunelerin ekimleri, Mycoplasma Protocols (55) kitabında bildirildiği gibi yapılmıştır.

- Süt ve eklem sıvılarının sıvı besiyerlerinde 10 katlı dilüsyonları yapıldı.
- Her bir örnekten Mycoplasma agara birkaç damla yayıldı ve Mycoplasma sıvı besiyerine inokulumun %10'u kadar geçildi.
- Göz ve burun svapları direkt olarak agara ekildi ve PCR metodunda kullanılmak üzere 30 dk. Mycoplasma buyyonda bekletildi.
- Lezyonlu akciğer doku örneklerinin yüzeyi Mycoplasma agara direkt sürüldü.
- İnokule edilen sıvı besiyerleri ve agarlar 37 °C'de %5 CO₂'li nemli ortamda inkübe edildi.
- 2-3 gün sonra sıvı besiyerleri üreme belirtisi yönünden günlük olarak incelendi ve agarda tipik koloni oluşumu x 35'lik büyütme ile stereo mikroskopta incelendi.
- 7 gün sonunda üreme belirtisi gözlenmediğinde inokulum sıvı besiyerinden taze sıvı besiyerine %10'u kadar tekrar pasajları yapıldı, bu sıvı besiyerlerinden 50µl agarlara yeniden yayıldı.
- Bakteriyel kontaminasyon gözlendiğinde (aşırı bulanıklık veya pH değişimi ile renk değişikliği meydana geldiğinde) 0,45 µm filtre ile kontamine sıvı besiyerinden taze sıvı besiyerine 1 ml pasajlandı.

- 21 gün inkübasyon sonunda mikoplazma kolonileri ya da tipik sahanda yumurta görünümlü koloniler gözlenmezse sonuçlar negatif olarak değerlendirildi.

1.2 Pasajlama

Ekim yapılan besi yerinde üreme belirtisi varsa hemen pasajı 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 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 (16, 55).

1.3 Kolonilerin Klonlanması

Hayflick's agarda saptanan *Mycoplasma* sp. 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 inkube 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. İlk izole edilen kolonilerin, L-formu kontaminantlardan ayrılması amacıyla, kanlı agara pasajları yapıldı. Kanlı agarda üreme olduğunda ve koloni şekli değiştiğinde, L formu kontaminant olarak değerlendirildi (16, 55).

2. İdentifikasyon Çalışmaları:

Mycoplasma sp. şüpheli izolatları Acholeplasmalardan ayırmak için digitonin sensitivitesine, Ureaplasmalardan ayırmak için üreaz aktivitesine bakıldı. Üç kez klonlanarak saf kültürü hazırlanan *Mycoplasma* sp. izolatlarının tür identifikasyonu için; glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi, tetrazolium redüksiyon testleri ve film ve spot oluşumu gibi biyokimyasal testler ve ayrıca üreme inhibisyon testi uygulandı (2).

Digitonin Sensitivitesi

Steril filtre disklere 25 µl miktarda digitonin solüsyonu emdirildi. 37°C de 6 saat kurutuldu ve +4 C'de saklandı.

1-Pleytler kullanılmadan önce 37°C'de 1 saat kurutuldu.

2-Test edilecek kültürün ve kontrol kültürünün 10 katlı dilüsyonları yapıldı.

3-Mycoplasma Agar üzerine 200µl kültür yayıldı. Merkezine digitonin diski yerleştirildi ve 37 °C'de, nemli ortamda inkübe edildi. 24 saat aralıklarla stereomikroskopta kontrol edildi.

Kontrol sonucunda sterole ihtiyaç duyan mikoplazmalar 5-20 mm arasında inhibisyon zonu oluşturdu. İhtiyaç duymayanlar (acheloplazmalar) ise 0,5-3 mm inhibisyon zonu oluşturmaktadır (60).

Üre Hidrolizi

Bir lama agar blok ile kesilen *Mycoplasma* sp. kolonisi koyuldu ve üzerine hazırlanan üre reaktifinden bir damla damlatıldı. Kolonin rengi, amonyak ve manganez dioksitten kaynaklı olarak kahverengiye dönüştüğünde üreaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirildi (60).

Glikoz Fermentasyonu

Test edilecek izolatın 24-48 saatlik saf kültüründen 200 µl miktarda bir adet glikozlu ve bir adet glikozsuz besi yerine ekimleri yapıldı. Birer adet de ekim yapılmamış glikozlu ve glikozsuz besi yeri 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) ve kontrol tüplerinde değişiklik oluşmadığında glikoz fermentasyonu pozitif olarak değerlendirildi (60).

Arjinin Hidrolizi

Test edilecek izolatın 24-48 saatlik saf kültüründen 0,5 ml miktarda bir adet arjininli ve bir adet arjininsiz besi yerine ekimleri yapıldı. Birer adet de 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 (60).

Fosfataz Aktivitesi

Fosfataz testi için hazırlanan agar plağı 2'ye bölündü. Test edilecek izolatın 24–48 saatlik saf kültüründen agar plağının yarısına 0,1 ml 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 (60).

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, rutubetli ortamda 2 hafta inkube edildi. Stereomikroskopta pembe veya kırmızı renk görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi (60).

Film ve Spot Oluşumu

Üreme olan agarların üzerinde ya da sıvı kültürlerin 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 (60).

Üreme İnhibisyon Testi

Üreme İnhibisyon Test Prosedürü

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 *Mycoplasma agalactiae* antiserumu konuldu, oda ısısında kuruması beklendikten sonra petri ters çevirilerek 37°C’de, rutubetli ortamda inkube edildi. 2-3 günlük süre sonunda çukur etrafında 2 mm’den daha fazla üreme inhibisyon zonunun oluşması pozitif olarak değerlendirildi. *M.agalactiae* antiserumu ile negatif sonuç veren örnekler biyokimyasal testler ile değerlendirildikten sonra şüphelenilen mikoplazma türleri yönünden farklı antiserumlar test edildi (60).

B. Moleküler Çalışmalar

1.DNA Konsantrasyonu ve Saflığın Ölçümü: NanoDrop ND-1000 V3.3

Spektrofotometre (Nano Drop Technologies, Inc. Wilmington, USA) ile yapıldı. Cihazın çalışma prosedürü gereği önce ölçüm yapılacak nükleik asidin içinde bulunduğu sıvı ile ‘blank ölçüm’ yapılması gerekmektedir. Ekstrakte edilen *M.agalactiae* AIK suşunun DNA’sından 1.5µl alınarak spektrofotometrenin ölçüm noktasına dikkatli bir şekilde damlatıldı ve ölçüm yapıldı. Ölçüm noktası temiz ve kuru peçete ile silinerek anlatılan işlemler diğer direk süttten ekstrakte edilen DNA’lar için tekrar uygulandı ve ölçümler gerçekleştirildi.

2.DNA Ekstraksiyonu

Roche High Pure PCR Template Preparation kitinin kullanma kılavuzunda belirtilen sıvı kültür ve örneklerden DNA ekstraksiyon yöntemi prosedürlerine göre *M.agalactiae* AIK suşunun ve klinik örneklerin DNA’sı ekstrakte edildi. Kullanma kılavuzunda belirtildiği gibi örneklerin 20-25 °C’de olması, ısıtıcı blokların önceden hazırlanması, Inhibitor Removal Buffer ve Wash Buffer belirtilen şekilde ethanol ile karıştırılması, santrifüj işlemlerinin 20-25 °C’de gerçekleştirilmesi ve saklanan örneklere tekrar tekrar dondurulup çözündürülme işleminin yapılmamasına özen gösterildi.

Roche High Pure PCR Template Preparation Kiti ile Direkt Klinik Örnelerin DNA Ekstraksiyon Metodu

Klinik örneklerden eklem sıvısı ve süt örnekleri direk ekstraksiyon metodunda kullanıldı. Ayrıca akciğer örnekleri, göz ve burun svapları mycoplasma buyyonda 1 saat beklendikten sonra örnekler sıvı besiyerinden çıkartıldı ve bu sıvı besiyeri DNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

1. 1 ml klinik örnek veya kültür, steril 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine alındı ve 10 dakika 14.000 rpmde santrifüj edildi. Üzerinde kalan sıvı (supernatant), pelete değmeden ayrılarak atıldı.
2. 200 µl PBS ile süspanse edildi.
3. 200 µl binding buffer ile karıştırıldı.
4. 40 µl Proteinase K eklendi ve vortekslendi. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. 100 µl isopropanol eklendi.
6. Spin kolon açılıp, mikro santrifüj tüpündeki sıvı presipitat dahil olmak üzere, ağzına pipet ucu ya da sıvı değdirmeden spin kolona aktarıldı, kapağı kapatıldı ve 9500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı ve kapağı dikkatlice açıldı.
8. 500 µl inhibitor removal buffer koyuldu. Kapağı kapatılıp 9500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı ve kapağı dikkatlice açıldı.
10. Üzerine 500 µl wash buffer eklendi ve tekrar 9500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı ve kapağı dikkatlice açıldı.
12. Üzerine tekrar 500 µl wash buffer eklendi ve 9500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Koleksiyon tüpleri boşaltılıp kurutmak amacıyla 10 saniye 14000 rpm'de santrifüj edildi.
14. Spin kolonda bulunan filtreli tüpleri mikro santrifüj türlerine geçirdikten sonra 200 µl 70 °C'de bekletilen elution buffer ya da PCR grade eklendi.
15. 9500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtreli tüpleri dikkatli şekilde çıkartıp atıldı. 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpünde biriken elution bufferdaki DNA PCR reaksiyonunda template olarak kullanılmak üzere saklandı. Hemen kullanıldıysa +2 ~ +8 C'de daha sonraki analizlerde kullanıldıysa -15 ~ -25 °C'de saklandı.

3. PCR Parametreleri

Örneklerin ve standart suşların DNA'ları ekstrakte edildikten sonra template olarak PCR miksinde kullanıldı.

3.1 *polC* –PCR protokolü

Roche FastStart *Taq* DNA Polymerase, dNTPack miksi ve reagentler uygun oranlarda karıştırıldı ve templateler eklendi. Final volümü 25 µl olacak şekilde optimize edildi. Negatif olarak kontrol *M.putrefaciens* ve deiyonize su, pozitif olarak Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Mikoplazma laboratuvarı Dr. Ümit Özdemir’nden sağladığımız *M.agalactiae* AIK suşu’nun ekstrakte edilen DNA’ları kullanıldı. *M.agalactiae polC* geni PCR protokolü aşağıdaki gibi belirtilmiştir (11) (Tablo-4):

dNTP miksin hazırlanması :100 mM dNTP setten 30 mM dATP, 30 mM dTTP, 15 mM dGTP ve 15 mM dCTP hazırlandı. 200 µl final hacim için; 60 µl dATP, 60 µl dTTP, 30 µl dGTP ve 30 µl dCTP karıştırılıp 20 µl PCR grade su eklendi.

