

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

**ATLARDA *RHODOCOCCUS EQUI* VARLIĞININ PCR İLE
ARAŞTIRILMASI VE ANTİMİKROBİYEL
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Elif Oya ORAL
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-16016 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çerçevesinde Elif Oya ORAL tarafından hazırlanan “**Atlarda *Rhodococcus equi* Varlığının PCR ile Araştırılması ve Antimikrobiyel Duyarlılıklarının Belirlenmesi**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: ../03/2019

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Şükrü KIRKAN ADÜ

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca bana bilgi ve tecrübelerini özveriyle aktaran, yetişmemde büyük katkıları olduğuna inandığım değerli Hocam Prof. Dr. Şükrü KIRKAN ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, tüm öğretim hayatım boyunca bana eğitim, ilham ve destek veren annem Yelda ORAL ve babam Aydoğan ORAL'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Rhodococcus</i> Cinsi	3
2.2. <i>R. equi</i> 'nin Taksonomisi	6
2.3. <i>R. equi</i> Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	8
2.4. <i>R. equi</i> Mikroskopik Morfoloji ve Boyama Özellikleri	12
2.5. Diğer Belirleyici Özellikler	13
2.6. Epidemiyoloji	13
2.7. <i>R. equi</i> 'de Hücre Biyolojisi ve Patogenez	16
2.7.1. Virülens Plazmidi	22
2.7.1.1. ORF8 ve ORF4	25
2.7.1.2. Diğer ORF'ler	26
2.7.2. Virülens Plazmidi Gen Ekspresyon Regülasyonu	27
2.8. Bağışıklık	28
2.8.1. <i>R. equi</i> ve Fagositik Hücre Etkileşimleri	28
2.8.2. Antikor Kaynaklı Bağışıklık	29
2.8.3. Hücresel Bağışıklık	30
2.8.4. Yeni Doğan Tayların Bağışıklığı	31
2.9. Klinik Bulgular	32
2.10. Tanı	34
2.10.1. Sitoloji	35
2.10.2. Kültür	35
2.10.3. Nükleik Asit Amplifikasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36

2.10.4. Serolojik Testler	37
2.10.5. Yardımcı Tanı testleri	38
2.10.5.1. Klinik Patoloji	38
2.10.5.2. Tanısal Görüntüleme	39
2.10.5.3. Patolojik Bulgular	40
2.11. Tedavi	41
2.11.1. Rifampin ve Makrolitler	42
2.12. Koruma Kontrol.....	44
2. 12.1. Erken Teşhis İçin Taramalar	44
2.12.2. Pasif İmmünizasyon	46
2.12.3. Kemoflaksi	47
2.12.4. Aşılama	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1. Gereç	50
3.1.1. Örnekler	50
3.1.2. Kullanılan Besiyeri	50
3.1.2.1. <i>R. equi</i> selektif NANAT Besi yeri.....	50
3.1.2.2.TSA (Tryptic Soy Agar).....	51
3.1.3. Kullanılan Kimyasal/Solüsyonlar.....	51
3.1.3.1. TBE(Tris, BorikAsit, EDTA, pH: 8,0) Buffer	51
3.1.3.2. Jel Loading Buffer(6X)	52
3.1.3.3. Tris(1M)	52
3.1.3.4. TE Buffer(10mM tris, 1mM EDTA)	52
3.1.3.5. ExPrime Taq Premix(2X) (GeNet Bio®)	52
3.1.4. DNA Ekstrasyon Kiti	52
3.1.4.1. Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification Kit Prosedürü.....	52
3.1.5. Primerler	53
3.1.6. Agaroz Jel Hazırlanışı	53
3.1.7. Marker	53
3.1.8. Ethidium Bromid	54
3.1.9. Standart Suş	54
3.1.10. Antibiyotikler	54
3.1.10.1. Antibiyotik Sulandırmaları	54
3.1.11. Kullanılan Cihazlar.....	54

3.2. Yöntem	55
3.2.1. Örneklerin Toplanması	55
3.2.2. Fenotipik İzolasyon ve İdentifikasyon	55
3.2.3. Genotipik İdentifikasyon	55
3.2.3.1. PCR.....	55
3.2.3.1.1. <i>Rhodococcus equi</i> 16S rRNA PCR Aşaması	55
3.2.3.1.2. <i>Rhodococcus equi vapA</i> ve <i>vapB</i> gen varlığının belirlenmesi.....	56
3.2.4. Antibiyogram.....	57
3.2.4.1. Bakteri İnokulumun Hazırlanması	57
3.2.4.2. Broth Mikrodilüsyon	57
4. BULGULAR	59
4.1. Fenotipik Bulgular	59
4.2. PCR Bulguları	60
4.3. Antibiyogram Sonuçları	62
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
7. KAYNAKLAR	73
8. ÖZGEÇMİŞ	99

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACVIM	: Amerikan Veteriner İç Hastalıklar Üniversitesi
AST	: Antimikrobiyel Duyarlılık Testi
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
CBC	: Tam Kan Sayımı
CLSI	: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CR	: Komplement Reseptör
CTL	: Sitotoksik T Lenfosit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünozorban Test
EPD	: Ekstra Pulmonar Hastalıklar
HIP	: Hiperimmün Plazma
IgG	: İmmünglobulin G
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sintaz
LAMP1	: Lizozim İlişkili Membran Protein1
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MR	: Mannoz Reseptör
NK	: Doğal Öldürücü
NOI	: Reaktif Nitrojen Araürünleri
NRAMP1	: Doğal Direnç İlişkili Makrofaj Protein 1
NSF	: N-Etilmaleimid Hassas Füzyon Protein
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PCB	: Poliklorlu Bifenil
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
REFP	: <i>Rhodococcus equi</i> Tay Pnömonisi
ReqLAM	: <i>R. equi</i> Lipoarabinomannan
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROI	: Reaktif Oksijen Araürünleri
SNAP	: Çözünebilir NSF Bağlantı Protein
SNARES	: SNAP Reseptör
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
TBA	: Trakeobronşial Aspirasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Rhodococcus equi</i> Hücre Biyolojisi	17
Şekil 2. <i>Rhodococcus equi</i> İçeren Vakuol	19
Şekil 3. <i>Rhodococcus equi</i> Virülens Plazmidi	23
Şekil 4. Örneklem Yaş Grupları	50
Şekil 5. <i>R. equi</i> Antibiyogram Sonuçları.....	65



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. <i>R. equi</i> koloni morfolojisi	9
Resim 2. <i>R. equi</i> faktörleri	10
Resim 3. <i>R. equi</i> ultrastrüktürel morfoloji	12
Resim 4. NANAT besiyerinde üreyen <i>R. equi</i> kolonileri	59
Resim 5. 16S rRNA elektroforez görüntüsü	60
Resim 6. <i>vapA</i> elektroforez görüntüsü	60



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Rhodococcus</i> Türleri	5
Tablo 2. <i>R. equi</i> Sinonimleri	8
Tablo 3. <i>R. equi</i> Biyokimyasal Karakteristikleri	11
Tablo 4. <i>R. equi</i> Virülensle İlişkili Genler	24
Tablo 5. <i>R. equi</i> Virülensle İlişkili Olmayan Genler	25
Tablo 6. <i>R. equi</i> Primerleri	53
Tablo 7. <i>R. equi</i> 16S rRNA PCR İşlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	56
Tablo 8. <i>R. equi vapA, vapB</i> PCR İşlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	57
Tablo 9. Örneklerin Gram boyama ve biyokimyasal özellikleri	59
Tablo 10. <i>R. equi</i> PCR Sonuçları	61
Tablo 11. <i>R. equi</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirten MIC değerleri	63
Tablo 12. <i>R. equi</i> MIC Standartları	64
Tablo 13. <i>R. equi</i> Antibiyogram Sonuçları	64

ÖZET

ATLARDA *RHODOCOCCLUS EQUI* VARLIĞININ PCR İLE ARAŞTIRILMASI VE ANTİMİKROBİYEL DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Oral E.O. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Aydın, 2019.

Rhodococcus equi hem çeşitli hayvan türlerinde hem de insanlarda; pulmoner ve ekstrapulmoner piyogranulomatöz enfeksiyon oluşturabilen ve toprakta bulunan patojen bir bakteridir. Veteriner hekimlikte önemini genç tayların hastalığa özellikle duyarlı olması ve *Rhodococcus equi* pnömonisinin tanı, koruma ve tedavi yöntemlerinin istenilen düzeyde geliştirilememiş olması nedeniyle oluşturduğu ekonomik kayıplardan almaktadır.

Çalışmamızda, 0-5 aylık 90 taydan alınan nazal svap numunelerinde *Rhodococcus equi* etkeni varlığının hem bakteriyolojik hem moleküler olarak araştırılması ve *Rhodococcus equi* izolatlarının antimikrobiyel duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Örneklerin 10 (%11,1)'undan otomatize identifikasyon sistemi ile *Rhodococcus equi* identifiye edilmiştir. İzolatlar 16S rRNA PCR ile moleküler olarak doğrulanmıştır. Araştırmamızda identifiye edilen 10 *Rhodococcus equi* izolatının 2 (%20)'sinde *vapA* geni varlığı ortaya çıkarılmıştır. *Rhodococcus equi* izolatlarına yapılan antibiyogram testi sonucunda, 10 *Rhodococcus equi* izolatının 4 (%40)'ünün 11 antibiyotiğe çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

At yetiştirme çiftliklerinde kontrol amaçlı ultrasonografik taramalar sonrası uygulanan antibiyotik tedavileri sonucu, makrolid ve rifampin dirençli *Rhodococcus equi* suşlarının dünya genelinde görülme sıklığı artmaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, makrolid ve rifampin dirençli *Rhodococcus equi* suşlarının varlığını bir kere daha ortaya koymuştur.

Araştırmamız sonucunda, antibiyotik dirençli *Rhodococcus equi* suşlarının oluşturduğu tehdide karşı, uygulanması kolay, maaliyeti düşük ve tanı değeri yüksek yeni metotların geliştirilmesi, dirençlilikle ilgili gen ekspresyonlarının daha iyi anlaşılması, dirençli suşların spesifik antijenik özelliklerin belirlenmesi ve hastalıktan korunmada etkili immunizasyon tekniklerinin geliştirilmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tay Pnömonisi, *Rhodococcus equi*, PCR, *vapA*, Antimikrobiyel Duyarlılık

ABSTRACT

DETECTION OF *RHODOCOCCUS EQUI* BY PCR FROM FOALS AND DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY

Oral E.O. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Microbiology Dept, PhD Thesis, Aydın, 2019.

R. equi is a pathogenic soil actinomycete that causes pulmoner and/or extrapulmoner pyogranulomatous disease in many animal species as well as humans. Its importance in veterinary medicine comes from young foals being highly susceptible to this pathogen and the economic loss it generates due to techniques such for screening, prevention, immunization and treatment of *Rhodococcus equi* foal pneumonia are yet not developed well enough.

In this research, we aimed to study the presence of *R. equi* both with bacteriological and molecular techniques in 90 nasal swab samples collected from foals aged between 0-5 months and to determine the antimicrobial susceptibility of those isolates. 10 out of 90 samples (11,1%) were identified as *R. equi* with automated identification system. Molecular confirmation for identification of those isolates with 16S rRNA spesific PCR has been performed. 2 out of 10 20(%) *R. equi* isolates were found to be positive for *vapA* gene. 4 out of 10 isolates (40%) were found to have multi drug resistance after the anibiogram that has been performed against 11 antimicrobial agents.

The *R. equi* strains that show resistance to both macrolides and Rifampin is increasing world wide due to the increased application of those antibiotics in many breeding farms based on the results of routine ultrasonographic screenings. Findings in this study exhibits the presence of those resistant strains one more time.

Concluding our study, development of a diagnostic technique which is labor, time and cost friendly and also has high diagnostic value, better understanding of expression of genes related to resistance, antigenic spesifications of resistant strains, development of effective immunization techniques can be suggested fields of studies against the threat of resistant strains of *R. equi*.

Key words: Foal Pneumonia, *Rhodococcus equi*, PCR, *vapA*, Antimicrobial Susceptibility

1. GİRİŞ

Pnömoni, taylarda hastalığa ve ölümlere sebebiyet veren önemli nedenlerdendir. Taylarda pnömoneye neden olan birçok farklı organizma tespit edilmiş olsa da, *Rhodococcus equi* taylarda oluşan şiddetli pnömonilerin en önemli etkeni olarak kabul edilir (Cohen ve ark, 2002). *R. equi* pnömoneisi prevalans ve letalite oranının sıklıkla yüksek olması, etkili bir erken teşhis ve koruma yönteminin olmayışı, tedavinin uzun süreli ve yüksek bütçeli olması (endemik yetiştirme çiftliklerinde sıklıkla profilaktik antibiyotik kullanımı) tay iyileşse bile gelecekteki atletik performansının olumsuz etkilenebilmesi ve endemik olarak görüldüğü çiftliklerin müşteri kaybetmesi nedenleriyle at endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara yol açan önemli enfeksiyöz hastalıklardan biridir (Ainsworth DM, 1997; Cohen ve ark, 2002; Vazquez-Boland, 2010).

1-6 aylık taylarda gelişen *R. equi* pnömoneisinde, klinik belirtiler genellikle 4 aylıktan genç taylarda görülür (Giguère ve Prescott, 1997). Kronik granülatöz pnömone ve akciğer apselerine neden olan *R. equi* fakültatif intraselüler, Gram pozitif, aerobik, hareketsiz, sporsuz bir kokobasildir (Prescott, 1991). İlk olarak 1923 senesinde Magnusson tarafından İsveç'teki taylardan izole edilen bu bakteri, dünya genelinde bir yayılma gösterir ve sıklıkla toprak ve diğer çevresel numunelerden izole edilebilir (Takai ve ark, 1991). Domuzların servikal lenf yumrularından sıklıkla izole edilen bu bakteri, seyrek olarak insanlar ve diğer birçok memeli türünde immunosupresyonu takiben enfeksiyon oluşturabilir. Nadir görülen bu vakalarda enfeksiyon; akciğer apselerine dönüşen granülatöz pnömone, lenfadenitis (mezenterik, bronşial ya da servikal lenf yumruları), enfekte yaralar ve vücudun farklı bölgelerinde apselerle şekillenir (Prescott, 1991).