PCR içeriği	Hacim/1 Reaksiyon
H ₂ O	17.5 µl
10X PCR Reaksiyon Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer 2(10 pmol/µl)	1 µl
dNTP	0.25 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.25 µl
Template DNA	1 µl
Toplam	25 µl

Çalışılacak olan örneklerin DNA sayısına ve 1 adet pozitif, 1 adet template bulunmayan negatif ve 1 adet template bulunan negatif kontrollerine göre reaksiyon miksi hazırlandı. Miks 24’er µl oranında PCR mikrotüplerine paylaştırıldı ve üzerine template, negatif ve pozitif kontroller 1’er µl oranında eklendi. Gradient Thermal cyler (Techne TC-3000G, Bibby Scientific, UK) PCR makinesine yerleştirildi. Reaksiyonda kullanılan DNA amplifikasyon parametreleri aşağıdaki gibidir:

	94 °C'de 2 dakika
30 siklus	94 °C'de 30 saniye
	49 °C'de 30 saniye
	72°C'de 30 saniye
	72 °C'de 5 dakika
	4 °C'de

3.2 *uvrC* –PCR protokolü

Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, İngiltere'de Mikoplazma Grup Şeflerinden Roger Ayling ile uyguladığımız *uvrC* –PCR protokolüne göre; *Taq* Gold DNA Polymerase, dNTPack miksi ve reagentler uygun oranlarda karıştırıldı ve templateler eklendi. Final volümü 25 µl olacak şekilde optimize edildi. Negatif olarak kontrol deiyonize su, pozitif olarak Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden sağladığımız *M.agalactiae* AIK suşu'nun ekstrakte edilen DNA'ları kullanıldı. *M.agalactiae uvrC* geni PCR protokolü aşağıdaki gibi belirtilmiştir (9) (Tablo-4):

PCR içeriği	Hacim/1 Reaksiyon
H ₂ O	15.375 µl
5X Go <i>Taq</i> Green Buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dNTP (her biri 10 mM)	1 µl
Primer 1 (25 pmol/µl)	0.5 µl
Primer 2 (25 pmol/µl)	0.5 µl
Ampli <i>Taq</i> Gold DNA polimeraz	0.125 µl
Template DNA	1 µl
Toplam	25 µl

Çalışılacak olan örneklerin DNA sayısına ve 1 adet pozitif , 1 adet template bulunmayan negatif ve 1 adet template bulunan negatif kontrollerine göre reaksiyon miksi hazırlandı. Miks 24'er µl oranında PCR mikro tüplerine paylaştırıldı ve üzerine template

,negatif ve pozitif kontroller 1'er µl oranında eklendi. Gradient Thermal cyler PCR makinesine yerleştirildi.

Reaksiyonda kullanılan DNA amplifikasyon parametreleri aşağıdaki gibidir:

	95 °C'de 5 dakika
33 siklus	94 °C'de 30 saniye
	60 °C'de 30 saniye
	72°C'de 90 saniye
	72 °C'de 7 dakika
	4 °C'de

3.3 Agaroz Jel Hazırlanması ve Dökülmesi

PolC PCR ve *uvrC* PCR protokollerinde %2 agaroz jel kullanılmaktadır. 120 ml 1XTAE buffer içine hassas terazide tartılan 2.4 gr agaroz karıştırıldı ve bir erlen mayer içinde mikrodalga fırında yüksek ayarda çözünmesi sağlandı. Aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp çalkalandı. Agaroz tamamen eriyene kadar çalkalayarak ısıtıldı. Elektroforez tepsisinin çatlamaması için çözelti muslukta biraz soğutuldu (65°C). Horizontal elektroforez tankına ait 20 gözlü ve 12 gözlü iki tarak (jel iletanka yerleştirildikten sonra agaroz jel, tank tepsisine döküldü. 15 dakika sonra jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden dikkatlice çıkarıldı. Elektroforez tankı, jeli ve elektrodları kapatacak şekilde 1xTAE buffer ile dolduruldu.

3.4 Amplifikasyonu yapılan DNA'ların agaroz jele yüklenmesi

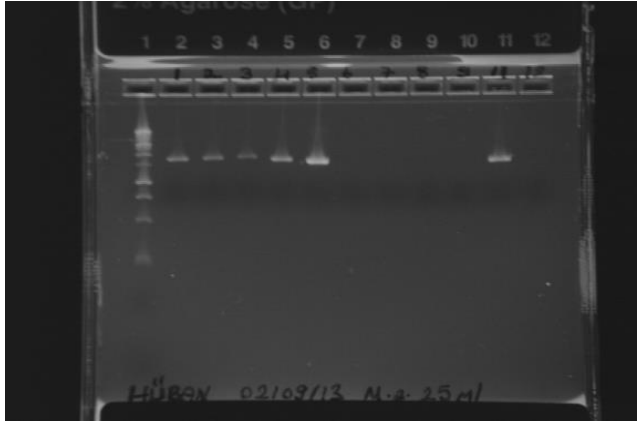
Çalışılacak olan amplifiye DNA'lar, buzlu racklarda elektroforez tankının bulunduğu odaya getirildi ve parafilm üzerinde belli oranlarda loading dye ile boyandı. 10 µl amplifiye DNA ile 4 µl 1x loading dye (Thermo Scientific) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa Gene Ruler 100bp DNA ladder ve sonra pozitif ve negatif kontroller kuyucuklara yüklendi.

3.5 Amplifikasyonu yapılan DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PolC PCR protokolüne göre, elektroforez tankına bağlı olan güç kaynağı cihazı, 110 volt, 400mA ve 60 dakika süre ile ayarlandı. Süre sonunda tanktan dikkatlice çıkartılan agaroz jel, etidyum bromür ile 15 dk süre ile ışık almayan bir odada boyandı. Daha sonra karanlık bir odada UV transilluminatör ile DNA bantlarının görüntülenmesi sağlandı.

Kontrolü yapılan agaroz jelin Vilber Lourmat Quantum 1100 marka Jel Görüntüleme ve Dökümantasyon Sistemi ile beyaz ışık ve UV ışığı altında DNA'ların görüntülenmesi sağlandı ve kayıtları alındı. *UvrC* PCR protokolüne göre, elektroforez tankına bağlı güç kaynağı cihazı, 100 volt , 400mA ve 60 dakika süre ile ayarlandı. Süre sonunda tanktan dikkatlice çıkartılan agaroz jel görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

3.6 E-Gel Agaroz Jel Elektroforez Sistemi: % 2 agaroz jel içeren hazır kasetler ile, jel hazırlanmasına zaman harcamadan kısa sürede elektroforez aşamasına geçildi. DNA'lar, 100 voltta 60 dakika süre ile yürütüldü. *UvrC* geni PCR optimizasyon denemelerinde az örneklerle çalışıldığında bu sistem kullanıldı (Şekil-1).

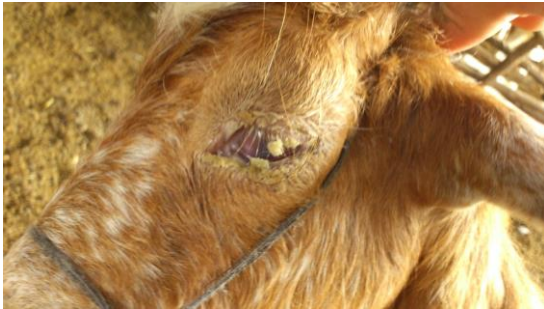


Şekil-1 %2'lik E-Gel Agaroz Jel Elektroforezi -*M.agalactiae*- *uvrC* -PCR (1624 bp).
1, Ladder marker. 2, 3, 4, 6: Ma-pozitif. 7, 8, 9, 10 : Ma-negatif.
11 : *M.agalactiae* pozitif kontrol (NCTC 10123). 12: Per grade su.

BULGULAR

Klinik Bulgular

Hayvanlarda mikoplazma mastitisleri kontagiyöz (bulaşıcı) karakterde olduğu için entansif yetiştiriciliğin fazla olduğu bölgelerde mastitis vakalarına yaygın olarak rastlanılmış ve ekstansif yetiştiriciliğin yaygın olduğu bölgelerde ise bireysel mastitis vakaları şeklinde gözlemlendi. Subklinik ve klinik mastitis olgusu gözlenen koyun ve keçilerde, laktasyon döneminde süt kesilmesi gibi tipik karakterli semptomlarla karşılaşıldı. Mastitis olguları yanında artritis ya da keratokonjunktivitis olgularına da rastlandı. Koyun ve keçilerde kronik mastitiste mikoplazmaların saçılımı devam ettiğinden dolayı klinik belirti göstermeyen süt örnekleri de toplandı. Klinik vakalarda memelerin şişliği ve boyutunda artış gözlemlendi. Sütün görünümünde ise sarı, yeşil fibrinli bir kısımla, bekletildiğinde oluşan çökelti ve bulutlu bir görünüm dikkati çekti. Gözlerinde ödem nedeniyle beyazımsı kornea (opasite) ve kornea-sklera birleşme yerinde hiperemi izlenen hayvanlarda keratokonjunktivitis tipi yangı gözlemlendi (Şekil-2). Artritisten kaynaklı topallama meydana gelen hayvanların eklemlerinde sinoviyal sıvı artışı nedeniyle eklem kapsülünde genişleme ve bulutlu sinoviyal içerik makroskopik olarak gözlemlendi (Şekil-3). Laboratuvarımıza getirilen akciğer örneklerin de ise etkilenen akciğer loblarında mermer manzarası görünümünde konsolidasyon sahaları ve nekroz alanları görüldü.