Rhodococcus cinsinde görüldüğü gibi, *R. equi*'nin patojenitesi plazmidlere bağlıdır. Çevresel *Rhodococcus*'larda plazmidlerde kodlanan fonksiyonlar genelde katabolik olsa da, *R. equi* de plazmidler konağa kolonizasyonu sağlar (von Bargen ve Haas, 2009; Vazquez-Boland ve ark, 2013). Patojenitesi ve makrofajlar içinde çoğalabilme kabiliyeti, yaklaşık 85-90 kb'lık (Takai ve ark; 1991, 1999, 2000) büyük bir plazmidin varlığına bağlıdır. Patojenite, bu plazmidin horizontal gen transferi ile edinilmiş Patojenite Adası (PAI-Pathogenity Island) bölgesinde bulunan Virülens İlişkili Proteinler (Vap-Virulence Associated Proteins) tarafından düzenlenir. Bu ada üzerinde kodlanan 10 adet Vap; VapA, VapB, VapC, VapD, VapE, VapF, VapG, VapH, VapI ve VapX olarak tanımlanmıştır (Letek ve ark, 2008). Bu proteinler arasından VapA, taylarda bakteriyel patojenite için şarttır (Coulson ve ark, 2010; Valero-Rello

ve ark, 2015). PAI *vap* genlerinin yanısıra, bir takım *vap* olmayan genleri de barındırır. Bu genlerden vir operonu, PAI'nın ekspresyonunu aktif hale getiren virR ve virS regülatörlerini barındırır (Ren ve Prescott, 2003; Russel ve ark, 2004, Byrne ve ark, 2007). Virülans plazmid ayrıca konak seçiciliğinde de rol oynar. Günümüze kadar 3 adet konak spesifik plazmid belirlenmiştir. Dairesel pVAPA at izolatlarıyla; dairesel pVAPB domuz izolatlarıyla ve lineer plazmid pVAPN sığır izolatlarıyla ilişkilendirilmiştir (Valero-Rello ve ark, 2015). Her üç tip plazmidin de insan izolatlarında görülmesi (Ocampo-Sosa ve ark, 2007), insanların *R. equi* için opportunist bir konak olması ve enfeksiyonun zoonoz kaynaklı olmasıyla örtüşmektedir.

Çalışmamızda taylarda *R. equi*'nin varlığının konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması, izolatların antimikrobiyel duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Rhodococcus* Cinsi

Rhodococcus cinsi, dünyadaki en büyük mikrobiyel gruplardan olan Aktinobakteriler grubuna dahildir. Bu grup, antibiyotik ve klinik olarak etkili bazı ikincil metabolitleri üreten yararlı bakterileri içerdiği gibi, tüberküloz, lepra ve difteriye neden olan patojen bakterileri de içerir. Toprak, su ve ökaryotik hücrelerde bulunup, doğada ve çevrede çok geniş ölçüde yayılım gösterirler. Aerobik, sporsuz, hareketsiz ve Gram pozitif özellikte olan bu cins, *Mycobacterium* ve *Corynebacterium* ile yakından bağlantılıdır. Olağanüstü metabolik çok yönlülükleri ve biyodegradatif özellikleri nedeniyle biyoteknolojik olarak büyük önem taşırlar (Vazquez-Boland, 2010). Hem mezofilik (Lichtinger ve ark, 2000), hem psikrofilik (Patrauchan ve ark, 2005) ortamlarda üreyebilirler. Hem mikroaerofilik hem aerofilik solunum gerçekleştirebilirler (Fuller ve ark, 2010). *Rhodococcus sp.* RHA1 gibi bazı türler 9.7 megabazçiftlik büyük genoma sahiptir (McLeod ve ark, 2006).

Rhodococcus suşları önemlerini öncelikle geniş bir yelpazedeki bileşikleri katabolize edebilmelerine, biyoaktif steroidler, akrilamid, akrilik asit üretebilmelerine ve fosil yakıt biyodesülfürizasyonuna katkılarına borçludurlar. Bu genetik ve katabolik çeşitlilikleri büyük bakteriyel kromozomların yanı sıra üç büyük lineer plazmid içermeleri nedeniyledir. Basit gelişim süreçleri ve hızlı büyüme yetenekleri ayrıca *Rhodococcus* cinsini deneysel olarak avantajlı hale getirir (McLeod ve ark, 2006).

Rhodococcus cinsinin diğer bir önemi biyodönüşümden kaynaklanır. Tolüen, naftalin, zararlı ot öldürücüler ve Poliklorlu Bifenil (PCB) ler gibi zararlı çevresel kirleticileri metabolize edebilirler. *Rhodococcus* türleri aromatik substratları genellikle aromatik halkalarını oksijenize edip diol oluşturarak metabolize ederler. Daha sonra bu halka intra ve ekstra diol mekanizmalarıyla açılıp substratı daha fazla metabolizmaya maruz bırakır.

Rhodococcus'un hidrofobik yüzeyi hidrokarbonların yapışması için uygun bir ortam oluşturur ve böylelikle bu organik kirleticileri ayrıştırabilir. İnatçı, toksik hidrokarbon kirleticileri, geniş yelpazedeki katabolik yolları ve eşsiz enzim fonksiyonları ile ayrıştırabilirler. Buna örnek olarak saldığı dioksijenaz ile benzo trifloridi ayrıştırması verilebilir (Yano ve ark, 2015). *Rhodococcus sp.* Q1 suşu, doğal olarak toprakta ve kağıt fabrikası atıklarında bulunur, quinolin, çeşitli piridin türevleri, kateşol, benzoat, ve protokateşik asiti ayrıştırma yeteneğine sahiptir (O'Loughlin ve ark, 1996). *Rhodococcus* ayrıca radyoaktif sezyum gibi ağır metal

iyonlarını biriktirme yeteneğiyle bu maddelerin çevreden daha kolay arınımlarını sağlar (Takai ve ark, 2014).

Rhodococcus türleri ayrıca DNA ekstraksiyon kit reaktiflerinin ve ultra saf su sistemlerinin bir kontaminantı olarak, mikrobiyota ve metagenomik analiz setlerinde hatalı bulunabilir (Salter ve ark, 2014). *Rhodococcus* türlerinin tarihsel gelişimi Tablo 1’de gösterilmektedir.



Tablo 1. *Rhodococcus* türleri

Tür adı	Kaynak
<i>Rhodococcus aerolatus</i>	Hwang ve ark, 2015
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	Goodfellow ve ark, 2004
<i>Rhodococcus agglutinans</i>	Guo ve ark, 2015
<i>Rhodococcus aurantiacus</i>	ex Tsukamura ve Mizuno, 1971
<i>Rhodococcus artemisiae</i>	Zhao ve ark, 2012
<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	Li ve ark, 2004
<i>Rhodococcus biphenylivorans</i>	Su ve ark, 2015
<i>Rhodococcus equi</i>	Magnusson, 1923
<i>Rhodococcus canchipurensis</i>	Nimaichand ve ark, 2013
<i>Rhodococcus cerastii</i>	Kämpfer ve ark, 2013
<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	Li ve ark, 2012
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Rowbotham ve Cross, 1979
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	Serrano ve ark, 1972
<i>Rhodococcus defluvii</i>	Kämpfer ve ark, 2014
<i>Rhodococcus electrodiphilus</i>	Ramaprasad ve ark, 2018
<i>Rhodococcus enclensis</i>	Dastager ve ark, 2014
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Gray ve Thornton, 1928
<i>Rhodococcus fascians</i>	Tilford, 1936
<i>Rhodococcus globerulus</i>	Goodfellow ve ark, 1985
<i>Rhodococcus gordoniae</i>	Jones ve ark, 2004
<i>Rhodococcus hoagie</i>	Kämpfer ve ark, 2014
<i>Rhodococcus imtechensis</i>	Ghosh ve ark, 2006
<i>Rhodococcus jialingiae</i>	Wang ve ark, 2010
<i>Rhodococcus jostii</i>	Takeuchi ve ark, 2002
<i>Rhodococcus koreensis</i>	Yoon ve ark, 2000
<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	Mayilraj ve ark, 2006
<i>Rhodococcus kunmingensis</i>	Wang ve ark, 2008
<i>Rhodococcus kyotonensis</i>	Li ve ark, 2007
<i>Rhodococcus maanshanensis</i>	Zhang ve ark, 2002
<i>Rhodococcus marinonascens</i>	Helmke ve Weyland, 1984
<i>Rhodococcus olei</i>	Chaudhary ve Kim, 2018
<i>Rhodococcus opacus</i>	Klatte ve ark, 1995
<i>Rhodococcus percolates</i>	Briglianve ark, 1996
<i>Rhodococcus phenolicus</i>	Rehfuss ve Urban, 2006
<i>Rhodococcus polyvorum</i>	Li ve ark, 2012
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	Yoon ve ark, 2000
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	Xu ve ark, 2007
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Zopf, 1891
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	Goodfellow ve Alderson, 1979

Tür adı	Kaynak
<i>Rhodococcus ruber</i>	Kruse, 1896
<i>Rhodococcus soli</i>	Li ve ark, 2015
<i>Rhodococcus triatomae</i>	Yassin, 2005
<i>Rhodococcus trifolii</i>	Kämpfer ve ark, 2013
<i>Rhodococcus tukisamuensis</i>	Matuyama ve ark, 2003
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	Goodfellow ve ark, 1995
<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	Zhang ve ark, 2005
<i>Rhodococcus zopfii</i>	Stoecker ve ark, 1994

Majidzadeh ve Fatahi- Bafghi (2018)'den modifiye edilmiştir.

Rhodococcus cinsi içinde iki patojen türü barındırır: *R. fascians* ve *R. equi*. *R. fascians* hem açık tohumlu hem de kapalı tohumlu bitkilerde yaprak galeri hastalığı meydana getirir. Patojenitesini lineer bir plazmidten alır. Özellikle tütün bitkisini etkiler ve tarım alanında ekonomik kayıplara neden olur (Goethals ve ark, 2001). *R. equi* domuzlarda, sığırlarda ve immunsupresif insanlarda sporadik olarak enfeksiyona neden olabilirken asıl önemini taylarda neden olduğu pnömoniyle yarattığı büyük ekonomik kayıplardan alır ve dünya genelinde yetiştirme çiftliklerinde yayılım gösterir.

2.2. *R. equi*'nin Taksonomisi

Rhodococcus (kırmızı pigmentli koklar) cinsi, bünyesinde *Caseobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Tsukamurella* cinslerini de bulunduran Nokardiyoform aktinomisetler filogenetik grubuna aittir (Prescott, 1991).

Günümüzde Veteriner Hekimler ve araştırmacılar tarafından yaygın olarak *Rhodococcus equi* olarak adlandırılması tercih edilen patojenin orjinal klasifikasyonu ve isimlendirilmesi 1923 senesinde Magnusson tarafından *Corynebacterium equi* olarak yapılmıştır. Yeni alternatif isimlerin de dolaştığı birkaç on senelik taksonomik karışıklıktan sonra, bakterinin *Rhodococcus* cinsi içerisinde *R. equi* olarak yeniden klasifikasyonuyla stabilite sağlanmıştır (Goodfellow ve Alderson, 1977). Önemli olarak, *R. equi* "Approved Lists of Bacterial Names" listesinde yer almıştır (Skerman ve ark, 1980). Buna rağmen, Goodfellow ve Alderson'un (1977) çalışmaları akabinde *Rhodococcus equi* standart suşunun, 1912 yılında Morse ve 1918 yılında Eberson tarafından isimlendirilen *Corynebacterium hoagii* standart suşuyla aynı türde sınıflandırılması gerektiği ortaya çıkmıştır (Goodfellow ve ark, 2015). *C. hoagii* ve *R. equi*'nin aynı tür olduğu Kämpfer ve ark (2014) tarafından da doğrulanmıştır. *C. hoagii*'nin standart suşu ilk olarak Morse tarafından 1912 senesinde izole edilip tanımlanmış, bu isim ayrıca "Approved Lists of

Bacterial Names” listesine dahil edilmiştir. Buna göre hem *C. hoagii* hem de *R. equi* geçerli isimler olmakla birlikte, *hoagii* (1912) ismi *equi* (1923) ismine oranla daha eskidir ve bu nedenle üstündür. Bu nedenle *R. equi*'nin *Rhodococcus hoagii* olarak tekrar adlandırılması resmi olarak teklif edilmiş (Kämpfer ve ark, 2014) ve bu isim kabul edilerek bildiri listesinde yayınlanmıştır (Oren, 2014).

Tür ismini düzeltme sorunu haricinde, cins ismine ait diğer komplikasyonlar da ortaya çıkmıştır. Jones ve arkadaşları (2013a, 2013b) *R. equi*'nin farklı bir cins olan *Prescottella* içinde *Prescottella equi* comb. nov. olarak sınıflandırılmasını teklif etmişlerdir. *R. equi* camiasının içindekiler bu teklife sıcak bakmasalar da yeni sınıflandırma moleküler, filogenetik ve numerik taksonomik data tarafından kuvvetli olarak desteklenmektedir (Jones ve ark, 2013a). Aynı çalışma grubunun, ICSP (International Committee for Systematics of Prokaryotes) o dönemki başkanı ve IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) editörü ile 2013 senesinde yaptıkları yazışmalar neticesinde tür adıyla ilgili problemler (*equi* vs *hoagii*) çözülmeyen, cins adıyla ilgili çözümlere girilmemesi gerektiği konusunda fikir birlikteliğine varmışlardır (Goodfellow ve ark, 2015).

Bunun haricinde Tindall yaptığı bir çalışmada (2014) *Rhodococcus zopf* (1891) cins isminin geçersiz olduğunu, çünkü bunun *Rhodococcus hansgirg* 1884 algal cins isminin bir tekrarı olduğunu yayınlamıştır. *Rhodococcus hansgirg* 1884 algal cins adının statüsüyle ilgili taksonomik tartışmalar olsa da, bu algal taksonun sınıflandırılmasının algal taksonomistler tarafından resmi olarak neticelendirilmesine kadar diğer tartışmalar ikinci planda kalacaktır. Bu nedenle, yakın gelecekte ne *R. equi*'nin ne de *R. hoagii*'nin geçerli bakteri isimleri olmaları beklenemez çünkü *Rhodococcus* ismi International Code of Nomenclature of Prokaryotes' a göre geçersizdir ve kullanılmamalıdır (Goodfellow ve ark, 2015).

Rhodococcus equi, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium hoagii* ve *Nocardia restricta* tür isimlerinin hepsi “Approved Lists of Bacterial Names” listesinde mevcuttur (Skerman ve ark, 1980) ve “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” vol2, vol4 ve ikinci baskısının vol5’inde sinonimleri açıkça belirtilmiştir (Tindall, 2014).

Rhodococcus hoagii ismi resmi olarak teklif edilmemiş ve geçerli olarak yayınlanmamıştır (Tindall, 2014).

Prescottella equi ismi teklif edilmiş (Jones, 2013) fakat *hoagii* ismi *equi* ismine üstün olduğu için henüz geçersizdir (Goodfellow, 2015).

Tablo 2. *R. equi* sinonimleri – tarih sırasına göre

Sinonim	Kaynak
<i>Corynebacterium hoagii</i>	Eberson, 1918
<i>Corynebacterium equi</i>	Magnusson, 1923
<i>Nocardia restrica</i>	McClung, 1974
<i>Rhodococcus equi</i>	Goodfellow ve Alderson, 1977
<i>Prescottella equii</i>	Jones ve ark, 2013
<i>Rhodococcus hoagii</i>	Kämpfer ve ark, 2014

Goodfellow ve ark (2015)'ten modifiye edilmiştir.

2.3. *R. equi* Morfolofik ve Biyokimyasal Özellikleri

R. equi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sürekli kullanılan seçici olmayan besi yerlerinde, aerobik olarak 37°C'de inkübe edildiğinde kolayca ürer. 24 saatlik inkübasyon sonunda, 1 ile 2 mm arası çapta ve çok belirgin olmayan koloniler oluşur. Kan ilave edilmiş TSA (Triptik Soy Agar) gibi seçici olmayan besi yerlerinde 48 saatlik inkübasyonda, kendisine özgü koloni morfolojisiyle üreme görülür. Düzensiz biçimde yuvarlak, pürüzsüz, yarı şeffaf, parlak, birleşen, mukoid, göz damlası şekilli koloniler oluşturur. Koloni boyutları 2 ile 4 mm arasındadır fakat birleşen koloniler daha büyük görünebilir. Bu organizma MacConkey agarda üreme göstermez. (Muller ve ark, 1988).

Taze kültürlerde koloni çeşitliliği mevcuttur. Genelde başlıca görülen koloni tipi, klasik viköz-mukoid birleşen kolonilerdir, fakat daha az mukoid oluşumlar da görülebilir. 1 mm ya da daha küçük boyuttaki mukoid olmayan koloniler az miktarda görülebilir. Bir suştaki koloni çeşitliliğine ek olarak, *R. equi*'nin dört sabit koloni tipi tanımlanmıştır (klasik mukoid, daha az mukoid, dağılan ve küçük-mukoid olmayan) (Mutimer ve ark, 1981).

Pigment üretimi, kültürlerde 4. güne kadar nadiren göze çarpar (Barton ve Hughes, 1980). Kan ilaveli TSA gibi seçici olmayan besi yerlerinde 4 -7 gün kaldıktan sonra, kolonilerde hafif bir somon pembesi renk görülebilir, buna rağmen pigmentsiz ya da hafif sarımsı görünme ihtimalleri de vardır (Barton ve Hughes, 1980). Kanlı agarda oluşan tipik koloni pigmentinin en iyi tanımı için açık sarımsı kahverengi örnek olarak verilebilir. Pasaj yapılmadan uzun süre eğimli besi yerinde bırakılan kültürlerde koloniler genelde kaba, kuru ve turuncu-kırmızı hale gelir fakat pasajlandıklarında klasik kolonilere geri döner (Karlson ve ark, 1940; Williams ve ark, 1971). ATCC 6939 (Magnusson, 1923) suşunun makroskobik koloni

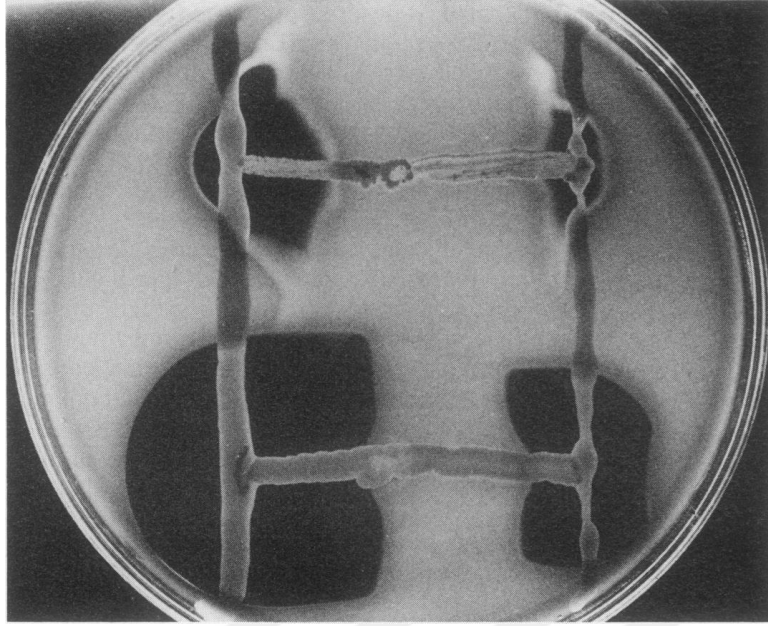
morfolojisi, normalden daha küçük, pürüzsüz ve kuru (mukoid olmaktan ziyade) ve tipik *R. equi*'den daha pigmentli görünür (Prescott, 1991).

Rhodococcus equi morfolojisi üreme koşullarına göre değişiklik gösterir. Sıvı ve katı besiyerlerinde ya da purulent doku örneklerinde bir günlük üremenin sonunda kokoid şekilde görülürken (Fuhrmann ve ark, 1977) sıvı besi yerinde ilk 4 saatlik üreme sonunda çubuk şekillidir ve bazen rudimenter filamentler de görülebilir. *Rhodococcus equi*'nin flagellası yoktur (Prescott, 1991) fakat bazı suşlar pili ya da uzantılar içerir (Nordmann ve ark, 1994). *Rhodococcus equi* bir hafta sonunda somon balığı pembesi ya da sarımsı renk alan düzensiz, smooth ve mukoid koloniler gösterir (Prescott, 1991).



Resim 1. *R. equi* kanlı agardaki koloni morfolojisi. Khan ve ark, (2013)'den modifiye edilmiştir.

R. equi'nin bazı çalışmalarda Ziehl-Neelsen boyamada aside dirençli olduğunu gösteren sonuçların nedeni boyama tekniği, kültürlerin ilerlemiş yaşı ve besi yeri tipi olarak düşünülür. Birçok çalışmada aside duyarlı olduğu görülmüştür (Prescott, 1991). Metakromik granüller seyrek olarak tanımlansa da aside dirençlilik gibi organizmanın üreme koşullarına ve boyama tekniğine bağlı olan tutarsız özelliklerdendir. Gram pozitif ve zorunlu aerobiktir. Katalaz pozitif, çoğunlukla üreaz pozitif ve oksidaz negatiftir. Optimal üreme ısıları 30-37°C arasındadır (Prescott, 1991). *Rhodococcus equi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in fosfolipaz D'si, *Staphylococcus aureus*'un β -toksini ve *Listeria monocytogenes*'in hemolysin'i ile etkileşerek koyun ya da sığır eritrositlerinin tam hemolizini sağlayan çözülebilir "equi faktör" ler salgılar (Prescott, 1982).



Resim 2. *R. equi* faktörleri. Prescott, (1991)'den modifiye edilmiştir.

Gaz-sıvı kromatografisi yoluyla, glikozdan gelen herhangi bir asit metabolik ürün, tanımlanmamıştır (Reddy ve ark, 1978) Bu özellik sadece *R. equi*'ye özgü değilken, bu organizma için belirleyicidir. *R. equi*'nin herhangi bir “*equi faktör* negatif” izolatının tanımlanmamasından dolayı, identifikasyonda kullanılabilir. *R. equi* lipaz ve fosfataz üretir fakat Dnaz, elastaz, lesitinaz ve proteaz üretmez (Mutimer, 1983). API ZYM® (Analytab Products Inc., Plainview, N.Y.) *R. equi*'yi tanımlamada belirleyici enzim profil değerlerini vermiştir (Mutimer ve Woolcock, 1982). Test edilmiş bütün izolatlar löysin arilamidaz, asit fosfataz ve fosfamidaz için; %90'ndan fazlası ise valin amilamidaz, esteraz lipaz ve alfa-glikosidaz için pozitif bulunmuştur.

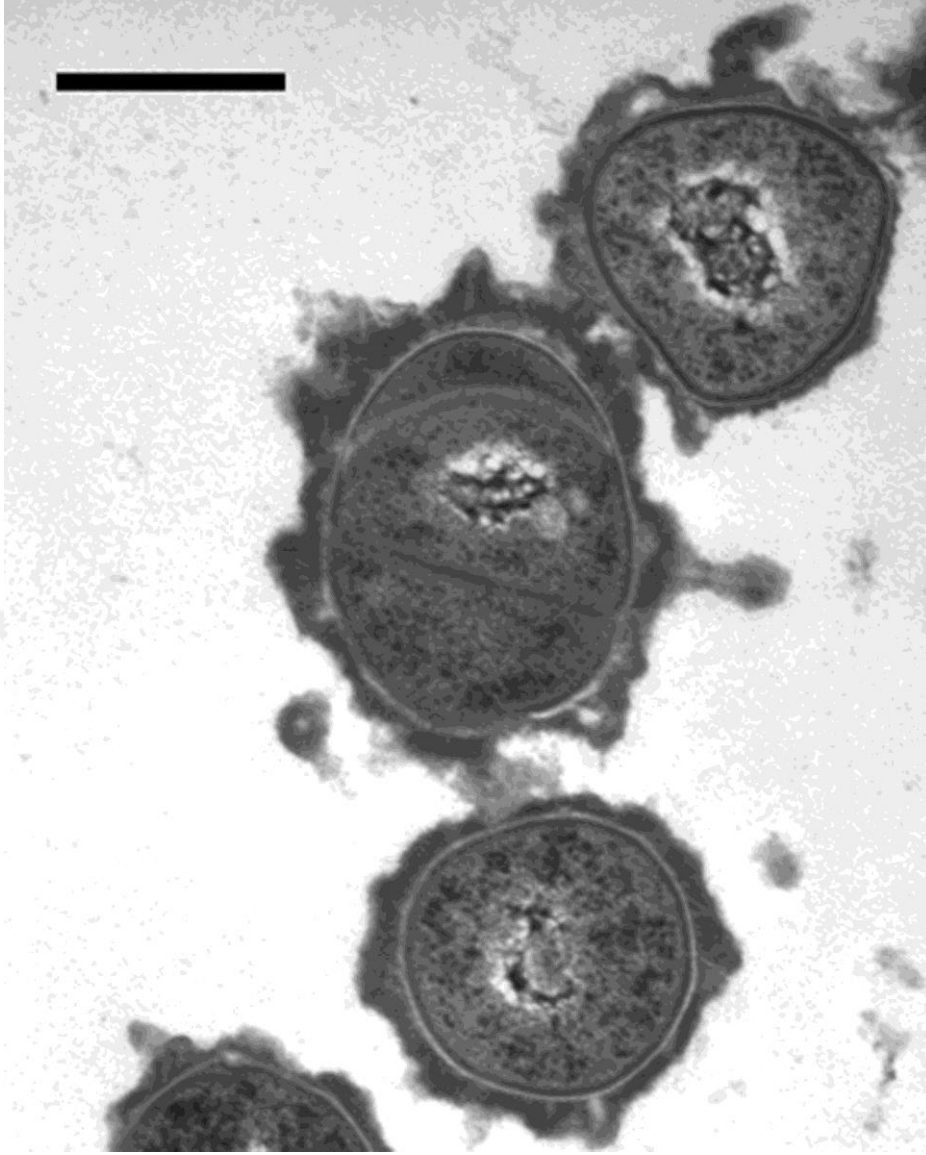
Tablo 3. *R. equi* biyokimyasal karakteristikleri

Biyokimyasal Özellikler	Reaksiyon	% Pozitiflik
Katalaz	+	100
Sitokrom c oksidaz	-	1-5
Karbonhidrat Fermantasyonu	-	100
Alkol Fermantasyonu	-	100
Jelâtin Hidrolizi	-	100
İndol	-	100
H ₂ S	Değişken	32-62
Üreaz	+	95
Hipurat Hidrolizi	-	1
Eskulin Hidrolizi	-	4
Nitrat Redüksiyonu	+	88
Equi faktörleri	+	100
Lipaz	+	100
Fosfataz	+	100

Prescott, (1991)' den modifiye edilmiştir.