Şekil-2 Keratokonjunktivitis olgusu



Şekil-3 Artritis olgusu

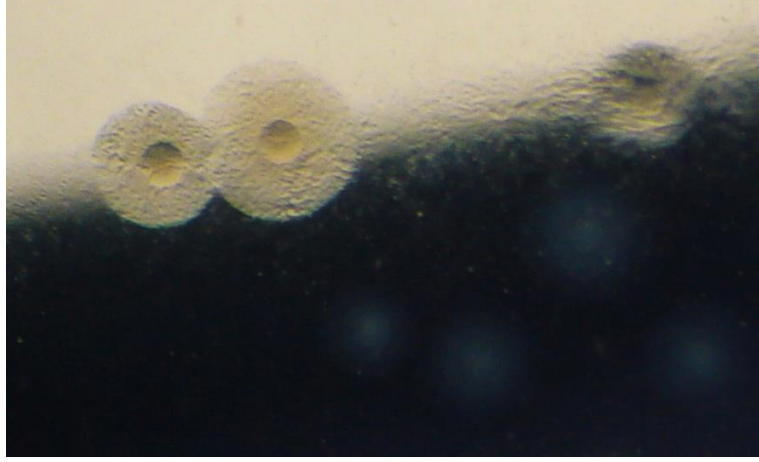
Bakteriyolojik Bulgular

- **İzolasyon Çalışmaları**

Toplanan 339 örneğin 29 adedinde ilk izolasyonda mikoplazma şüpheli koloniler görüldü. İlk izolasyonda üreme belirtisi gözlemlenmeyen ve 3 kez kör pasajı yapılan besi yerlerinin hiçbirinde mikoplazma şüpheli koloniler saptanamadı. Mikoplazma şüpheli 29 örneğin 3 kez klonlanmasından ve kanlı agara pasajından sonra tipik sahanda yumurta görünümünü koruyan 29 (%8.5) örnek *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirildi (Tablo-5).

Yirmidokuz adet *Mycoplasma* sp. izolatının 18'i süt örneklerinden (% 62,06), 4 'ü göz svaplarından (%13,79), 3'ü burun svaplarından (%10,34), 2'si eklem sıvılarından (%6,89) ve 2'si akciğer örneklerinden (%6,89) izole edildi.

Yirmidokuz örneğin stereomikroskoptaki (x40) koloni morfolojilerinin tipik sahanda yumurta görünümünde ortası düğmeli, kenarları yuvarlak ve küçük oldukları görüldü (Şekil -4).



Şekil – 4 *Mycoplasma agalactiae*'nin stereomikroskopik görünümü

Tablo-5 Marmara bölgesindeki koyun ve keçilerden toplanan numunelerin il ve ilçelere göre dağılımı ve bakteriyolojik bulguları

İlçe / İL	İşletme/Sürü	Numune Türü ve Sayısı	<i>Mycoplasma sp.-pozitif örneklerin sayısı^a (%)^b</i>	Klinik belirtiler
Kemalpaşa/BURSA	3 adet keçi sürüsü ve	85 Süt örneği	7 (%8.2)	*1 adet keçi işletmesinde klinik belirti yok diğer 3 keçi sürüsünde keratokonjunktivitis, gözlerde opasite ve respiratorik bulgular
	1 adet keçi işletmesi	80 Göz svabı	2 (%2.50)	
	1 adet koyun sürüsü	11 Eklem sıvısı	-	
Yenişehir/BURSA	1 adet keçi işletmesi	16 Süt örneği	11 (%68)	BA'nın tüm belirtileri
		4 Eklem sıvısı	2 (%50)	
Osmangazi/BURSA Gökçeören Köyü	1 adet keçi sürüsü	16 Süt örneği	-	*_
		7 Göz svabı	-	
Karacabey/BURSA	1 adet keçi sürüsü	12 Süt örneği	-	*_
Nilüfer/BURSA Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliği	1 adet keçi sürüsü	4 Süt örneği	-	Keçilerin akciğer dokularında mermer manzarası görünümü ve nekroz alanları
		8 Burun svabı	2 (%25)	
		1 adet koyun sürüsü	4 Akciğer örneği	
10 Göz svabı	1 (%10)			
Susurluk-Söve-Manyas/BALIKESİR	4 adet keçi sürüsü	18 Göz svabı	1 (%5.5)	4 adet keçi sürüsünde mastitis, keratokonjunktivitis ve meme dokusu lezyonları
		3 Burun svabı	1 (%33)	
	1 adet koyun sürüsü	14 Süt örneği	-	Koyunlarda respiratorik problemler (hırıltılı ve güç solunum, öksürük)

Çan-Yenice-Biga/ ÇANAKKALE	1 adet keçi sürüsü	4 Süt örneği	-	Keçilerde topallama ve öksürük
	3 adet koyun sürüsü ve	17 Göz svabı	-	Koyun sürülerinde göz akıntısı ve opasite, eklem şişlikleri ve abort bulguları
	1 adet koyun işletmesi			
Lalapaşa/EDİRNE	1 adet koyun sürüsü	10 Süt örneği	-	* _
		15 Göz svabı	-	
Toplam	22	339	29 (% 8.5)	

^a Bakteriyolojik incelemede *Mycoplasma* sp. olarak tanımlanan örnekler

^b Pozitif kültürlerin yüzdesi

*Bu işletmelerde geçmişte Bulaşıcı Agalaksi semptomları gözlemlenmiştir.

• 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 (Şekil-5).



Şekil-5 Digitonin Sensitivitesi

Üre Hidrolizi

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

Glikoz Fermentasyonu

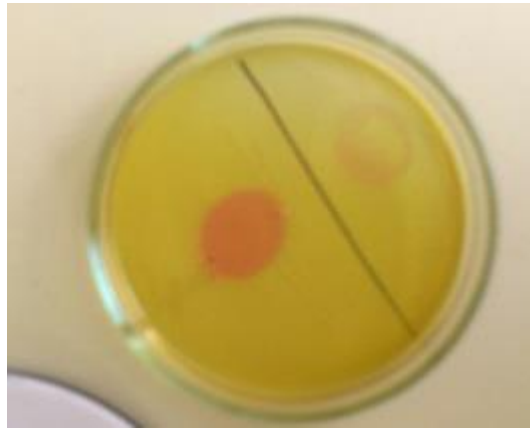
İzole edilen 27 suşda glikozlu PPLO buyyonun renginde değişiklik görülmediğinden glikoz fermentasyonu negatif olarak değerlendirildi. Ancak 2 suş, buyyonun rengini açık sarıya döndürdüğü görüldü ve glikoz fermentasyonu pozitif olarak kabul edildi.

Arjinin Hidrolizi

İzole edilen suşların 27'sinde arjininli besiyerinin rengini değiştirmedeği için arjinin hidrolizi yönünden negatif olarak değerlendirildi. Ancak 2 suşda arjininli besiyerinde pembe renk oluşumu gözlemlendi ve pozitif olarak değerlendirildi.

Fosfataz Aktivitesi

İzole edilen suşların fosfataz testi besiyerindeki kolonilerinin üzerine 1 damla 5 Normal Sodyum Hidroksit damlatıldıktan sonra, 25 örnekte 1-2 dakika içinde kırmızı renk oluşumu gözlemlendi ve fosfataz pozitif olarak değerlendirildi. 4 adet *Mycoplasma* sp. suşunda ise 1-2 dakika içerisinde renk oluşumu gözlenmedi (Şekil-6).

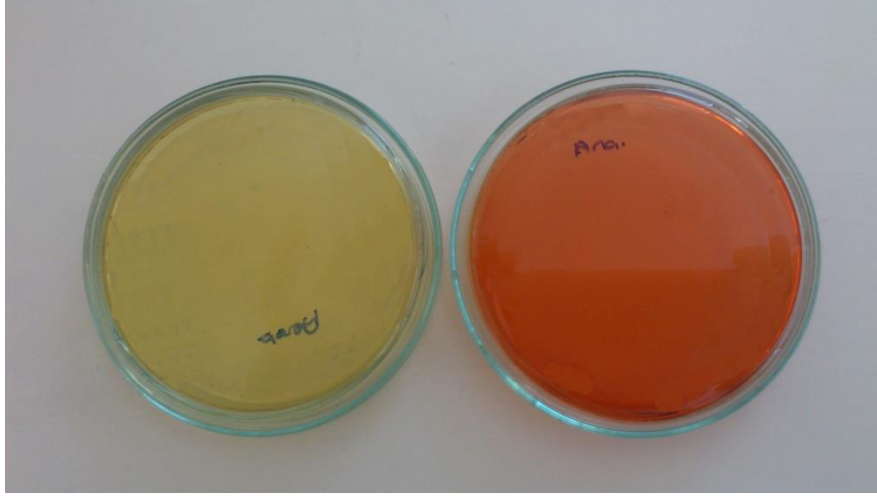


Şekil-6 Fosfataz Aktivitesi.

5 N NaOH damlatılmış kısım 1-2 dk içinde kırmızı renk vermektedir.

Tetrazolium Redüksiyonu:

İzole edilen 27 suşda hem aerobik hem de anerobik inkubasyon sonunda tetrazolium besiyerinde üreme olan bölgelerde pembe veya kırmızı renk görüldüğünden tetrazolium redüksiyonu pozitif olarak değerlendirildi. İzole edilen 2 suşda ise aerobik inkubasyonda negatif ancak anaerobik inkubasyonda pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil-7).



Şekil -7 Solda Aerobik inkubasyon sonrası Tetrazolium Redüksiyonu negatif. Sağda anaerobik inkubasyon sonrası Tetrazolium Redüksiyonu pozitif.

Film ve spot Oluşumu

İzole edilen 29 adet *Mycoplasma* sp. suşunun 25'inde 1 haftalık inkubasyondan sonra sıvı besiyerinde film, katı besiyerinde spot oluşumu gözlemlendi. Ancak diğer 4 suşda ise film ve spot oluşumu gözlemlenmedi aynı zamanda *M.agalactiae* AIK suşunda da film oluşumu saptanmadı.

Üreme İnhibisyon Testi

Üreme inhibisyon testinde her izolat için yapılan 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar 3 farklı dilüsyonda üreme inhibisyon zonu en iyi belirlendiği dilüsyon 10^{-2} olarak tespit edildi. İzole edilen mikoplazma suşlarından 25'inde *M. agalactiae* antiserumu ile yapılan üreme

inhibisyon testinde 2 mm'den fazla üreme inhibisyon zonu oluştuğu görüldü. Diğer 4 suşta Ma, Mmc, Mcc ve Mp antiserumları ile inhibisyon zonları oluşmadı.

Biyokimyasal testler (Tablo-6) ve üreme inhibisyon testleri sonucunda 25 izolat *M.agalactiae* olarak tanımlandı. Sadece biyokimyasal test sonuçlarına göre 2 izolat *M.ovipneumoniae* ve 2 izolat *M.arginini* olarak tanımlandı (Tablo-6).

Tablo-6 İzole edilen Mikoplazma suşlarının biyokimyasal özellikleri

İzole Edilen Suşlar (N)	Glikoz Fermentasyonu	Arjinin Hidrolizi	Fosfataz Aktivitesi	Tetrazolium Redüksiyonu (aero/anaero)	Film/Spot Oluşumu
<i>M.agalactiae</i> (25)	-	-	+	+/+	değişken
<i>M.ovipneumoniae</i> (2)	+	-	-	+/+	-
<i>M.arginini</i> (2)	-	+	-	-/+	-

PCR Sonuçları

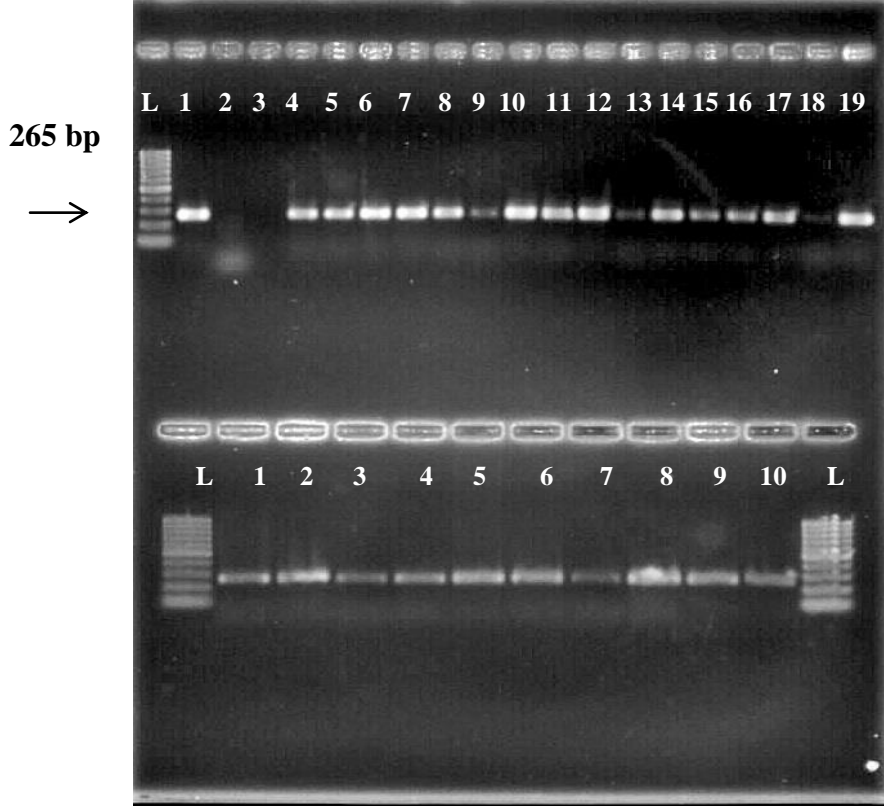
234 örneğe uygulanan *M.agalactiae* *uvrC* geni PCR sonuçlarına göre %9.4 oranında pozitif bulunurken, *polC* geni ile uygulanan PCR sonuçlarında ise %13.24 oranında pozitif bulundu. PCR sonuçları ile bakteriyolojik incelemeler karşılaştırıldığında %10.68 oranında *M.agalactiae* tanımlandı. Aynı zamanda 7 keçi sütünde ve 2 göz svabında bakteriyolojik inceleme ve *uvrC*- PCR sonucunda Ma negatif bulunurken, *polC* -PCR sonucunda bu örnekler pozitif bulundu.

234 örneğin *uvrC*-PCR sonuçlarına göre, süt örneklerinin %15.74 oranı ile, eklem sıvı örneklerinin %6.66 oranı ile ve akciğer örneklerinin %25 oranı ile pozitif bulundu (Tablo-7).

PolC -PCR sonuçlarına göre, süt örneklerinin %22.04 oranı ile, eklem sıvı örneklerinin %6.66 oranı ile, göz svabı örneklerinin %1.20 oranı ile ve akciğer örneklerinin %25 oranı ile pozitif bulundu (Tablo-7) (Şekil-8).

Tablo -7 Toplanan örneklerden elde edilen *M.agalactiae*-Bakteriyolojik ve PCR sonuçları

Numune Türü	Numunelerin Sayısı	<i>M.agalactiae</i> Bakteriyolojik- pozitif örneklerin sayısı	<i>M.agalactiae uvrC</i>- PCR pozitif örneklerin sayısı (%)	<i>M.agalactiae polC</i> - PCR pozitif örneklerin sayısı (%)
Süt örneği	127	24(%18.89)	20 (%15.74)	28 (%22.04)
Göz svabı	83	-	-	1 (%1.20)
Eklem sıvısı	15	-	1 (%6.66)	1 (%6.66)
Akciğer örneği	4	1 (%25)	1 (%25)	1 (%25)
Burun svabı	5	-	-	-
	234	25(%10.68)	22 (%9.4)	31 (%13.24)



Şekil-8 Agaroz jel elektroforezinde (%2) *M.agalactiae-polC*-PCR

Üst sıradan L: Ladder (marker), 1.kuyucuk: *M.agalactiae* pozitif kontrol (AIK suşu, Pendik), 2. Kuyucuk: negatif kontrol- *M.putrefaciens* (NCTC 10155) suşu ile, 3. kuyucuk: negatif kontrol template (Pcr grade su), 4-19 arası kuyucuklar: Ma pozitif. Alt sıradan; L: Ladder (marker), 1-10 arası kuyucuklar; Ma pozitif.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bulaşıcı Agalaksi, dünyada yaygın olarak bulunmakta ve bir çok ülkeden rapor edilmekle birlikte başlıca Akdeniz bölgesinde varlığı bilinmektedir (2). Bulaşıcı Agalaksi, koyun ve keçilerde süt üretiminde azalmaya, genç hayvanlarda ölüme, gebelerde abortuslara neden olarak önemli ekonomik kayıplar meydana getirmektedir (19, 37). Kinde ve arkadaşlarının (119) yaptıkları bir çalışmada, Kaliforniya’da bulunan 600 başlık bir keçi işletmesinde hijyenik önlemlerin zayıflatılması ve sürüye hiçbir klinik belirti göstermeyen yeni keçilerin alınması ile 4 hafta içerisinde artiritis/poliartritis ve şiddetli mastitis şikayetlerinin ortaya çıktığını ve sonrasında ani ölümlerin şekillendiğini belirtmişlerdir. Bu klinik belirtiler üzerine yapılan bakteriyolojik ve patolojik bulgular sonucunda *M.agalactiae* ve Mmc identifiye etmişlerdir. Çalışmamızda ise hasta sahiplerinin şikayetleri üzerine geçmişte Bulaşıcı Agalaksi semptomları göstermiş ya da göstermeye devam eden koyun ve keçilerden örnekler toplanmıştır. Özellikle keçi sürülerinde gözlenen keratokonjunktivitis, artrit ve klinik mastitis belirtileri taşıyan hayvanlardan toplanan örneklerin bakteriyolojik incelemeleri sonucunda *M.agalactiae* identifiye edilmiştir. Ancak diğer bir keçi işletmesinde ise hiçbir semptom göstermeyen hayvanlardan toplanan süt örneklerinde *M.agalactiae* izolasyonu gerçekleşmiştir. Bu işletme, geçmişte keçilerde meydana gelen keratokonjunktivitis, gözlerde opasite ve klinik mastitis belirtileri ile şikayetçi olmuş ve yoğun antibiyotik tedavisi ile sadece klinik belirtileri ortadan kaldırmıştır.

Bulaşıcı Agalaksi, Akdeniz ülkeleri, Asya ve Afrika’da endemik, Amerika’da sporadik olarak seyretmekte ülkemizde ise endemilerle kendini göstermektedir. Abtin ve arkadaşları (120), İran’da Bulaşıcı Agalaksi semptomları gösteren hayvanlardan topladıkları örnekleri bakteriyolojik ve PCR metodları ile incelemiş ve sonucunda 102 örneğin 19 (%32.2)’unda *M. agalactiae* identifiye etmişlerdir. De La Fe ve arkadaşları (121) ise, İspanya’da süt, eklem ve kulak svabı örnekleri topladıkları 28 adet keçi sürüsünün %40’ında *M. agalactiae* saptamışlardır. Özdemir ve arkadaşlarının (7) yaptıkları çalışmada, Bulaşıcı Agalaksi’den şüpheli 22 adet koyun ve keçi sürüsünden toplam 144 örnek alınmış ve 68 örnekte mikoplazma etkenlerini bakteriyolojik yöntemlerle izole etmişlerdir. İzole edilen türlerin 53 (% 78)’ü Ma, 6 (%9)’sı Mmc, 5 (%7)’i Mcc ve 4 (%6)’ü MmmLC olarak identifiye edilmiştir. Koyunlardan izole edilen türlerin hepsi Ma, keçilerden izole edilen türler Ma, Mmc, Mcc ve Mmm LC olarak identifiye edilmiştir. Koyunlarda Ma izolasyon oranı %

100 olurken keçilerde Ma %60, Mmc %16, Mcc % 13 ve MmmLC %11 bulunmuştur ve coğrafik olarak, Marmara bölgesinde hastalığın Ege ve Akdeniz bölgelerine göre daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada ise Marmara bölgesindeki çeşitli illerden toplanan 339 örnekten 25 (%7.37) *M. agalactiae*, 2 (%0.58) *M. ovipneumoniae* ve 2 (%0.58) *M. arginini* izole edilmiştir. Buna göre Marmara Bölgesindeki koyun ve keçilerde Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan mikoplazma türü olarak *Mycoplasma agalactiae* belirlenmiş, Bulaşıcı Agalaksi'nin diğer etkenleri olan Mmc, Mcc ve Mp türlerine rastlanmamıştır. Koyun ve keçilerde yapılan çalışmalarda Bulaşıcı Agalaksi Hastalığına neden olan mikoplazma türleri dışında, *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* türleri de dikkat çekmektedir (122-125). Türkiye'de Bulaşıcı Agalaksi hastalığına yönelik spesifik çalışma sayısı çok az olmakla birlikte mevcut çalışmalar ile karşılaştırıldığında çalışmamızdaki etken izolasyon oranının düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedeni örnekleme zamanı veya sürülerde uygulanan tedaviler olabilir. Nitekim sürü sahiplerinden sürülerde uygulanan antibiyotik tedavileri ile ilgili net yanıtlar alınamamıştır. Özellikle sublinik mastitislerde ya da kronikleşen vakalarda mikoplazma saçılımı devam etmekte ve hızlı bir şekilde tüm sürüyü etkileyerek bulaşmaktadır. Dolayısıyla Bulaşıcı Agalaksi semptomlarının gözlendiği ya da gözlenmediği durumlarda dahi hayvanlardan süttten örneklemeler yapılmalı ve bakteriyolojik ve moleküler analizler için laboratuvara gönderilmelidir.