Besin gereksinimleri basittir ve karbon ihtiyacı; propiyonat ve asetat gibi, herbivorların dışkılarında bulunan organik asitler başta olmak üzere, birçok farklı kaynaktan elde edilebilir (Prescott, 1991). *R. equi*'nin karbon kaynağı olarak lipidlere gösterdiği öncelikli ilgi ayrıca, Vazquez Boland ve ark (2009) yaptığı kromozom analizinde, mikobakterilerdeki gibi lipid metabolizmasıyla ilgili birçok genin varlığı ve şeker transportuyla ilgili genlerin bulunmamasıyla desteklenmiştir.

Rhodococcus equi düşük pH ve oksidatif stres gibi aşırı çevre koşullarıyla baş edebilir (Benoit ve ark, 2000, 2002). Kompleks hidrofobik hücre duvarları, mikolik asit içeren lipidler ve trehaloz dimikolat ve lipoarabinomannan (*ReqLAM*) gibi lipoglikanlar ile karakterizedir (Sutcliffe, 1997). *Rhodococcus equi*, antijenik olarak değişken, kalın bir polisakkarit kapsüle sahiptir (Prescott, 1991) 27 farklı kapsül serotipi bulunmuştur (Prescott, 1991).



Resim 3. *R. equi*'nin trasmisyon elektron mikroskopuyla ultrastrüktürel morfolojisi. Sydor ve ark. (2007)'den modifiye edilmiştir.

2.4. *R. equi*'nin Mikroskopik Morfoloji ve Boyama Özellikleri

R. equi, Gram pozitif, pleomorfik, üreme şartlarına bağlı olarak belirgin kokoid şekilden basil şekile kadar çeşitlenen bir kokobasildir. Genelde hem katı ortamlarda hem de hastalardan alınan purulent örneklerde kokoid şekillidir, fakat sıvı ortamlarda, özellikle genç kültürlerde uzun çubuklar ya da rudimenter dallanma sergileyebilen kısa filamentler oluşturur (Prescott, 1991).

R. equi'nin Ziehl-Neelsen boyasında aside dayanıklı olduğunu gösteren raporlar, kullanılan boyama tekniğine, kültürlerin ilerlemiş yaşına ve besi yerinin tipine dayanır (Jensen, 1934; Verge ve Senthille, 1942; Burton ve ark, 1980). Çalışmaların çoğu *R. equi*'nin aside

dirençliliğini göstermede başarısız olmuştur. Metakromatik granüllerin tanımlandığı olmuştur (Magnusson, 1923; Karlson ve ark, 1940) fakat aside-dirençli boyanma gibi, organizmanın üreme koşullarına ve boyaya bağlı olan tutarsız özelliklerindedir.

2.5. Diğer Belirleyici Özellikler

R. equi 10°C ile 40°C arasında değişen bir sıcaklık yelpazesinde ürer. Tartışmalı olmasına rağmen, optimal üreme sıcaklığı 30°C olarak bilinmektedir, fakat üreme hızı 37°C'de sadece biraz daha düşüktür (Hughes ve Sulaiman, 1987). Kültürler 23°C de ve 37°C'de aynı miktarda ürerler. *R. equi* basit büyüme gereksinimleri olan zorunlu bir aeoroptur (Goodfellow, 1986). Asetik, pirüvik, bütirik ve propionik asitler (Yager, 1987) ve amonyum sülfat ya da potasyum nitrattan gelen nitrojen (Pradip ve ark, 1966) olmak üzere bir takım tek karbon kaynaklarından (Goodfellow ve ark, 1982) gelen karbonu kullanabilmektedir. Organizma hareketsiz ve flagellasızdır ve az miktarda pili üretebilir (Yanagawa ve Honda, 1976).

Organizmalar, seçici olmayan sıvı besi yeri ortamlarında, genellikle orta derecede bulanıklık üreterek, bazen 48 saatten sonra hafifçe somon-pembe renkli bir sediment çıkararak, kolayca ürer (Karlson ve ark, 1940).

2.6. Epidemiyoloji

R. equi enfeksiyonunun çiftliklerde görülme insidensinin tamamen değişkenlik göstermesi ve bu nedenle örnekleme yapılabilecek çiftliklerin geniş kapsamlı bir listesi çıkarılamaması nedeniyle *R. equi* tay pnömonisinin (REFP) yaygınlığını kesin olarak ölçmek zordur (Cohen, 2010). Bazı yetiştirme çiftliklerinde hastalık hiç görülmezken, bazılarında sporadik, bazı çiftliklerde ise endemik olarak görülmektedir (Prescott, 1991). Taylar klinik belirtileri göstermeden, *R. equi* ye bağlı patolojik değişiklikleri tespit edebilmek amacıyla görüntüleme tekniklerinin artarak kullanılması vaka tanımlarını değiştirerek hastalığın epidemiyolojik kantifikasyonunu zorlaştırmaktadır. Yetiştirme çiftliklerinde hastalığın klinik semptomlarının kümülatif insidensi % 10 civarındadır fakat % 20'nin üzerine çıkan kümülatif insidensler de olağandışı değildir (Chaffin ve ark, 2003; Cohen ve ark 2008). Subklinik ve preklinik pulmoner konsolidasyonlu tayları tespit etmek amacıyla yapılan ultrasonografik görüntüleme tekniklerinin kullanıldığı çiftliklerde kümülatif insidens % 50' yi bulmaktadır (Slovis ve ark, 2005). Çeşitli çiftliklerde yapılan çalışmalarda raporlanan mortalite oranları % 10 - % 30 arasında değişmektedir fakat daha yüksek değerler de gözlenmiştir (Chaffin ve ark,

2003; Cohen ve ark, 2005). Hastalığın klinik belirtileri ortaya çıkmadan, ultrasonografik görüntüleme teknikleriyle pulmoner konsolidasyonların tanımlanması, bu çiftliklerdeki araştırmalarda elde edilen mortalite oranlarını önemli ölçüde düşürmüştür (Cohen, 2010).

R. equi tay pnömonisinin epidemiyolojisinde karşılaşılan en önemli sorular: (1) neden aynı ortamdaki bazı taylar hastalıktan etkilenirken bazıları etkilenmez ve (2) neden hastalık sürekli olarak bazı çiftliklerde görülürken bazı çiftliklerde hiç görülmez? Bu sorulara cevap verebilmek için yapılacak araştırmalar tay bazında ve çiftlik bazında olarak incelenmelidir.

Yapılan çalışmalar tayların ve kısrakların buldukları ortamda *R. equi* ye maruz kalma olasılıklarının çok yüksek olduğunu (Hietala ve ark, 1985; Takai ve ark, 1996) ve birçok farklı ülkede etkenin dışkıdan, topraktan, havadan ve yetiştirme çiftliklerindeki at yemlerinden izole edildiğini göstermiştir (Morton ve ark, 2001, Grimm ve ark, 2007, Cohen ve ark, 2008). Bu yaygın dağılıma bakıldığında tüm tayların *R. equi*'ye maruz kaldıkları düşünülebilir fakat sadece bazı taylarda hastalık oluşur. Yüksek inokulum ya da etkenle temasın sürekli olması durumunun taylarda hastalık riskini artırması ihtimal dahilinde olsa da, yapılan tay bazında çalışmalarda, annenin dışkısında bulunan virulent *R. equi* konsantrasyonunun, tayın hastalanma riskini değiştirmediği gözlenmiştir (Takai ve ark, 1996). Bununla birlikte, yetiştirme çiftliğindeki tüm kısrakların dışkılarıyla virulent *R. equi* saçması, tayların yetiştirme ortamında kısrakların virulent *R. equi* kaynağı olduğunu gösterir. Peripartum dönemde ahırlarda havada bulunan virulent *R. equi* konsantrasyonunun tayların yaşlarına bağlı olarak hastalığa yakalanma riskini arttırdığı belirlenmiştir (Kuskie, 2011).

Virulent *R. equi* ye daha yüksek konsantrasyonlarda ya da sürekli maruz kalmanın taylarda hastalığa yakalanma riskini etkilediği açıklanamadığı için, bazı tayların hastalığa karşı daha duyarlı olduğu düşünülebilir. Sadece bir çalışma spesifik olarak tay bazında *R. equi* pnömonisinin özelliklerini, tarihini, idare yöntemlerinin etkisini araştırmıştır (Chaffin ve ark, 2003). Bu çalışma farklı çiftlikler ve farklı yıllar arasında *R. equi* hastalık insidensinde belirgin farklılıklar tespit etmiş olsa da, tay bazında belirgin bir veri sunamamıştır.

Tay DNA'sının mikrosatelit bölgelerindeki polimorfizm, IL7R ve SLC11A1 (eskiden NRAMP1 olarak bilinen, günümüzde ise SLC11A1) yanı sıra, transferrin genleri de *R. equi*'ye karşı duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bu ilişkilendirme çok güçlü değildir ve bu konudaki araştırmaların bazılarının fenotipik sonuçları hastalıktan ziyade enfeksiyon olmuştur (Halbert ve ark, 2006, Horin ve ark,2010). Yine de, genetik faktörlerin taşıyıcıların hastalığa duyarlılığını etkilediği düşünülür, fakat bunlar, doğada çok faktörlü, çiftlikteki kısrak ve tay yoğunluğu gibi çevresel faktörlerden etkilenen kompleks mekanizmalardır. Yeni genom ve

trans kriptom araçları dirençli ve duyarlı tayların hangi gen sekanslarının farklı olduğunu tespit etmede çok önemli bilgilere ışık tutabilir (Cohen, 2010).

R. equi pnömonili ve sağlıklı taylarla ilgili hem gözlemsel çalışmalar hem de deneysel çalışmalar, taylarda doğuştan gelen ve sonradan kazanılan immun cevapların, hastalık patojenezinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Aynı çiftlikte bulunan 2 haftalık taylarda daha sonradan *R. equi* pnömonisi gösterenlerin, nötrofil konsantrasyonu ve CD4+:CD8+ T lenfositlerin oranı, sağlıklı taylara oranla anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür (Chafin ve ark, 2004). Hastalığın klinik belirtilerinin görüldüğü dönemde ise sağlıklı ve hasta taylar arasında CD4+ ve CD8+ T lenfosit konsantrasyonunun ve oranının değişiklik göstermediği görülmüştür (Chafin ve ark, 2004; Flaminio ve ark, 1999).

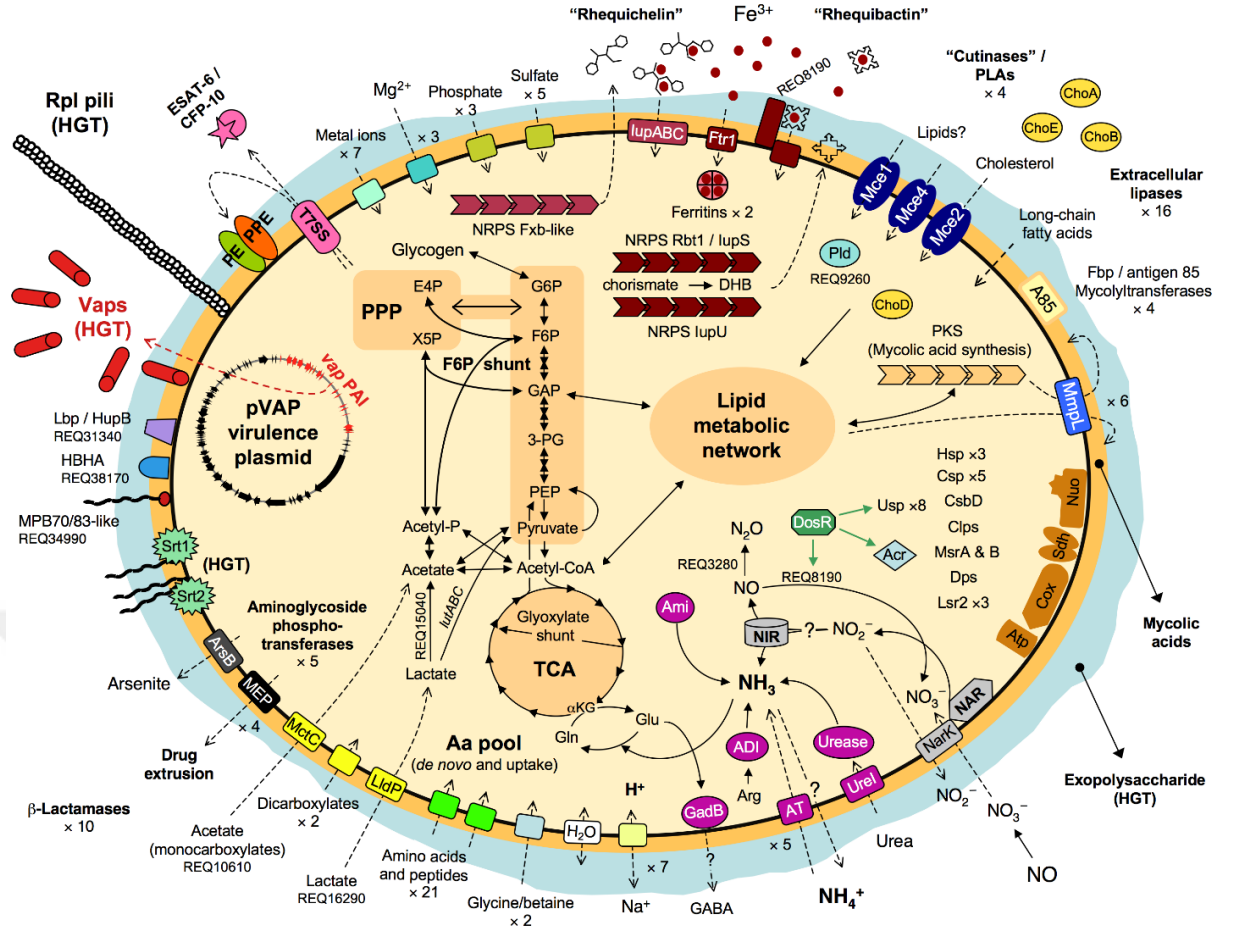
Çiftlik bazında çalışmalarda edinilen sonuçlara göre çiftlikte akre başına düşen kısarak ve tay sayısı *R. equi* pnömonisi insidensiyle pozitif korelasyon gösterir (Chaffin ve ark, 2003, Cohen ve ark, 2005, Cohen ve ark, 2008). Yetiştirme çiftliklerindeki toprak jeokimyasal parametrelerinin *R. equi* pnömonisiyle herhangi bir ilişkisi saptanmamıştır (Martens ve ark, 2002). Birkaç çalışma, yetiştirme çiftliklerinde toprakta *R. equi* varlığının ve konsantrasyonunun, bu çiftliklerdeki taylarda *R. equi* pnömonisi insidensini etkilemediğini göstermiştir (Martens ve ark, 2000, Cohen ve ark, 2003, Muscatello ve ark, 2006). Yapılan bir araştırmada, Kentucky'daki yetiştirme çiftliklerinde, topraktaki virulent *R. equi* konsantrasyonunun aşım/doğum sezonunda arttığını gözlenmiştir (Cohen ve ark, 2008). Avustralya'daki bir çalışmada ise yetiştirme çiftliklerinde havada bulunan virulent *R. equi* konsantrasyonunun hastalığın insidensiyle korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Muscatello ve ark, 2006). Avustralya'daki bu çiftliklerde havadaki *R. equi* konsantrasyonunu etkileyen faktörler, yüksek ortam sıcaklığı, düşük toprak rutubeti, düşük ot uzunluğu ve aşım/doğum sezonunun gecikmesidir (Muscatello ve ark, 2006). *R. equi* hakkında çevresel/ekolojik çalışmalarda istatistiksel olarak belirgin ilişkilerle, nedensel ilişkileri ayırmak önem arz eder, çünkü önde gelen sebebin zamanlamasını tespit etmek bir hayli güçtür (Cohen, 2010).

2.7. *Rhodococcus equi*'de Hücre Biyolojisi ve Patogenez

Alveolar makrofajlar içinde çoğalma ve bunun neticesinde makrofajları yok etme kabiliyeti *R. equi*'nin patojenitesinin temelidir. İnfektivite sadece ya da büyük ölçüde bu yolla monosit-makrofaj klonundaki hücrelerle sınırlı iken taylardan alınan nötrofiller tamamiyle bakterisidaldir (Meijer ve Prescott, 2004). Ayrıca, *in vitro* olarak insan alveolar epitel hücrelerine düşük kabiliyetli penetrasyonu ve bu hücreler içinde hayatta kalabildiği tespit edilmiştir (Ramos-Vivas ve ark, 2011). Virulent *R. equi*'nin makrofajlarda ne şekilde hayatta kalıp çoğaldığı gelecekteki çalışmalar için verimli bir alan sağlamaktadır (Meijer ve Prescott, 2004).

R. equi'nin spesifik antikorla opsonizasyonunun, artmış fagozom-lizozom füzyonu ve *R. equi*'nin at makrofajları tarafından kayda değer biçimde arttırılmış öldürülmesi (Hietala ve Ardans, 1987; Zink ve ark, 1987) tarafından takip edilmesinden dolayı, makrofajlara Fc reseptör yolu haricinde girişi, bakterinin akibetini belirlemede önemli olabilir. Hastalığın taylarda doğumdan sonraki 4 ile 12 haftalar arasındaki periyodla sınırlanması, maternal antikorlardaki büyük düşüşün gerçekleştiği zamanına denk gelmekte, bu da *R. equi*'nin Fc reseptörleri haricinde bir yolla makrofajlara girişinin antikorlara bağlı makrofaj öldürme yollarından kaçınmasına izin vermesinde önemli olabileceği tezini desteklemektedir. Bakteriyel sindirim mekanizmaları, makrofaj aktivasyonunu da etkileyen fagosit reseptörlerine bağlı olarak değişir (Meijer ve Prescott, 2004).

Bakterinin komplement reseptör (CR) kaynaklı fagositozu, bakteriyel yüzeye tutunan C3b, C3bi, ve C4b'den bir ya da daha fazlasını bağlayan pek çok makrofaj reseptörü (CR1, CR3, CR4) ile alakalıdır. Antikor (FcR) kaynaklı fagositozda, yalancı ayaklar (Psödopod) opsonizasyona uğramış bakterileri, makrofaja çekmeden önce, kendi içlerinde tutarken, CR-kaynaklı fagositozda, opsonize bakteriler psödopod yardımı olmadan makrofaj içine alınırlar. FcR-uyarımli fagositoz, reaktif oksijen ara maddelerinin (oksidatif yıkım) üretimi ve proinflamatuvar mediyatörlerle yakından ilgiliyken, CR-kaynaklı fagositoz bu etkiyi başlatmaz (Aderem ve ark, 1999). Farklı fagositoz reseptörleri nedeniyle bakteri internalizasyonunda oluşan farklılıklar, ayrıca bakterinin yüzeyindeki mannoz ve fruktozu tespit eden mannoz reseptörü (MR) üzerinden açıklanmıştır. FcR ve CR-kaynaklı fagositozlardan farklı olarak, MR-kaynaklı fagositoz, fagozomlar çevresindeki vinkulin ve paksillin isimli sitoskeletal proteinlerin birikimiyle alakalı değildir (Aderem ve ark, 1999).

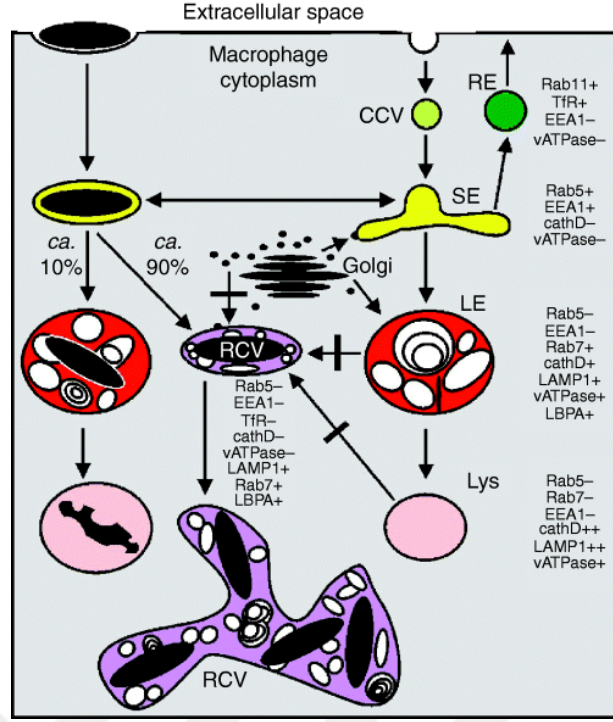


Şekil 1. *R. equi* hücre biyolojisi. *R. equi* 103S'in ilgili metabolik ve virülens bağlantılı özelliklerinin sistematik görüntüsü. Letek ve ark, (2010)' dan modifiye edilmiştir.

R. equi'nin makrofaja in vitro bağlanması, tip 3 lökosit komplement reseptörü (CR3) olan Mac-1 vasıtasıyla gerçekleşir (Hondalus ve Mosser, 1994). *R. equi*'nin lipoarabinomannan'ı (ReqLAM) lektin yolu aracılığıyla *R. equi* üzerine C3b tutunmasını aktive edebilecek ve böylece makrofajlar içine Mac-1 kaynaklı alımı destekleyebilecek olan rekombinant mannoz-bağlayıcı proteine bağlanır. ReqLAM başka kollektinleri de bağlayabilme olasılığı da vardır, çünkü *M. tuberculosis* lipoarabinomannanı, insan pulmoner sürfaktan protein A için bir bağlantı noktasıdır ve at sürfaktan proteinleri mannozu bağlar. Buna ek olarak, ReqLAM'ın residüleri olan 2 linked α -d Manp'in tanınmasıyla direk ya da mannoz bağlayıcı protein ya da sürfaktan molekülleri aracılığıyla (indirek) mannoz reseptöre bağlanması yoluyla makrofajlara giriş de gerçekleşebilir (Garton ve ark, 2002). Bu mekanizmalarla hücreye giriş, antikor kaynaklı Fc reseptör yolundan kaçmayı sağlar ve bakterinin hücre içinde canlı kalmasını kolaylaştıran önemli bir nokta olabilir. *Rhodococcus*

equi'nin kontrolsüz hücre içi replikasyonu, makrofajların apoptosis değil nekrozis ile ölümüne neden olur (Luhmann ve ark, 2004).

Bakteriler internalize edildiğinde, fagozom endositik yoldan gelen kesecikler ile bir dizi füzyon ve fizyon olayları geçirir ve bu fagolizozomların oluşumuna yol açan karmaşık bir olgunlaşma sürecidir. Mikrotübüllerdeki fagozomun hücrelerin içine doğru olgunlaşma sırasındaki olağan progresif hareketi, fagozomun endozomal sistemle etkileşime geçmesine izin verir. Olgunlaşma esnasında, fagozom zarı geç endozomların ve lizozomlarınkine benzemek üzere gitgide artan bir değişim geçirir. Bu, fagozomların hem erken hem de geç endozomlarla hazır füzyonuyla başlayan, lizozomlarla kolaylaştırılmış füzyonla devam eden ve herhangi bir endositik organelle kaynamada başarısız olması ile sonuçlanan düzenlenmiş ve ardışık bir şablonu takip eder (Tjelle ve ark, 2000). Elde edilen veriler, fagozom-endozom füzyonunun, içerik ve zarlarının kısa etkileşimleri şeklinde (kiss and run-öp ve kaç) meydana geldiğini desteklemektedir (Desjardins, 1995). Bu olgunlaşma süreci, erken endozomlarda EEA1 (Early endosome antigen), Rab5 (Ras like protein from rat brain), anneksin, NSF, SNAP (soluble NSF-attachment proteins: çözülebilir NSF-ekli proteinler) , TfR (transferrin reseptörü), mannoz reseptörü, coronin, PIP3 (Fosfatidilinositol-3-fosfat); geç endozomlar ve lizozomlarda Rab5, Rab7, mannoz-6-fosfat reseptörü, katapsin D, LAMP1 (lysosyme-associated membrane protein1: lizozoma-bağlı membran protein), LAMP2, LBPA/BMP (Lipid lysobisphosphatidic acid /bis monoacylglycerol phosphate) gibi fagozomal membran moleküllerinin değişimleri ile karakterize edilmiştir (Fernandez-Mora ve ark, 2005). Endozomal keseciklerden tomurcuklanma ve onların fagozom ile füzyonunda rol alan bir ya da daha fazla protein *R. equi* için önemli hedefler olabilirler ama bunun araştırılması gerekmektedir (Meijer ve Prescott, 2004).



Şekil 2. *R. equi* içeren vakuol.

Fernandez-Mora ve ark, (2005)' ten modifiye edilmiştir.

Erken endozomlardaki transferrin mevcudiyeti, büyük ihtimalle, bazı virülens plazmid patojenite adası genlerinin transkripsiyonunun düzenlenmesinde demir kısıtlamasının önemini açıklamaktadır. NRAMP1 (doğal direnç bağlantılı makrofaj protein) belirli hücre içi patojenlerinin büyümesine karşı makrofajlarda doğal bir direnç oluşturur (Russell, 2001). Manganez ya da demir yönünde bir tercih gösteren ve fagozom içine demir pompolayan çift değerlikli bir kation taşıyıcı olarak, NRAMP1, görev mekanizmasının detayları açık olmamakla birlikte, fagositik vakuolün etkin asitlendirilmesi ile ilişkilidir (Russell, 2001). Demir, bir kez fagozom içine girdiğinde, Fenton/Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla biyotoksik reaktif oksidatif türlerin oluşumunu tetikler (Pierre ve Fontecave, 1999). NRAMP1 tarafından, antimikrobiyal oksidatif radikallerin jenerasyonunu katalize etmek için fagozom içine taşınan sınırlı miktardaki demir, bakteriler için demir ulaşılabilirliğini yükseltmez. Çünkü fagozomdaki demir, nikrit oksit (NO) oluşumu sürecinde bertaraf edilir. İlginç olarak, *R. equi* ile enfekte olmalarını takiben at makrofajlarında NRAMP1 transkripsiyonunda belirgin düşme (down regülasyon) gözlemlenmiş (Watson ve ark, 2002), fakat bunun plazmid pozitif ve negatif suşlarda farklı olup olmadığı araştırılmamıştır. *M. tuberculosis*'de, IdeR, demir kazanımı ve demir depolama kadar, makrofaj içinde hayatta kalabilmenin de dahil olduğu genlerin transkripsiyonunu kontrol eder (Gold ve ark, 2001).