Mikoplazma kolonilerinin identifikasyonunda biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır. Cins düzeyinde *Acheloplasma*'lardan digitonin duyarlılığı ve Üreaplasma'lardan üreaz testleriyle ayrılırlar. Mikoplazmaların identifikasyonunda serolojik yöntemler haricinde glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi ve tetrazolium redüksiyonu gibi biyokimyasal testlerden yararlanılır (14, 16, 59, 60). Bu çalışmada izole edilen mikoplazma suşları digitonin duyarlılığı, glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi, tetrazolium reduksiyonu, film ve spot oluşumu özellikleri yönünden incelenmiş. Tüm *Mycoplasma* sp. izolatlarının digitonine duyarlılığı olduğu ve üreaz aktivitesi testinin negatif olduğu belirlenmiştir. *M.agalactiae* izolatlarının hepsinin glikoz ve arjinin testlerine negatif, fosfataz ve tetrazolium testlerine pozitif yanıt verdiği ancak film ve spot oluşumunda değişkenlik saptanmıştır. Çalışmalarımız sonucunda *M.agalactiae*'nin identifikasyonunda belirtilen biyokimyasal özellikleri ile benzerlik göstermektedir (16, 34).

Mikoplazmalar komplemente gereksinim duymadan antiserumla inhibe olabilirler, spesifik olan bu reaksiyonlar identifikasyonlarında başarılı sonuçlar alınmaktadır. Biyokimyasal testlerin yanı sıra tür spesifik identifikasyon için hiperimmün tavşan serumları kullanılarak üreme inhibisyon, film inhibisyon, floresan antikor ve metabolik inhibisyon testleri *M.agalactiae* identifikasyonunda kullanılabilir. Bu çalışmada ise üreme inhibisyon testinden yararlanılmış ve bu testte antiserum emdirilmiş filtre kağıtlar kullanılmıştır (126). Filtre kağıdı ile yapılan test daha ekonomik olurken agar çukur yönteminde antiserum miktarı daha standart olarak kullanılabilir. Yaptığımız çalışmada, üreme inhibisyon testi için antiserum emdirilmiş filtre kağıtlar uygulanmış ve izole edilen 25 adet mikoplazma suşunun *M.agalactiae* olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye’de en güncel koyun ve keçi mikoplazmaları üzerine araştırmaları Çetinkaya ve arkadaşları (127) , öncelikle Keçilerin Bulaşıcı Plöropnömonisi hastalığının etkeni olan *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* ‘nin Türkiye’deki yaygınlığı üzerine yapmıştır. Aynı araştırmacılar daha sonra mikoplazma aşısı stratejileri geliştirmek amacıyla Bulaşıcı Agalaksi hastalık etkenlerinin Doğu Anadolu bölgesindeki illerde yaygınlığını araştırmışlardır. Süt örneklerinin bakteriyolojik ve Ma spesifik PCR ile incelenmesi neticesinde %81.7’inde *M. agalactiae* saptamışlardır (8). Bu oran, Bulaşıcı Agalaksi hastalığının Doğu Anadolu Bölgesi’de diğer bölgelere göre daha endemik olduğunu göstermektedir. Hastalığın yaygınlığı, koyun ve keçi sürülerinin entansif ve ekstansif yetiştiriciliğe göre değişmekte ve önemli rol oynamaktadır.

Serolojik teşhislerde ise, ELISA testleri nispeten ekonomik ve hızlı alternatiflerdir. Ancak mikoplazmalar arasında kros reaksiyonlar vermesi, spesifitelerini sınırlar ve kronik olarak infekte olan taşıyıcıları tanımlama için yeterli olmamaktadır (73). Kontagiyöz Agalaksi hastalığına neden olan *Mycoplasma agalactiae* etkeninin bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu zaman alıcı prosedürler olduğu için daha hızlı teşhis ve identifikasyon aracı olan moleküler metotlara başvurulmaktadır. Özellikle mikoplazmaların kültürde nazlı ve yavaş üremeleri, serolojik teşhislerde en erken infeksiyondan 10-14 gün sonra sonuç vermesi, kronik vakalarda yetersiz sensitivite ile karşılaşılması ve yanlış pozitiflikleri meydana gelmesi, immunosupresyon ve antibiyotik tedavileri geleneksel diyagnostik mikrobiyolojik analizlerinde önemli sorunları ortaya çıkartmaktadır.

Mikoplazmaların hızlı teşhisi ve identifikasyonu için PCR tabanlı teşhis analizleri geliştirilmiş olup, amplifikasyon analizlerinde hedef gen, hem korunan hem de değişken

sekansları içeren 16 S rRNA (*rrs*) genleri olmuştur (77). PCR ile yakın türler arasında ya da alt tipler arasında ayırım yapılabilir ve direkt klinik örneklerden hızlı teşhis mümkün olmaktadır. PCR metodunda örneklerin kültürlerinden ya da direkt klinik örnekten DNA ekstraksiyonları yapılabilir. Tola ve arkadaşları (12) direkt koyun sütlerinden guanidium thiocyanate (128) ekstraksiyon metodunu uygulamış ve 357 örnekten 153'ünde *M.agalactiae* -PCR pozitif bulmuştur. Direkt ekstraksiyon yöntemi kullanılan diğer bir çalışmada 58 koyun ve keçi süt örneğinde %81,7 oranı ile *M.agalactiae* identifiye edilmiştir ve kültür sonuçları ile karşılaştırıldığında direkt PCR yönteminin sensitivitesinin %98,3 ve spesifitesinin ise %98,8 olduğu belirlenmiştir (8). Çalışmamızda ise direkt örneklerden uygulanan ekstraksiyon metodu sonucunda elde edilen PCR pozitiflik oranı (*polC*-PCR, %13.24 ve *uvrC*-PCR, %9.4) diğer çalışmalara göre daha düşüktür. Ancak çalışmamızda elde edilen kültür sonuçları (%10.68) ile *polC* -PCR sonuçları karşılaştırıldığında, *M. agalactiae* pozitiflik oranının (%13.24) yüksek olduğu gözlenmiş ve yapılan çalışmalarla(8,10) buyumlu bulunmuştur. Sütte bulunan inhibitör maddeler nedeniyle uygulanan farklı ekstraksiyon metodları var olduğu gibi kültürden yapılan ekstraksiyon metotları daha fazla tercih edilmektedir. Ancak ticari ekstraksiyon kitleri içerisinde inhibitör maddeleri uzaklaştırmak amacıyla tampon maddeler bulunduğu için uyguladığımız ekstraksiyon metodunda da olumlu sonuçlar alınabildi.

M.agalactiae'nin moleküler teşhisinde kullanılan farklı hedef gen bölgelerini baz alan spesifik primerler ile standart PCR metotları uygulanmıştır (9-12). Subramaniam ve arkadaşları (9); *M.bovis* ve *M.agalactiae* tip suşlarından *uvrC* genini klonlayarak PCR primer çiftleri tasarlamış ve 1.6 kb'lık fragmentinden amplifiye edilen bu primerler ile PCR ve Restriksiyon Fragment Uzunluk **Polimorfizm** (RFLP) analizlerini uygulamışlardır. OIE'nin Bulaşıcı Agalaksi hastalığı için belirttiği moleküler teşhis metodunda *uvrC* geni spesifik primerleri ile yapılan PCR protokolünü bu çalışmamızda uyguladık. Aynı zamanda, *M.agalactiae*- *polC* genine ait spesifik primerler ile örnekler tekrar çalışıldı ve spesifite ve sensitivite oranları karşılaştırıldı. Marenda ve arkadaşlarının da (11) belirttiği gibi *polC* geni ile uygulanan PCR'ın *uvrC* geni ile uygulanan PCR'a göre bazı avantaj ve sonuçlarını elde ettik. Tüm örneklere uygulanan *polC*-PCR'da amplifikasyon parametrelerinde değişiklik yapılmazken *uvrC* -PCR'da farklı annealing sıcaklıkları denenerek optimizasyon sorunu ile karşılaşıldı. Marenda ve arkadaşlarının (11) yaptıkları çalışma ile *uvrC*-PCR amplifikasyonunda annealing sıcaklıklarındaki farklılıkların yanında her iki metotta da *M.agalactiae* ve *M.bovis* suşları arasındaki filogenetik yakınlığa rağmen aynı duyarlılıkta deteksiyonlarını sağlayabilmişlerdir. Fakat standart şartlar altındaki

laboratuvarlar arasında uygulanan *uvrC*-PCR metodunun sonuçları uyumluluk göstermezken, *polC*-PCR metodunun sonuçları açık ve kesin şekilde uyumluluk göstermiştir. Bu iki gen bölgesini baz alan diğer bir PCR çalışmasında ise 4 adet *M.agalactiae* izolatu, *uvrC* primerleri ile negatif sonuç vermiş ve *polC* ile pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla iki gen bölgesinin deteksiyon oranlarında farklılıklar yaşanmış ve uyumsuzluklar elde edilmiştir (13).

Yaptığımız çalışmada 234 örneğe uygulanan *M.agalactiae uvrC* -PCR sonucunda %9.4 oranında *M. agalactiae* pozitif tespit edilirken, *polC* geni ile yapılan PCR sonucunda %13.24 oranında *M.agalactiae* pozitif bulunmuştur. *PolC* -PCR ile *M.agalactiae*'nin deteksiyon oranı *uvrC*-PCR'a göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu uyumsuzluğa sebep olan diğer bir neden ise; *uvrC*-PCR'da amplifiye edilen gen bölgesi molekül ağırlığının 1624 bp olmasıdır dolayısıyla DNA bant boyutunun yüksek olması deteksiyon oranının düşük olmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu büyüklükteki bir gen bölgesinin amplifikasyonu ve elektroforez aşamalarının çok dikkatli şekilde yapılması ve PCR optimizasyonunun uygun koşullarda gerçekleşmesi gerekmektedir. PCR sonuçları ile bakteriyolojik incelemeler karşılaştırıldığında ise %10.68 oranında *M.agalactiae* identifiye edildi. PCR ile bakteriyolojik sonuçlar karşılaştırıldığında 7 keçi sütünde ve 2 göz svabında bakteriyolojik incelemeler ve/veya *uvrC*- PCR sonucunda Ma negatif bulunurken, *polC* -PCR sonucunda bu örnekler pozitif bulundu.

Uygulanan *uvrC*-PCR sonuçlarına göre, süt örneklerinin %15.74 oranı ile, eklem sıvı örneklerinin %6.66 oranı ile ve akciğer örneklerinin %25 oranı ile pozitif bulundu (Tablo-7). *PolC* -PCR sonuçlarına göre, süt örneklerinin %22.04 oranı ile, eklem sıvı örneklerinin %6.66 oranı ile, göz svabı örneklerinin %1.20 oranı ile ve akciğer örneklerinin %25 oranı ile pozitif bulundu (Tablo-7). Bu PCR sonuçlarının karşılaştırmaları doğrultusunda; *uvrC*, *polC* gibi housekeeping genlerin ileri teşhis metotlarında birlikte kullanılması ve moleküler metotlarla geliştirilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır.