Fagozomun olgunlaşması ayrıca, erken ve geç endozomlardan gelen vakuoler proton pompasının alımı ve geç endozomdan gelen Na⁺/K⁺-ATPazın çıkarılması, bu sayede vakuoler pompasının fagolizozomda hiçbir dirençle karşılaşmadan çalışabilmesi (pH < 5,5) ile gerçekleşen progresif bir asidifikasyon ile de karakterize olmuştur (Clemens, 1996). Bu süreci etkilemeyen bakteriler için, fagositozun, fagolizozom oluşturmaya beş dakika civarında sürer (Mayorga ve ark, 1991). Fagosite edilen bakteriler, geç fagolizozomlarda, lizozomlar tarafından kullanılan, fagolizozomun asit ortamı içindeki geniş yelpazede aside-dirençli hidrolazları içeren aynı mekanizmalar tarafından bozulmaktadır. Maddeler, fagolizozomdan geç endozomlara ya da lizozomlara daha ileri bozulma için taşınıyor da olabiliyorlar (Meijer ve Prescott, 2004)

Makrofaj içinde *R. equi*, sadece membranla çevrelenmiş vakuoller içinde lokalize olup, varlığını sürdürmesinin fagozom-lizozom füzyonunun oluşmaması ile ilişkili olduğu görülmektedir (Hietala ve Ardans, 1987; Zink ve ark, 1987). Plazmidte kodlanan ürünlerin *R. equi*'nin makrofaj içinde hayatta kalma ve üreme yeteneğine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Fagozomların olgunlaşmasının, virülans plazmid içeren suşlarda plazmid içermeyen izojenik suşlardakine oranla daha etkili biçimde yönlendirilmiş olduğu ve J774E fare makrofajları için *R. equi*'nin sitotoksitesinin virülans plazmid mevcudiyetiyle güçlü bir şekilde regüle olduğunu ortaya koyulmuştur (Haas ve ark, 2002).

Detaylardaki azlığa rağmen, *R. equi*'nin fagozom olgunlaşmasını etkileyen, lizozomal füzyona dirençli ve sadece hafif asidik (pH 6,5) bir vakuolde lokalize olan *M. tuberculosis* ve benzer mikobakterilere benzer davranış sergilediği düşünülür (Armstrong ve Hart, 1975; Clemens ve Horwitz, 1996). *M. tuberculosis*, füzyon kolaylaştırıcı moleküllerin edinimini; Rab5 ve/veya SNARES (soluble N-ethylmaleimid-sensitive fusion factor attachment protein receptor/çözülebilir N-etilmaleimid-hassas füzyon faktör ek protein reseptörü) olarak bilinen bazı erken endozom reseptörlerinin kaybından kaçınarak, ya da Rab7 gibi diğer kolaylaştırıcı moleküllerin edinimini bloke ederek etkiler (Clemens ve Horwitz, 1996; Riess ve ark, 1999). Vakuoler proton pompasının belirgin eksikliği (Russell DG, 1998) zayıf asidik koşullardan sorumlu gibi gözükmektedir. Asidifikasyon inhibisyonu, lizozomlara vesiküler transferi bloke eder (Clague ve ark, 1994), ve fagozomun pH'ı muhtemelen füzyon olaylarını kontrol etmede önemlidir. Mikobakteriler içeren fagozomlardaki pH, muhtemelen Na⁺/K⁺-ATPazdaki direnç ya da fagozom içindeki amonyak üretimi nedeniyle zayıf asidik olarak kalmıştır. *M. tuberculosis* tarafından pek çok yolla üretilen amonyum fagolizozom oluşumunu önler (Gordon ve ark, 1980).

Makrofajlar lizozomal degradasyonun yanı sıra, respiratorik yıkım fagosit oksidaz ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) yoluyla toksik reaktif oksijen ve nitrojen türleri

üretmek üzere oksidatif yıkım ile sinerjize olmasının yanısıra, NO ve türevleri fagozomlardaki bakteriler üzerinde daha uzun süren bir bakteriyostatik etkiye sahiptir. *R. equi*'nin murin makrofajları tarafından öldürülmesinin, IFN- γ 'e bağlı olduğu gösterilmiştir. IFN- γ makrofajları aktive eder, aktive makrofaflar reaktif nitrojen ve oksijen ara maddelerini üretir, bu reaktifler gerekli bakteri yok edici faktör olan peroksinitrit (ONOO⁻) ile kombine olur. Makrofajların IFN- γ aktivasyonu, non-IFN- γ aktive makrofajlardaki replikasyonuna zıt biçimde ve yüksek çıkış iNOS'i aktive etmedeki IFN- γ 'nin rolüyle tutarlı biçimde, *R. equi*'nin gelişmesini önlemiştir. Bu çalışma, *R. equi*'nin dirençli hayvanlardaki etkin öldürülmesinin iki adımlı modelini öne sürmüştür (Darah ve ark, 2000). İlk adım, iNOS transkripsiyonunu takip eden nitrik oksit üretimiyle sonuçlanan IFN- γ ve TNF- α tarafından makrofaj aktivasyonudur ve ikinci adım, bakteriyel fagositoz ile başlatılan, respiratorik yıkımla ve nitrojen ve oksijen ara maddelerinin reaksiyonuyla üretilen ONOO⁻'nin üretimi ve bakterinin öldürülmesiyle sonuçlanır.

M. tuberculosis ve belki de *R. equi* için, makrofajlar IFN- γ tarafından bir kez aktive edildikten sonra, bakterinin endozomal olgunlaşma üzerine uyguladığı blokenin üstesinden gelirler. *R. equi*, bakteriyel fagositozu takiben gerçekleşen fagositlerin oksidatif yıkımı esnasında etki eden reaktif oksijen ara maddelerinin üretimini yansıtan bir oksidatif bir stres olan hidrojen perokside yüksek oranda dayanıklıdır. Bu direnç *R. equi*'nin katalaz aktivitesinin bir sonucu olabilir. Hidrojen perokside direnç, virülens plazmidin bir fonksiyonu olmamasına rağmen, hidrojen peroksitle tedavi, makrofajlar tarafından empoze edilen oksidatif stres altında *R. equi*'nin hayatta kalmasında *vapA* ve *vapG*'nin bir rolü olduğu görüşünü destekleyecek biçimde, artırılmış *vapA* ve *vapG* transkripsiyonu ile sonuçlanmıştır (Benoit ve ark, 2002).

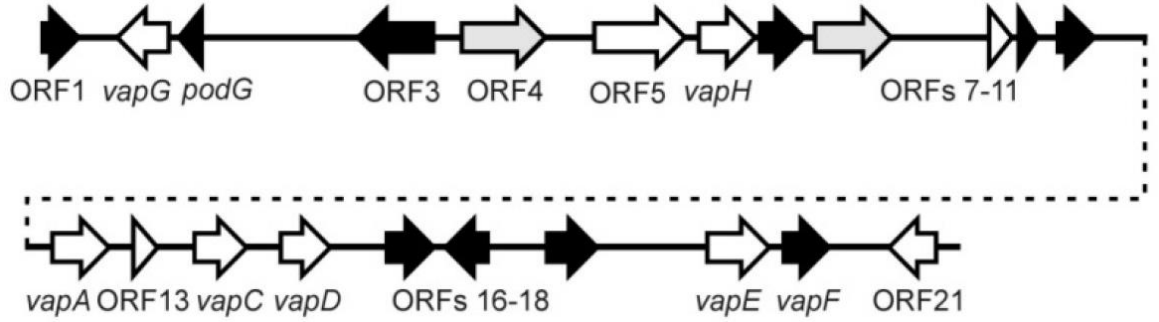
2.7.1. *R. equi* Virülens Plazmid

R. equi 1920'li yıllardan beri taylar için önemli bir patojen olarak bilinse de, 1991 yılı bu bakterinin virülens mekanizmalarını belirlemede bir dönüm noktası olmuştur. Takai ve ark. (1991) *R. equi* ile enfekte tayların kan serumlarında 15-17 kDa'lık güçlü immunojenik özellikte proteine karşılık, yüksek miktarda antikor varlığını tespit etmiştir. Bu virülens ilişkili protein (VapA) tripsin sindirimine duyarlı ve biyotin işaretlemesine uygun olmasıyla, yüzeysel lokalizasyona sahip olduğunu işaret etmiştir. Buna ek olarak VapA [9,10-^{3H}] palmitatla radyoaktif olarak işaretlenebilir, proteinin lipid modifiye olduğunu gösteren bu özellik proteinin hücre duvarına tutunmasını sağlar (Takai ve ark, 1992; Tan ve ark, 1995). Gram pozitif bakterilerde bol miktarda bulunan lipoproteinler genelde çözünmüş maddelerin sitosol içine transportunu, yüzeylere tutunmayı ya da enzimatik aktiviteleri gerçekleştirir (Sutcliffe, 1997). Lipoproteinlerin sinyal sekansı (S/T/G/L/A/V)l(A/S)(G/A)C aminoasit sekansını içeren "lipobox" a sahiptir. Matür proteinin ilk aminoasidi lipid modifiyeli sistin rezidüleridir. *Mycobacterium tuberculosis* genom sekansı analizinde varsayılan, lipobox ı da kapsayan 65 lipoprotein varlığı ve mikolik asit içeren aktinomisetlerin diğer bakterilerde de bulunan konvansiyonel lipid modifiye sistemine sahip oldukları ortaya konulmuştur (Sutcliffe, 1997). Buna rağmen VapA proteininin sistin ya da lipobox içermemesi nedeniyle lipid modifikasyonunda farklı bir mekanizmaya sahip olduğu düşünülmektedir.

VapA'nın virülens ilişkili bir protein olduğunun bulunmasından sonra ikinci bir dönüm noktası *vapA* geninin yaklaşık 80-85 kb'lik endojen *R. equi* plazmidinde (pVAPA) lokalize olduğunun tespitidir (Takai et al., 1991). Bir diğer önemli buluş, bu plazmidlerden arındırılan *R. equi* suşlarının hayatta kalamaması, makrofajlarda replike olamamaları, taylar ve fareler için virülenslerini kaybetmeleridir (Giguère ve ark, 1999; Gold ve ark, 2001). Enfekte domuzların submaxillar lenf nodüllerinden alınan örneklerde de büyük plazmidlere rastlanmıştır. Bu plazmidler *vapA* genini taşımasa da, 20kDa lık bir *vapB* genini taşırlar. Domuzlardan izole edilen izolatlar, taylardan elde edilen *vapA* izolatlarına nazaran, fareler üzerinde daha düşük virülens göstermişlerdir. Bu da konaklara ilgi duyan farklı suşların farklı plazmidler içerdiğini gösterir (Takai ve ark, 1996). Bu çalışmalar taylarda ve domuzlarda virülens için plazmidlerin gerekli olduğunu ve bir ya da birden fazla virülens faktörü olduğunu gösterir. Buna rağmen, sığırlardan ve keçilerden elde edilen *R. equi* izolatları virülens plazmidini bulundurmamaktadır, insanlardan elde edilen izolatlar ise ya *vapA* ve *vapB* kodlayıcı plazmidlerden herhangi birini içermektedir ya da virülens plazmidini bulundurmamaktadır (Takai ve ark, 1995; Takai ve ark,

1997; Tkachuk ve ark, 1998; Flynn ve ark, 2001). Bu da insanlarda *R. equi* enfeksiyonu patojenezisinin taylarda ya da domuzlardakinden farklı olduğunu gösterir.

İki taydan elde edilen izolatlardaki virülens plazmidi nükleotid sekansında 69 ORF (Open reading frame, açık okuma çerçevesi) saptanmıştır (Takai ve ark, 2000). Farklı organizmalardan elde edilmiş olan genlerle kıyaslandığında, virülens plazmidinin üç farklı fonksiyonel bölgesi bulunur. Bu bölgelerden iki tanesi konjugasyon, stabilizasyon, segresyon ve plazmid replikasyonu için gerekli proteinlerin kodlanmasında görevli genlere benzer genleri içerir. İlginç olarak virülens plazmidi üzerindeki ORF 34,38, 39 ve 40, *Micrococcus sp* 28 (Ulaşılabilirlik numarası AY034092) de bulunan endojen bir plazmiddeki ORF lere benzerlik gösterir ve benzer şekilde organize olmaları ortak bir orijini işaret eder. Konjugasyonda görevli genlere benzer yapıdaki bu genlerin tespiti, virülens plazmidin virulent suşlardan avirulent suşlara aktarılabilmesini gösterir. Mekanizma tam olarak açıklanamasa da, virülens plazmidin, bir popülasyonda avirulent suşlara yayılabileceğinin göstergesidir. 27.5 kb uzunluğunda üçüncü bölge, patojenite adası ayırıcı özelliklerini taşır. Plazmidin geri kalanından daha düşük bir G+C içeriğine sahip olmasıyla karakterizedir ve transpozon resolvazlara benzer genlerle çevrelenmiştir. Bu kısmın ayrıca *vapA* genini içermesi, üçüncü bölgenin patojenite adası olduğu tezini kuvvetlendirir. Patojenite adası analizleri, bu adanın altı farklı VapA homologlarını (Vap C, D, E, F, G, H) kodladığını göstermektedir. Fonksiyonel olmayan VapF haricindeki diğer Vap genleri proteinleri açık bir sinyal sekansı ile kopyalar ve bu onların ekstraselüler proteinler olduklarını gösterir. Byrne ve arkadaşları (2001), Vap C, D ve E' nin VapA'dan farklı olarak sekrete olduğunu, hücre duvarına tutunmadığını gözlemlemiştir. Altı Vap genine ek olarak, açık sinyal sekanslarıyla protein kodlayan dört gen daha vardır, patojenite adası tarafından kodlanan ekstraselüler gen sayısı bu şekilde on olur. Ekstraselüler proteinler taşıyıcının bulunduğu çevre ile etkileşebildiği için, bu on protein virülens faktörü olarak önem arz edebilir.



Şekil 3. *R. equi* virülens plazmidi 27,5 kb'lık patojenik adası sistematik görünüşü Takai ve ark, (2000)'den modifiye edilmiştir.

R. equi virülensinin büyük bir plazmide bağlı olduğunun keşfedilmesine rağmen, bu keşfin ardından nükleotid sekanslarının belirlenmesi ve analizleri *R. equi* virülens mekanizmalarına beklenen açıklığı getirememiştir. Bunun nedeni, patojen adasında kodlanmış proteinlerin büyük çoğunluğunun, diğer organizmalardaki proteinlerle benzerlik göstermemesidir. *R. equi* nin kendine has özel bir virülens mekanizması vardır. Diğer bakterilerde homologları bulunan iki protein, transkript regülatörleridir (Meijer ve Prescott, 2004).

Tablo 4. *R. equi*'de virülensle ilişkili genler

Susturma etkisi (Knock out)	Susturulan Gen/Operon	Gen lokasyonu	Model	Açıklama
Attenüasyon	<i>aceA</i>	Kromozom	Fare, tay	İzositrat liyaz, gliooalat yanyolu aracılığıyla lipid metabolizması ve karbon asimilasyonu
	<i>htrA</i>	Kromozom	Fare	Serin proteaz
	<i>virS (orf8)</i>	Virülens plazmidi	Fare	İkili komponent sistemi cevap düzenleyicisi
	<i>narG</i>	Kromozom	Fare	Nitrat redüktaz, oksijen yokluğunda solunum düzenleyici
	<i>pepD</i>	Kromozom	Fare	Peptidaz D
	<i>vapA</i>	Virülens plazmidi	Fare ve tay	Lipid modifiye yüzey proteini
	<i>virR (orf4)</i>	Virülens plazmidi	Fare	LysR tip transkripsiyon düzenleyici
Hipervirülens	<i>icgA (orf5)</i>	Virülens plazmidi		
	<i>phoP/R operon</i>	Kromozom	Fare	Magnezyum ihtiyaçlı ikili komponent sistemi düzenleyicisi (<i>PhoP/PhoQ</i>)
	<i>sodC</i>	Kromozom	Fare	Süperoksit dismutaz, oksidatif stres detoksifikasyonu

von Bargen ve Haas, (2009)' dan modifiye edilmiştir.

Tablo 5. *R. equi*' de virülensle ilişkili olmayan genler

Susturulan Gen/Operon	Gen lokasyonu	Model	Açıklama
<i>choE</i>	Kromozom	Fare, tay	Kolesterol oksidaz
<i>cipB</i>	Kromozom	Fare	Varsayılan ısı şoku proteini
<i>fadD8</i>	Kromozom	Fare	Asil CoA sentezi, lipid metabolizması
<i>fbpA</i>	Kromozom	Fare	Mikobakteriyel antijen 85 homoloğu, mikolil transferaz, kapsül sentezi (varsayılıyor)
<i>fbpB</i>	Kromozom	Fare	Mikobakteriyel antijen 85 homoloğu, mikolil transferaz
<i>furA</i>	Kromozom	Fare	Demir ihtiyaçlı transkripsiyon düzenleyici
<i>Gale</i>	Kromozom	Fare	Galaktoz epimeraz
<i>glnA1</i>	Kromozom	Fare	Glutamin sentez, azot metabolizması
<i>lupABC</i>	Kromozom	Fare	Demir alımıyla ilgili operon
<i>Orf10</i>	Virülans Plazmidi	Fare	Belirsiz fonksiyon, makrofajlarda kuvvetli transkripsiyon artışı
<i>purC</i>	Kromozom	Fare	1-fosforibosilaminoimidazol-sukinokarboksamid sentez, pürin biyosentezi
<i>regX3</i>	Kromozom	Fare	Cevap düzenleyici
<i>sigF</i>	Kromozom	Fare	Alternatif σ faktör

von Bargen ve Haas, (2009)' dan modifiye edilmiştir.

2.7.1.1. ORF 8 ve ORF 4

ORF8 (pVAP_0530), gen ekspresyonunu düzenlemek için genellikle bir sensör kinaz protein ile etkileşime geçen bir tepki regülatörünü şifreler. Çevresel bir sinyale tepki olarak korunan, histidin kalıntısı olan son otofosforlardan bir fosfat, tepki regülatörde korunan bir aspartat kalıntısına aktarılır, bu da transkripsiyonel aktivasyonla sonuçlanır. Virülens plazmidi bir tepki regülatörü şifrelemesine rağmen, sensör kinaz şifrelemez, bu da ORF8 gen ürününün kromozomal şifrelenmiş bir sensör kinaz proteini ile etkileşime geçtiğini gösterir. PhoP/ PhoQ sistemi, makrofajın fagozomunda başlatılan *Salmonella typhimurium*' un iki-unsurlu sistemin bir örneğidir (Alpuche ve ark, 1992). İç membran sensör kinaz olan PhoQ, katyon konsantrasyonundaki değişikliklere tepki verir ve bu sinyali sitoplazmik tepki regülatör olan, PhoP'e aktarır. PhoP, patojenisite adası I, SPI-1 üzerindeki invazyon genlerini düzenler (Groisman, 2001). Bu düzenleyici sistem, *Yersinia pestis*' te de tanımlanmıştır ve makrofaj kaynaklı stres koşullarında hayatta kalabilme için önemli olduğu gösterilmiştir (Oyston ve ark, 2000).

ORF4 (pVAP_0480), LysR tipindeki transkripsiyonel regülatörlere (LTTR) homolog olan bir proteini şifreler. LTTR, iki komponent tepki regülatörlerden sonra, ikinci büyük bakteriyel düzenleyici proteinler sınıfıdır (Schell, 1993). Bu familyada bulunan 100'den fazla protein geniş bir yelpazedeki bakteriyel süreçleri, örneğin bakteriyel karbondioksit fiksasyonu (CbbR) ve patojenlerde oksijen stres tepkisini (OxyR), kontrol eder. Virülans gen regülasyonu

ile ilişkili olan bir takım LTTR tanımlanmıştır. Örneğin, *Salmonella typhimurium*'un 90 kb'lık virülans plazmidini tarafından şifrelenen *SpvR*, geç üreme fazı gibi koşullara tepki olarak *spv* operonunu düzenler (Caldwell ve Gulig, 1991).

virR ve *virS*, *vapA* ve PAI'daki diğer genlerin ekspresyonunu düzenler. *virR*, başlatıcısı (promoter) olan P_{virR} 'yi negatif olarak otoregüle eder, bu da *vir* operonunun düşük düzeyde transkripsiyonunu başlatır. Bununla birlikte, 37°C'de ve asidik pH'da, *virR* geninde bulunan diğer bir başlatıcı (P_{orf5}) aktive olarak, ORF8'in de bulunduğu downstream genlerinin transkripsiyonunu başlatır (Byrne ve ark, 2007). Bundan sonra *virR* ve *virS* birlikte, *vapA* başlatıcısının ve muhtemelen farklı *vapA*-koekspresyonel ünitelerin ekspresyonunu başlatırlar.

2.7.1.2. Diğer ORF'ler

ORF21'in *M. tuberculosis*'de homologu (Rv1885c) vardır. Bu protein, salgılanan bir korismat mutazdır ve aromatik amino asitlerin biyosentezi için shikimate yolunun bir enzimidir. Bu proteinin ekstraselüler konumu, shikimate yolu genelde sitoplazmada gerçekleştiği için tam açıklanamaz. Salgılanmış korismat mutaz proteinlere ayrıca *S. typhimurium*, *Erwinia herbicola* ve *Pseudomonas fluorescens*'de rastlanmıştır (Calhoun ve ark, 2001). Bitkilerin nematod bir patojeni olan *Meloidogyne javanica*, bitkilerin gelişmesi ve korunması için önemli olan shikimate yolunu etkileyen hücre dışı korismat mutaz üretir (Lambert ve ark, 1999). Bu nematod enzimin bitkilerdeki artmış ekspresyonu konak bitki hücrelerinin gelişmesine katkıda bulunmuş, bu sonuç da yayıncının, bu enzimin nematodların konak bitki ile parasitik bir ilişki kurmasına yardımcı olduğunu öne sürmesine neden olmuştur (Lambert ve ark, 1999). Başka bir alternatif olasılık, ORF21 tarafından şifrelenen proteinin aromatik aminoasitlerin biyosentezinde rol almaması, fakat yapısal olarak korismata bağlantılı olan bir substratı kullanarak korismat mutaz reaksiyonuna benzer bir reaksiyonu katalizleyebilmesidir.

ORF5 tarafından şifrelenen proteinin şeker permeazlara (Pfam 00083) aşırı benzerlik göstermesi nedeniyle integral membran proteini olduğu tahmin edilmektedir.

ORF3 (pVAP_470), SAM MTase (S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase) şifreleyerek muhtemelen proteinlerin, DNA'ların ya da küçük moleküllerin metilasyon kaynaklı regülasyonunu yapar.

ORF1 (lsr2) (pVAP_0440) mikobakteriyel nükleotid bağlantılı protein Lsr2'nin homologunu şifreler. Bu protein reaktif oksijen ara maddelerine karşı koruma, mikolik asit

içeriği kontrolü ve biyofilm formasyonu ile ilgilidir (Chen ve ark, 2006; Arora ve ark, 2008; Colangeli ve ark, 2009)

ORF 10 (vcgB) (pVSP_0570) patojenik mikobakterilerde korunan bir proteini şifreler (Miranda-Casoluengo ve ark, 2011).

2.7.2. Virülens Plazmid Gen Ekspresyonu Regülasyonu

Makrofağlardaki başarılı invazyon ve hayatta kalma tamamen çevresel sinyallere verilen yeterli tepkiye dayanır. Bu yüzden bakteriler, çevresel sinyalleri algılamak ve birleştirmek için kompleks düzenleyici ağlar kullanırlar ve bu da sonuçta çevredeki zorlukları karşılamak üzere adapte olan bir gen ekspresyonu şablonu oluşmasına yol açar. Tepkisinin çevresel koşullar tarafından kontrol edildiği gösterilen ilk gen *vapA*'dır. Bu genin ifadesinin, yüksek ısı (37°C) ve düşük pH'(6,5) da oluşan maksimum ifade ile ısı ve pH'a tepki verdiği gösterilmiştir (Takai ve ark, 1996). Bundan sonra, VapA homologları olan VapC, D, E'nin de VapA' ya benzer bir şekilde termoregüle oldukları gösterilmiştir (Byrne ve ark, 2001). *R. equi* H₂O₂'a mazur bırakıldığında VapA ve VapG'nin oksidatif stres koşulları altında upregüle oldukları görülmüştür (Benoit ve ark, 2000). *R. equi* konak tarafından alınımından sonra, oksidatif stres, pH'da düşüş ve ısı artışıyla karşı karşıya kalır, bu da virülens faktörlerinin varlığını işaret eder. Bu yüzden *vap* genlerinin gen düzenleme şablonu, virülens faktörleri olarak varsayılan rolleriyle tutarlıdır.

Virülans plazmid gen ekspresyonu analizi için bir DNA mikrodizilimi oluşturulmuş, bu dizilim kullanılarak, patojenite adasındaki genlerin ifadesini etkileyen ek çevresel koşullar olarak demir ve magnezyum derişimi tanımlanmıştır (Ren ve Prescott, 2003). 30°C'den 37°C'ye yükseltile üreme ısıyla upregüle edilen altı *Vap* genini de kapsayan toplam oniki gen, düşük demir koşullarında daha fazla upregüle olmuş ve azaltılmış magnezyum derişiminde down regüle olmuştur. İkinci bir grup, demir ve magnezyuma tepki olarak ters düzenleme şablonu sergilemiştir. ORF 3, 9 ve 10 düşük demir tarafından down regüle olmuş ve düşük magnezyum derişimi tarafından upregüle olmuştur. Virülans plazmid genlerinin makrofağ tarafından alındıktan sonra transkribe edilip edilmediği önemlidir. Virülens plazmid DNA dizilimi kullanılarak, 30°C'deki kısıtlanmayan üreme koşulları altındaki *R. equi*'ye kıyasla, sadece patojenisite adası genlerinin at makrofağları içinde farklı olarak transkribe edildiği gösterilmiştir. Bunlar *vap* genlerini içerirler. *R. equi*'ye özgü ve işlevi bilinmeyen iki gen olan ORF 9 ve 10 en sık eksprese edilenlerdir.

Patojenite adasındaki genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi karmaşıktır ve en azından beş çevresel sinyale dayanır: ısı, pH, oksidatif stres, magnezyum ve demir. Kakuda ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada (2015), fonksiyonel *VirR* yokluğunda, *VirS* ekspresyonunun, vap genlerinin transkripsiyonunu *VirR* varlığındaki miktara kadar arttırdığını bulmuştur. Bu bulgular, vap genlerinin transkripsiyonunun *VirS* ile yapıldığını ve *VirR*'nin ısı ve pH' ya verilen transkripsiyonel tepkilerde rol aldığını gösterir. Günümüze kadar, demire bağlı gen ekspresyonunu yöneten iki transkripsiyonel represör olan Fur ve IdeR tanımlanmıştır (Hantke, 2001). Bu proteinlerin birbiriyle ilişkisi olmamasına rağmen, benzer bir işleyiş gösterirler. Her ikisi de, Fe²⁺ mevcudiyetinde, kendilerinin homolog bağlanma bölgelerine bağlanır ve transkripsiyonu baskırlar. Fe²⁺ yokluğunda proteinler bağlanma bölgelerinden salınırlar ve transkripsiyondaki baskılama kısmen giderilmiş olur. *R. equi*'nin bir *ideR* homologu klonlanıp *E. coli* içinde eksprese olmuştur. *R. equi* IdeR proteinin işlevsel olduğu gösterilmiştir; ortak IdeR tanıma sekansına bağlanır ve Fe²⁺ bağımlı gen ekspresyonunu düzenler (Boland, 2000). *vapA* geninin promotör bölgesi, bir IdeR ortak bağlanma bölgesi içerir (Ren ve Prescott, 2003), bu da bu genin demirle ilişkili fonksiyonunun *IdeR* tarafından yönetilme ihtimalini işaret eder.