Yaptığımız çalışmada, *M.agalactiae* yönünden bakteriyolojik incelemeler ve PCR sonuçlarında elde edilen izolasyon ve identifikasyon oranları diğer çalışmalar (8,10) ile karşılaştırıldığında, daha düşük bulunmuştur. Bakteriyolojik incelemelerde bu oranın düşük olmasının nedenleri arasında; koyun ve keçi sürülerinde antibiyotik kullanımının yaygın olması, kontaminasyon riski ve süt örneklerinde mikoplazmaların saçılım periyodunun aralıklı olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. PCR izolasyon oranının düşük olmasının nedenleri arasında ise; DNA'ların ekzojen ve endojen kontaminasyonu, örneklerden yapılan direk DNA ekstraksiyonu, özellikle sütte bulunan

inhibitör maddeler, ve Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan *M.agalactiae* dışındaki diğer türlerin izolasyon olasılığı üzerine değerlendirmeler yapıldı.

Bu çalışmada koyun ve keçilerden toplanan 162 adet süt örneği, 147 adet göz ve 11 adet burun svabı, 15 adet eklem sıvısı ve 4 adet akciğer örneklerinin tümünden toplam 29 (% 8.5) *Mycoplasma* sp. izole edildi ve izolatların 25 (% 86.20)'i *M.agalactiae*, 2 (% 6.89)'si *M.ovipneumonia* ve 2 (%6.89)'si *M.arginini* olarak izole edildi. PCR sonuçlarında ise *M.agalactiae*'nin % 13.24 oranı ile *polC*-PCR metodu uygulanarak en fazla deteksiyon oranı sağlandı.

Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan tüm etkenlerin bakteriyolojik ve moleküler metotlarla teşhisine, *M.agalactiae*'nin Türkiye çapında yaygınlığı ve dağılımının tespit edilmesine, saha suşlarının ortaya konulmasına ve varsa diğer ülkelerdeki suşlar ile genetik yakınlıklarının belirlenmesine ve aşuların bu yerel suşları içerecek şekilde üretilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, Türkiye'de Marmara bölgesinde Bulaşıcı Agalaksi hastalığının varlığı bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılmış ve hastalığa neden olan başlıca etkenin *M.agalactiae* olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1.TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU.
<http://tuikapp.tuik.gov.tr/Bolgesel/tabloOlustur.do>(Giriş tarihi: 30 Nisan 2014)
- 2.WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Contagious agalactia Terrestrial Manual, Chapter 2.7.5, 992-997, 2008.
- 3.NICHOLAS RAJ. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. Small Ruminant Research, 45: 145-149, 2002.
- 4.WATSON WA, COTTEW GS, ERDAĞ O, ARISOY F. The pathogenicity of Mycoplasma organisms isolated from seep and goats in Turkey. Journal of Comparative Pathology, 78: 283-291, 1968.
- 5.COTTEW GS, WATSON WA, ARISOY F, ERDAĞ O, BUCKLEY LS.
Differentiation of Mycoplasma agalactiae from other mycoplasmas of sheep and goats. Journal of Comparative Pathology, 78: 275-282, 1968.
- 6.BEŞE M, ARDA M. Koyunlarda *Mycoplasma agalactiae* 'nın İlk İzolasyonu Üzerinde Araştırmalar,1968.
- 7.ÖZDEMİR Ü, TÜRKASLAN J. Bulaşıcı Agalaksi salgınlarından izole edilen Mycoplasma türleri, Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 34: 1-2, 2003.
- 8.ÇETİNKAYA B, KARAHAN M, KALIN R, ATIL E. Türkiyenin doğusundaki ruminant Mikoplazmalının biyoçeşitliliği: Aşı ve kontrol stratejileri için uygulamalar. IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi Bildiri, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, sayfa 9-12, 2010.
- 9.SUBRAMANIAM S,BERGOINER D,POUMARAT F,CAPPAUL 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.
- 10.BASHIRUDDIN JB, FREY J, KONIGSSON MH, JOHANSSON K-E, HOTZEL H, DILLER R, SANTIS DE P, 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. The Veterinary Journal, 169: 268-275, 2005.
- 11.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, 151: 475-489, 2005.
- 12.TOLA S, ANGIO A, ROCCHIGIANI A, IDINI G, MANUNTA D, GALLERI G, LEORI G. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology, 54:17-22,1997.
- 13.MANSO-SILVAN L, DUPUY V, LYSNYANSKY I, OZDEMIR U, THIAUCOURT F . Phlogeny and molecular typing of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by multilocus sequencing. Veterinary Microbiology, 161:104-112, 2012.
- 14.İZGÜR M. Mycoplasma, Ureaplasma, Acheloplasma, Spiroplasma ve erysipelothrix infeksiyonları. Editors: AYDIN N, PARACIKOĞLU J. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar) İlke-Emek Yayınları, Ankara, 293-304, 2006.
- 15.MADANAT M, ZENDULKOVA D, POSPISIL Z. Contagious Agalactia of sheep and goats. A Review, Acta Veterinary Brno, 70: 403-412, 2001.
- 16.NICHOLAS RAJ, AYLING R, MCAULIFFE A. Mycoplasma Diseases of Ruminants: Contagious Agalactia, GBR: Cabı Publishing. UK, page 98-113, 2008.

- 17.MADANAT A, ZENDULKOVA D, LANY P, POSPISIL Z, CIHAL P. Prevalance of *Mycoplasma agalactiae* antibodies in Czech and Jordanian herds of small ruminants. Acta Veterinaria Brno, 71: 37-44, 2002.
- 18.ZENDULKOVA D, BALL HJ, MADANAT A, LANY P, POSPISIL Z: Detection of *Mycoplasma agalactiae* antigen in sheep and goats by monoklonal antibody-based sandwich ELISA Acta Veterinaria Brno, 73, 461-464, 2004.
- 19.BERGONIER D, BERTHELOT X, POUMARAT F.Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. OIE,16: 848-873,1997.
- 20.LEONARD H. Mycoplasmas as pathogens, Pathogenic Mycoplasmas, Elsevier Press, Amsterdam, page 18-28, 1972.
- 21.SARRIS K.Contagious agalactia .In:Frey J. and Sarris K.:Mycoplasmas of ruminants : pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics.EUR 16934,COST,European Commisaion ,European Communities Official Publications Office,Luxemburg,12-15,1996.
- 22.NICHOLAS R.A.J. Contagious agalactia. State Veterinary Journal. 5:13-15,1995.
- 23.NICHOLAS R.A J. Contagious agalactia: Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. EUR 16934,COST, European Commisaion, European Communities Official Publications Office,Luxemburg, page 60-62,1996.
- 24.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.
- 25.SONGER JG, POST KW. The genera Mycoplasma and Ureaplasma. In: Veterinary Microbiology, Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease, chapter 39: 305-317, 2004.
- 26.SCHNEE C, SCHULSSE S, HOTZEL H, AYLING RD, NICHOLAS RAJ, SCHUBERT E, HELLER M, EHRLICH R, SACHSE K. A novel rapid DNA microarray enables identification of 37 mycoplasma species and highlights multiple mycoplasma infectious. Plos One, 1-10, 2012
- 27.BROWNING GF, MAREDA MS, MARKHAM PF, NOORMOHAMMADI AH, WHITHEAR KG. Mycoplasma, Editor: GYLES CL, PRESCOTT JF, SONGER G, THOEN CO, Pathogenesis of Bacterial Infections in Animal, 4. Baskı, Blackwell Publishing, page 549-566, 2010.
- 28.QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR. Clinical Veterinary Microbiology 4th Edition, Mosby International Limited, London, page 320-326, 2000.
- 29.ARDA M. Temel Mikrobiyoloji, 1.baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, sayfa 26-50, 1997.
- 30.CHAMBAUD I,WROBLEWSKI H, BLACHARD A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. Trends in Microbiology, 7: 493-499, 1999.
- 31.RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 1094-1156, 1998.
- 32.CACCIOTTO C, ADDIS MF, PAGNOZZI D, CHESSA B, CORADDUZZA E, CARCANGIU L, UZZAU S, ALBERTI A, PITTAU M. The liposoluble proteome of *Mycoplasma agalactiae*: an insight into the minimal protein complement of a bacterial membrane. BMC Microbiology, 10: 1-12, 2010.

33. THOMPSON CC, VIEIRA NM, VICENTE ACP, THOMPSON FL. Towards a genome based taxonomy of Mycoplasmas. *Infection, Genetics and Evolution*, 11:1798-1804, 2011.
34. CORRALES JC, ESNAL A, FE C, SANCHEZ A, ASSUNÇÃO P. Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68: 156-166, 2007.
35. SIRAND-PUGNET P, LARTIGUE M, MARENDA M, JACOB D, BARRE A, BARBE V, SCHENPWITZ C, MANGENOT S, COULOUX A, SEGURENS B, DE DARUVAR A, BLANCHARD A, CITTI C. Being pathogenic, plastic and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *Plos Genetics*, 3: 74-89, 2007.
36. FREUNDT E. A. Order X. Mycoplasmatales. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th Ed.*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 914-926, 1957.
37. LAMBERT M. Contagious agalactia in sheep and goats. In: *Mycoplasmoses of ruminants. Rev. Sci. Tech. OIE*, 6:699-711, 1987.
38. COTTEW GS. Infections with Molliculates in sheep and goats. Editors: GYRLSTORFF I, ED, VEB GUSTAF F. VERLAG J. In: *Infektonen durch Mycoplasmatales*. Germany, page 368-386, 1985.
39. FREUNDT EA. Culture media for classic mycoplasmas. Editors: TULLY JG, RAZIN S. *Methods in mycoplasmaology*, Academic Press, New York, 2: 127-135, 1983.
40. NICHOLAS RAJ, AYLING R, MCAULIFFE A. *Mycoplasma Diseases of Ruminants: Isolation and Growth of Mycoplasmas from Ruminants*, GBR: Cab International Publishing. UK, page 1-14, 2008.
41. TSAKNAKIS I, KONTOS P, MPOUPTZE E, MEGA A, SARRIS K. Epidemiology studies on contagious agalactia in sheep and goats in Chalkidiki, northern Greece. *Bull. Hellenic Veterinary Medical Society*, 43:250-254, 1992.
42. FLEURY B, BERGONIER D, BERTHELOT X, PETERHANS E, FREY J, VILEI E. Characterization of P40, a Cytadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. *Infection and Immunity*, 70: 5612-5621, 2002.
43. MCAULIFFE L, ELLIS RJ, MILES K, AYLING RD, NICHOLAS RAJ. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*, 152: 913-922, 2006.
44. TOLA S, IDINI G, MANUNTA D, CASCIANO I, ROCCHIGIANI AM, ANGIOI A, LEORI G. Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting, *FEMS Microbiology Letters*, 143: 259-265, 1996.
45. GLEW MD, PAPA ZISI L, POUMARAT F, BERGONIER D, ROSENGARTEN R, CITTI C. Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infection and Immunity*, 68: 4539-4548, 2000.
46. REAL F, DENIZ S, ACOSTA B, FERRER O, POVEDA JB. Caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary-Islands. *Veterinary Record*, 135: 15-16, 1994.
47. SZEREDI L, TENK M, DAN A. Infection of two goatherds with *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in Hungary, evidence of a possible faecal excretion. *Journal of Veterinary Medicine*, 50: 172-177, 2003.
48. GOMEZ-MARTIN A, CORRALES JC, AMORES J, SANCHEZ A, CONTRERAS A, PATERNA A, DE LA FE C. Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in semen. *Theriogenology*, 77: 1252-1256, 2012.

49. AMORES J, GOMEZ-MARTIN A, CORRALES JC, SANCHEZ A, CONTRERAS A, DE LA FE C. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. *Theriogenology*, 75: 1265-1270, 2011.
50. DE LA FE C, GOMEZ-MARTIN A, AMORES J, CORRALES JC, SANCHEZ A, POVEDA JB, CONTRERAS A. Latent infection of male goats with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* at an artificial insemination centre. *The Veterinary Journal*, 186: 113-115, 2010.
51. GIL MC, PENA FJ, MENDOZA JH, GOMEZ L. Genital lesions in an outbreak of Caprine Contagious Agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *Journal of Veterinary Medicine*, 50: 484-487, 2003.
52. BAŞTAN A. İneklerde Meme Hastalıkları, 2. Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, sayfa 45, 2007.
53. CASTRO-ALONSO A, RODRIGUEZ F, DE LA FE C, DE LOS MONTEROS E, POVEDA JB, ANDRADA M, HERRAEZ P. Correlating the immune response with the clinical-pathological course of persistent mastitis experimentally induced by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats. *Research in Veterinary Science*, 86: 274-280, 2009.
54. CASTRO-ALONSO A, DE LA FE C, DE LOS MONTEROS E, RODRIGUEZ F, ANDRADA M, POVEDA JB, HERRAEZ P. Chronological and immunohistochemical characterization of the mammary immunoinflammatory response in experimental caprine contagious agalactia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136: 43-54, 2010.
55. NICHOLAS R, BAKER S. Recovery of Mycoplasmas from Animals. Editors: MILES R, NICHOLAS R, *Methods in Molecular Medicine*, Vol 104, *Mycoplasma Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, page 37- 50, 1998.
56. NICHOLAS RAJ, AYLING R, MCAULIFFE A. *Mycoplasma Diseases of Ruminants: Isolation and Growth of mycoplasmas from ruminants*, GBR: Cabı Publishing. UK, page 3-13, 2008.
57. TULLY JG. Cloning and filtration techniques for mycoplasmas. Editors: TULLY JG, RAZIN S. *Methods in Mycoplasmaology. Mycoplasma Characterization. Vol. I.* New York: Academic Press, pp. 173–177, 1983.
58. RODWELL AW, MITCHELL A. Nutrition, growth and reproduction. Editors: BARILE MF, RAZIN S. *The Mycoplasmas, Vol. 1.* Academic Press, New York, page 103–113, 1979.
59. WALKER RL. Mollicutes. Editors: HIRSH DC, ZEE YC, *Veterinary Microbiology*, 3. Baskı, Blackwell Publishing, Iowa, page 165-172, 1999.
60. POVEDA JB. Biochemical Characteristics in Mycoplasma Identification. In: *Methods in Molecular Biology. Vol. 104: Mycoplasma Protocols*, editors: MILES, RJ, NICHOLAS RA. Humana press Inc., Totowa, NJ. pp. 69-78. 1998.
61. KHAN L, LORIA G, ABU-AMERO K, NICHOLAS RAJ, HALABLAB M, MILES RJ. Distinctive biochemical characteristics of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*. Editors: POVEDA JB, FERNANDEZ A, FREY J, JOHANSSON KE, *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics, Vol.5*, European Commission, Brussels, Belgium, page 60-63, 2001.
62. 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.

63. AL-AUBAIDI JM, DARDIRI AH. Biochemical characterization of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *agalactiae* (Wroblewski) Freundt. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 24: 136-138, 1974.
64. BERGONIER D, BERTHELOT X, POUMARAT F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control, Office International des Epizooties (OIE), 16: 848-873, 1997.
65. MARENDA M S, VILEI E, POUMARAT F, FREY J, BERTHELOT X. Validation of the suppressive subtractive hybridization method in *Mycoplasma agalactiae* species by the comparison of a field strain with the type strain PG2. Veterinary Research 35: 199-212, 2004.
66. POUMARAT F, PERRIN B, LONGCHAMBON D. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). Veterinary Microbiology, 29: 329-338, 1991.
67. SCHERM B, MACRI G, LILLINI E. Comparative study on the identification of Italian Mycoplasma field strains based on immunobinding assay and PCR. Editors: POVEDA J, FERNANDEZ A, FREY J, JOHANSSON KE. Mycoplasmas of Ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Vol. 5, European Commission, Belgium, 2001.
68. BRADBURY JM. Identification of Mycoplasmas by Immunofluorescence. Editors: MILES R, NICHOLAS R, Methods in Molecular Medicine, Vol 104, Mycoplasma Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, page 119-124, 1998.
69. MARKHAM PF, NOORMOHAMMADI AH. Diagnosis of Mycoplasmosis in Animals. Editors: BLANCHARD A, BROWNING G, Mycoplasmas Molecular Biology, Pathogenicity and Strategies for Control, Horizon Bioscience, UK, page 355-369, 2005.
70. MANCHEE RJ, TAYLOR-ROBINSON D. Haemadsorption and haemagglutination by Mycoplasmas, Microbiology, 50: 465-478, 1968.
71. ASSUNÇÃO P, DAVEY HM, ROSALES RS, ANTUNES NT, DE LA FE C, RAMIREZ AS, GALARRETA CMRD, POVEDA JB. Detection of Mycoplasmas in Goat Milk by Flow Cytometry. Cytometry Part A, 71: 1034-1038, 2007.
72. NAGLIC T, HOTZEL H, BALL HJ, SEOL B, BUSCH K. Studies on the Etiology of Caprine Mycoplasmosis in Croatia. Editors: POVEDA J, FERNANDEZ A, FREY J, JOHANSSON KE. Mycoplasmas of Ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Vol. 5, European Commission, Belgium, 2001.
73. HOTZEL H, FREY J, BASHIRUDDIN J, SACHSE K. Detection and Differentiation of Ruminant Mycoplasmas. Editors: SACHSE K, FREY J. Methods in Molecular Biology, Vol. 216: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, page 231-245, 2003.
74. PEPIN M, DUFOUR P, LAMBERT M, AUBERT M, VALOGNES A, ROTIS T, VAN DE WA, BERGONIER D. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of contagious agalactia in sheep. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 15: 281-285, 2003.
75. ASSUNÇÃO P, DE LA FE C, RAMIREZ AS, ANDRADA M, POVEDA JB. Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. Veterinary Record 154: 684-687, 2004.
76. KITTELBERGER R, O'KEEFE JS, MEYNELL R, SEWELL M, ROSATI S, LAMBERT M, DUFOUR P, PEPIN M. Comparison of four diagnostic tests for the identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*. New Zealand Veterinary Journal, 54: 10-15, 2006.

77. JOHANSSON KE, HELDTANDER MUK, PETTERSSON B. Characterization of Mycoplasmas by PCR and Sequence Analysis with Universal 16S rDNA Primers. Editors: MILES R, NICHOLAS R, Methods in Molecular Medicine ,Vol 104, Mycoplasma Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, page 145-163, 1998.
78. MATSSON JG, GERSDORF H, GOBEL UB, JOHANSSON KE. Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA. Molecular and Cellular Probes, 5: 27-35, 1991.
79. TEMİZKAN G, ARDA N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, sayfa 101-102, 2008.
80. DEVRİM K, KAYA N. Polimeraz zincir reaksiyonu. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 10: 209-214, 2004.
81. NICHOLAS RAJ, AYLING R, MCAULIFFE A. Mycoplasma Diseases of Ruminants: Detection of Mycoplasma Species Using Polymerase Chain Reaction (PCR), GBR: Cabı Publishing. UK, page 28-32, 2008.
82. WILSON IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology, 63: 3741-3751, 1997.
83. PINNOW CC, BUTLER JA, SACHSE K, HOTZEL H, TIMMS LL, ROSENBUSCH RF. Detection of *Mycoplasma bovis* in preservative treated milk samples. Journal of Dairy Science, 84: 1640-1645, 2001.
84. HOTZEL H, HELLER M, SACHSE K. Enhancement of *Mycoplasma bovis* detection in milk samples by antigen capture prior to PCR. Molecular and Cellular Probes, 13: 175-178, 1999.
85. ALDEMİR OS, UÇAN US. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Temel Prensipler. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 1: 53-59, 2001.
86. ROUX KH. Optimization and troubleshooting in PCR. Genome Research, 4: 185-194, 1995.
87. TOLA S, IDINI G, MANUNTA D, GALLERI G, ANGIOI A, ROCCHIGIANI AM, LEORI G. Rapid and spesific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology, 51: 77-84, 1996.
88. RAZIN S. The minimal cellular genome of Mycoplasma. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 34: 124-30, 1997.
89. SANCAR GB, SANCAR A, RUPP WD. Sequences of the *E. coli uvrC* gene and protein. Nucleic Acids Research, 12: 4593-608, 1984.
90. SANCAR A. Mechanisms of DNA excision repair. Science, 266: 1954-6, 1994.
91. AMORES J, CORRALES JC, GOMEZ-MARTIN A, SANCHEZ A, CONTRERAS A, DE LA FE C. Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in ear swabs taken from goats. Veterinary Microbiology, 140: 105-108, 2010.
92. AMORES J, DE LA FE C, GOMEZ-MARTIN A, CORRALES JC, CONTRERAS A, SANCHEZ A. Preserved goat milk as a valid sample for the PCR detection of *Mycoplasma agalactiae*. Small Ruminant Research, 99: 61-64, 2011.
93. GRECO G, CORRENTE M, MARTELLA V, PRATELLI A, BUONAVOGLIA D. A multiplex -PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. Molecular and Cellular Probes, 15: 21-25, 2001.
94. LORUSSO A, DECARO N, GRECO G, CORRENTO M, FASANELLA A, BUONAVOGLIA D. A real time PCR assays for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae* DNA. Journal of Applied Microbiology, 103: 918-923, 2007.
95. MCAULIFFE L, ELLIS RJ, AYLING RD, NICHOLAS RAJ. Differentiation of Mycoplasma Species by 16S Ribosomal DNA PCR and Denaturing Gradient Gel