2.8. Bağışıklık

Taylardaki Rhodococcosis ile mücadele için bir aşı geliştirilmesi konusunda şimdiye kadarki çalışmaların tam başarı elde edememiş olması, *R. equi* enfeksiyonunda bağışıklığın önemini arttırır. Elde edilmiş bulgular *R. equi*'ye karşı konak direncinin kompleks bir mekanizma olması, hem maternal, hem kazanılmış bağışıklık sistemleriyle ilgisi ve kazanılmış bağışıklık sistemi içinde, hem antikor hem de T lenfosit cevaplarına bağlı olduğunu işaret eder (Dawson ve ark, 2010; Giguère ve ark, 2011).

2.8.1. *R. equi* – Fagositik Hücre Etkileşimleri

Bakteriler eğer *R. equi* spesifik antikor ile opsonize olmuş ise, makrofajlara Fc reseptör yolu ile girerler, RCV akıbeti değişir ve fagozom-lizozom füzyonu gerçekleşir (Hietala ve Ardans, 1987). Bu olaylar dizisi, *R. equi* antikorunun, enfeksiyonun önlenmesindeki muhtemel önemini gösterir. Murin makrofajlarında *R. equi* öldürülmesi ancak INF- γ varlığında gerçekleşir. INF- γ makrofajları ROI ve NOI üretmesi yönünde aktive eder. Bu iki radikal birleşerek *R. equi*'yi etkili biçimde öldüren peroksinitrit oluştururlar. Ne NOI, ne de ROI tek

başına *R. equi* öldürmede etkili değildirler (Darrah ve ark, 2000). Makrofaj aktivasyonu ve NO sentezi, en azından makrofajların demir depolama yeteneğini artırarak *R. equi* tarafından kolayca ulaşılmasını engelleyerek kısmi olarak görev yapmış olur (von Bergen ve ark, 2011). TNF- α gibi diğer sitokinler de *R. equi*'nin hücre içinde üremesini kısıtlarlar. Yapılan bir çalışmada hem IFN- γ 'nın hem de TNF- α 'nın farelerde virulent *R. equi*'nin temizlenmesi için gerekli olduğu saptanmıştır (Kasuga-Aoki ve ark, 1999). Nötrofiller de virulent *R. equi*'ye karşı erken konak savunma mekanizmalarında önemli bir role sahiptir (Takai ve ark, 1986; Yager ve ark, 1987; Martens ve ark, 2005). *R. equi*'nin nötrofiller tarafından öldürülmesi, makrofajlarda olduğu gibi spesifik antikor ile opsonizasyonla gerçekleşir (Hietala ve Ardans 1987; Yager ve ark, 1987).

2.8.2. Antikor Kaynaklı Bağışıklık

Antikorların *R. equi*'ye karşı koruyucu rolünün en büyük kanıtı, pasif aktarılan anti- *R. equi* hiperimmün equine plazmasının (HIP) kısmi koruyucu etkisidir (Bu konuda yapılan çalışmalardan ayrıntılı olarak 2.12.2 bölümde bahsedilmiştir). *R. equi*'nin spesifik antikorla opsonizasyonunun, alveolar makrofajlar tarafından fagositozu ve öldürülmesini artırması, antikorların HIP'nin önemli bir komponenti olarak tanımlanmasını sağlar (Hietala ve Ardans, 1987; Dawson ve ark, 2011).

Bir kısım çalışma, antikorların spesifik olarak plazmid kökenli Vap proteinlerine etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. İlk olarak, VapA monoklonal antikor ve kısmi olarak saflaştırılmış VapA ile immunize edilen atlardan alınan serum, opsonizasyon etkisi gösterir (Prescott ve ark, 1997). Kısmen saflaştırılmış VapA ile aşılanan atlardan elde edilen saflaştırılmış immunoglobulinler, aşılammamış atlardan elde edilen immunoglobulinlerin aksine fareleri intraperitoneal virulent *R. equi*'ye karşı korumuştur (Fernandez ve ark., 1997). Son olarak rekombinant VapA ve VapC ile aşılanan atlardan elde edilen saflaştırılmış immunoglobulinlerin, deneysel olarak *R. equi* ile enfekte edilmiş taylara IV olarak verildiğinde, bu taylardaki pnömoninin şiddetini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Hooper-McGrevy ve ark., 2001).

Yetişkin atlarda, *R. equi* ve VapA spesifik IgGa ve IgGb antikorları (atlarda komplemanı tercih eden ve opsonize eden IgG izotipleri), virulent *R. equi* ile deneysel intrabronşiyal enfeksiyonu takiben belirgin artış göstermiştir (Lopez ve ark., 2002). Taylarda, *R. equi*'ye doğal maruz kalma sonrası VapA ve VapC antikorlarının üretiminde artış gözlemlenmiştir (Hooper-McGrevy ve ark, 2001). Doğal yolla enfekte edilen taylarda subizotip cevabının

karakterizasyonu, IgGa, IgGb ve IgG (T) de artış göstermiştir (Hooper-McGrevy ve ark, 2001; Takai ve ark, 2002). Deneysel olarak düşük dozda virulent *R. equi* ile enfekte edilen genç taylarda subklinik pulmoner lezyonlar oluşmuş ve serum IgGa ve IgGb seviyelerinde belirgin artış gözlenmiş, son konsantrasyonlar aynı deneysel enfeksiyona tabi bırakılan yetişkin atlardaki konsantrasyonlardan belirgin biçimde daha fazladır (Jacks ve ark, 2007). İlginç olarak, aynı yaştaki tayların daha yüksek dozda *R. equi* ile deneysel enfeksiyonu sonucu klinik pulmoner hastalık oluşmuş ve predominant IgGa cevabından, pik yapan IgG(T) cevabına geçiş gerçekleşmiş, bu da *R. equi* inokulum büyüklüğünün bağışıklık cevabını değiştirdiğini işaret etmiştir (Jacks and Giguère, 2010).

2.8.3. Hücresel Bağışıklık

R. equi'nin fakültatif hücreiçi doğasından ötürü, enfeksiyona karşı dirençte hücresel bağışıklık mekanizmalarının büyük önem taşıdığı düşünülür. *R. equi* enfeksiyonlarına karşı olan hücresel bağışıklığa ait bulguların çoğu fare modeli üzerinden gelir. Komplemant sistem elemanı C5 ve NK (Doğal öldürücü hücre – Natural Killer Cell) eksikliği, *R. equi*'nin akciğerlerden temizlenmesini engellemez (Yager ve ark, 1991). Buna zıt olarak, foksiyonel T lenfositler virulent (plazmid pozitif) *R. equi*'nin fare modelinde temizlenmesinde şarttır (Kanaly ve ark, 1995; Ross ve ark, 1996; Madarame ve ark, 1997). Buna rağmen timussuz fare (Fonksiyonel T lenfositlerden arınmış) modeli, plazmidsiz avirulent bakteriyi enfeksiyondan sonraki 1 hafta içinde akciğerlerinden temizleyerek; virulent suşların aksine, avirulent (plazmidsiz) suşların temizlenmesi için foksiyonel T lenfositlere ihtiyaç olmadığını, bu temizlenmenin daha çok humoral hücrelere bağlı olduğunu gösterir (Madarame ve ark, 1997).

Hücreiçi patojenlerin temizlenmesinde T lenfositlerin kullandığı iki temel mekanizma sitokinlerin sekresyonu ve direkt sitotoksitedir. Farelerde, *R. equi*'ye karşı konak savunmasında hem CD4 (yardımcı) hem de CD8 (sitotoksik) T hücreleri görev alsa da, akciğerlerden temizlenme için mutlaka gerekli olan ve asıl rolü oynayan hücreler CD4 T lenfositlerdir (Nordmann ve ark, 1992; Kanaly ve ark, 1993; Ross ve ark, 1996). Farelerdeki çalışmalar göstermiştir ki, CD4 T hücrelerinden IFN- γ salımıyla karakterize Tip-1 cevap enfeksiyonun akciğerlerinden temizlenmesini etkilemek için yeterliyken, IL-4 salımıyla karakterize tip-2 cevap zararlıdır (Kanaly ve ark, 1995, 1996).

Taylardan zıt olarak, yetişkin atlar tipik olarak *R. equi* enfeksiyonlarına dirençlidirler. Bu yüzden yetişkin atlar, enfeksiyona karşı bağışıklık mekanizmalarında hangi cevapların önemli olduğu ile ilgili çalışmalarda model olarak kullanılmaktadır. Yetişkin atlardan virulent *R.*

equi'nin temizlenmesi; BAL (Bronkoalveolar) sıvısında CD4 ve CD8 lenfosit sayısının, *R. equi* antijenlerine lenfoproliferatif cevapların, *R. equi* spesifik CTL, CD4 ve CD8 T lenfositlerden IFN- γ endüklenmesinin belirgin şekilde artmasıyla karakterizedir (Hines ve ark, 2001; Lopez ve ark, 2002; Patton ve ark, 2005). *R. equi* spesifik CTL, tüm yetişkin atlarda bulunur ve MHC sınıf I-kısıtlanmamıştır ve bakterinin hücre duvarından, özel lipid molekülleri tanıma yeteneğine sahiptir (Patton ve ark, 2005; Harris ve ark, 2010). Bu lipid antijenlerin, *M. tuberculosis*' de ayrıntılı açıklandığı (Pargass ve ark, 2009) gibi T lenfositlere, CD1 sistem tarafından sunulduğu düşünülür. Farelerdeki ve yetişkin taylardaki bu bulguların taylarla nasıl ilişkilendirileceği, günümüzde aktif çalışmalara alan oluşturmaktadır.

2.8.4. Yeni Doğan Tayların *R. equi* Bağışıklığı

Yeni doğanların immün yanıtları yetişkinlerde olduğundan hem nitelik ve hem de nicelik bakımından farklılık gösterir. Yeni doğanlar immunolojik olarak sadece güçsüz değil, yetişkinler ile karşılaştırıldığında azalmış birçok immünolojik fonksiyonlara sahiptirler, bunların bazıları taylarda belgelenmiştir. Örneğin, tayların antijen sunan hücreleri yetişkin atların hücreleri ile karşılaştırıldığında daha düşük CD1 ve MHC tip II eksprese ederler (Flamino ve ark, 2009; Pargass ve ark, 2009). Buna ek olarak, *R. equi* spesifik CTL aktivitesi, 3 haftalık taylarda düşükken, 8 haftalık taylarda, yetişkin atlardaki seviyeye ulaşır (Patton ve ark, 2005). *R. equi* ile tayları oral aşılama *R. equi*-spesifik CTL gelişimini hızlandırabilir. Monosit, at lenfosit ve nötrofillerin sitokinleri üretme ve düzenleme yetileri, aynı şekilde yaştan etkilenmektedir (Boyd ve ark, 2003; Adkins ve ark, 2004; Breatnach ve ark, 2006; Flamino ve ark, 2009; Liu ve ark, 2009; Nerren ve ark, 2009). Genellikle, yeni doğanların Th2 yanlılığına sahip oldukları ve hücre içi patojenlerin temizlenmesi için gerekli Th1 yanıtlarını oluşturacak yeterli yeteneğe sahip olmadıkları düşünülmektedir (Boyd ve ark, 2003; Breatnach ve ark, 2006). Ancak, tayların mitojenlere, canlı *R. equi*'ye ya da ölü adjuvant aşıya karşı IFN- γ yanısıra IL-4 salgılamadaki yetersizlikleri, Th2 cevabına doğru açık bir kutuplaşmanın olmadığını da göstermektedir (Liu ve ark, 2011; Ryan ve Giguère, 2010; Wagner ve ark, 2010). Taylarda monosit türevli dendritik hücreler *R. equi*'ye tepki verebilir ve Th1 uyarıcı sitokin IL-12 eksprese edebilirler (Wagner ve ark, 2010). Ayrıca, genç tayların *R. equi* ile deneysel enfeksiyonu yetişkin atlara benzer şekilde IFN- γ üretimi ve antikor yanıtları ile sonuçlanmıştır (Jacks ve ark, 2007).

R. equi pnömonisinin deneysel olarak yaratıldıktan sonra spontan olarak iyileşmesi çeşitli çalışmalarda görüşmüştür (Martens ve ark 1989; Perkins ve ark, 2001; Caston ve ark, 2006).

Hastalığın endemik görüldüğü çiftliklerdeki bir çok tay hastalığa yakalanmaz ya da subklinik yakalanarak farkedilmeden düzelir (Venner ve ark, 2012 a, b). Bununla birlikte, canlı, virulent *R. equi*'nin yeni doğanlara intragastrik verilmesinden sonra, deneysel oluşturulan ağır intrabronşial enfeksiyona tam korunma gözlenmiştir (Chirino-Trejo ve ark, 1987; Hooper-McGrevy ve ark, 2005). Virulent *R. equi* ile oral inokulasyon, spesifik CTL'lerin hızlanarak gelişmesiyle neticelenmiştir (Harris ve ark, 2011), bu da oral inokulasyona karşı bir bağışıklık mekanizmasını göstermektedir. Sonuç olarak tüm bu bulgular, farklı düzeylerde olarak, çoğu tayın *R. equi*'ye karşı bağışıklık geliştirebildiğini, hastalığa yakalanan tayların bu yatkınlığının sadece tek bir nedenle değil, kompleks ve birçok farklı sistemi içeren bir açıklaması olduğunu gösterir.

2.9. Klinik Bulgular

R. equi'nin taylarda en tipik klinik görüntüsü kronik supuratif bronkopnömoni ve akciğer abseleridir. Hastalığın yavaş seyri, hasta tayların kaybedilen akciğer dokusunu kompanse edemedeki üstün yeteneklerine eklenince erken klinik tespiti zorlaştırır. Erken klinik semptomlar genellikle hafif ateş, seyrek öksürük ya da nefes sıklığında egzersiz ve stresle belirgin hale