- Electrophoresis Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:4844-4847,2003.
96. STAKENBORG T, VICCA J, BUTAYE P, MAES D, BAERE DE T, VERHELST R, PEETERS J, KRUIF DE A, HAESEBROUCK F, VANEECHOUTTE M. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of *Mycoplasma* species. *BMC Infectious Diseases*, 5: 46, 2005.
 97. WANG H, KONG F, JELFS P, JAMES G, GILBERT GL. Simultaneous Detection and Identification of Common Cell Culture Contaminant and Pathogenic *Mollicutes* Strains by Reverse Line Blot Hybridization. *American Society for Microbiology*, 70:1483-1486, 2004.
 98. AL-MOMANI W, HALABLAB MA, ABO-SHEHADA MN, MILES K, MC AULIFFE, NICHOLAS RAJ. Isolation and molecular identification of small ruminant mycoplasmas in Jordan. *Small Ruminant Research*, 65:106-112, 2006.
 99. MC AULIFFE, ELLIS RJ, LAWES JR, AYLING RD, NICHOLAS RAJ. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 731-739, 2005.
 100. LORIA G, SAMMARTINO C, NICHOLAS R, AYLING R. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin enrofloxacin, spiramycin and lincomycin- spectinomycin. *Research in Veterinary Science*, 75: 3-7, 2003.
 101. 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.
 102. GARNICA MLD, ROSALES RS, GONZALO C, SANTOS JA, NICHOLAS RAJ. Isolation, molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of isolates of *Mycoplasma agalactiae* from bulk tank milk in an endemic area of Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 114: 1575- 1581, 2013.
 103. ANTUNES NT, TAVIO MM, ASSUNÇÃO P, ROSALES RS. POVEDA C, DE LA FE C, GIL MC, POVEDA JB. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*. *Veterinary Journal*, 177: 436-438, 2008.
 104. HANNAN PCT. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Veterinary Research*, 31: 373-395, 2000.
 105. ÖNAT K, TEMİZEL EM, GÖÇMEN H, MECİTOĞLU Z, KASAP S, ÜLGEN M. *Mycoplasma agalactiae* ile Doğal Enfekte bir Keçi İşletmesinde Tylosinin Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30: 13-16, 2011.
 106. TEMİZEL EM, ONAT K, MECİTOĞLU Z, KASAP S, GOCMEN H, ULGEN M. Effects of levamisole and ranitidine on antibody-forming responses induced by killed *Mycoplasma* vaccine antigens in Saanen goats. *Veterinary Record*, 171: 597, 2012.
 107. TURKASLAN J. Control of important mycoplasma diseases in Turkey with special emphasis on CCPP and contagious agalactia. *International Organization Mycoplasma Letters*, 1: 184-185, 1990.
 108. FE C, ASSUNÇÃO P, SAAVEDRA P, TOLA S, POVEDA C, POVEDA JB. Field trial of dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. *Vaccine*, 25: 2340-2345, 2007.

109. AGRIMI U, RU G, CARDONE F, POCCHIARI M, CARAMELLI M. Epidemic of transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *Lancet*, 353: 560-561, 1999.
110. LEON VIZCAINO L, GARRIDO ABELLAN F, CUBERO PABLO MJ, PERALES A. Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. *Veterinary Record*, 137: 266–269, 1995.
111. PEPIN M, SANCHIS R, ABADIE G, LAMBERT M, DUFOUR P, GUIBERT JM. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using an inactivated vaccine. In: Poveda, J.B., Fernandez, A., Frey, J. and Johansson, K.-E. (eds) *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5. European Commission, Brussels, page 162–165, 2001.
112. GIL MC, HERMOSA DE MENDOZA M, REY J, ALONSO JM, POVEDA JB, HERMOSA DE MENDOZA J. Aetiology of caprine contagious agalactia syndrome in Extremadura, Spain. *Veterinary Record*, 144: 24–25, 1999.
113. TOLA S, MANUNTA D, ROCCA S, ROCCHIGIANI MA, IDINI G, ANGIOI P, LEORI G. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine*, 17: 2764-2768, 1999.
114. AGNONE A, MANNA ML, SIRECI G, PULEIO R, USTICANO A, OZDENIR U, NICHOLAS RAJ, CHIARACANE V, DIELI F, MARCO VD, LORIA GR. A comparison of the efficacy of commercial and experimental vaccines for contagious agalactia in sheep. *Small Ruminant Research*, 112: 230-234, 2013.
115. GRECO G, BUONAVOGLIA CM, ALIBERTI A, FASANELLA A. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *Microbiologica*, 25: 17-20, 2002.
116. BUONAVOGLIA CM, GRECO G, CORRENTE M, GRECO MF, D'ABRAMO M, LATRONICA F, FASANELLA A, DECARO N. Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. *Research in Veterinary Science*, 88: 16-19, 2010.
117. RAMIREZ AS, DE LA FE C, ASSUNCAO P, GONZALEZ M, POVEDA JB. Preparation and evaluation of an inactivated polyvalent vaccine against *Mycoplasma* spp. on infected goats. In: Poveda, J.B., Fernandez, A., Frey, J. and Johansson, K.-E. (eds) *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5. European Commission, Brussels, page 154–155, 2001.
118. SANTONA A, CARTA F, FRAGHÌ P, TURRINI, F. Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the use of synthetic peptides. *Infection and Immunity* 70: 171–176, 2002.
119. KINDE H, DAMASSA AJ, WAKENELL PS, PETTY R. *Mycoplasma* infection in commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6: 423-427, 1994.
120. ABTİN AR, POURBAKHSH SA, ASHTARI A, BAYATZADEH MA, BARANI SM, AHANGARAN S. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and polymerase chain reaction (PCR) from sheep of Qom province. *Archives of Razi Institute*, 68: 11-16, 2013.
121. DE LA FE C, ASSUNCAO P, ANTUNES T, ROSALES RS, POVEDA JB. Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *The Veterinary Journal*, 170:257–259, 2005.

- 122.KILIC A, KALENDE H, EROKSUZ H, MUZ A, TAŞDEMİR B. Identification by culture, PCR and immunohistochemistry of mycoplasmas and their molecular typing in sheep and lamb lungs with pneumonia in Eastern Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 45: 1525-1531, 2013.
- 123.ONGOR H, KALIN R, ACIK MN. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* from Goats with Nasal Discharge by Culture and Polymerase Chain Reaction. *Pakistan Veterinary Journal*, 31: 244-248, 2011.
- 124.GOLTZ JP, ROSENDAL S, MCCRAW BM, RUHNKE HL. Experimental Studies on the Pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the Respiratory Tract of Goats. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50: 59-67, 1986.
- 125.LIN YC, MILES RJ, NICHOLAS RAJ, KELLY DP, WOOD AP. Isolation and immunological detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in sheep with atypical pneumonia, and lack of a role for *Mycoplasma arginini*. *Research in Veterinary Science*, 84: 367-373, 2008.
- 126.POVEDA J B, NICHOLAS RA. Serological Identification of Mycoplasmas by Growth and Metabolism Inhibition Tests. Editors: MILES RJ, NICHOLAS RAJ. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 104: Mycoplasma Protocols,. Humana press , Totowa, New Jersey, page 105-112, 1998.
- 127.CETINKAYA B, KALIN R, KARAHAN M, ATIL E, MANSO-SILVAN L, THIAUCOURT F. Detection of contagious caprine pleuropneumonia in East Turkey. *World Organisation for Animal Health*, 28: 1037-1044, 2009.
- 128.BASHIRUDDIN JB. Extraction of DNA from Mycoplasmas. Editors: MILES R, NICHOLAS R, *Methods in Molecular Medicine*, Vol 104, Mycoplasma Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, page 141-144, 1998.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca akademik bilgilerini benimle paylaşan ve benimde bu yolda sağlam adımlarla ilerlememi sağlayan, desteklerini benden esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr.Mihriban ÜLGEN'e ve yetişmemde büyük emekleri olan Anabilim Dalımızın değerli Öğretim Üyeleri Prof.Dr.Tayfun ÇARLI, Prof. Dr.Ayşin ŞEN, Prof. Dr.Cengiz ÇETİN, Yard.Doç.Dr. Esra BÜYÜKCANGAZ ve Yard.Doç.Dr. Serpil KAHYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Burak MAT, Araş. Gör. Emel BIYIKLI, Araş. Gör. Mohammed KHIDER, Dokt. Öğr. Özge YILMAZ'a ve çalışmam boyunca yardımlarını gördüğüm Tekn. Ayşe UYAR ve Tekn.Özlem ÇİÇEK'e desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Mikoplazma Laboratuvarı Bölüm Şefi Dr.Ümit ÖZDEMİR'e ve İngiltere'de Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Mycoplasma Grubuna ve Grup Şefi PhD. Roger D. AYLING'e ve çalışmalarımda beni yalnız bırakmayıp yanımda olan Dr. Kaan ÖNAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Akademik ilerlememde en büyük destekçim olan ve engin bilgileri ile bana ışık tutan teyzem Prof. Dr. Jale ERDEĞER' e, her zaman ve her koşulda yanımda olup maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen, başarılarımla gurur duyan annem Handan GÖÇMEN'e ve babam Ali Bülent GÖÇMEN'e, dünyaya gözlerimi birlikte açtığım ikiz kardeşim Huş GÖÇMEN'e teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZGEÇMİŞ

13/06/1984 tarihinde Bartın'da doğdum. 1998 yılında Bartın Hendekyanı Ortaokulun'dan ve 2002 yılında Bartın Davut Fırıncıoğlu Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. 2003 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi'nde eğitimime başladım ve 2005-2006 yıllarında Erasmus Öğrenci Değişim Programı ile Kosice'de The University of Veterinary Medicine and Farmacy'de 3.sınıfımı tamamladım. 2008 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi'nden mezun oldum. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladım. 2009 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na yatay geçiş yaptım ve 2011 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım.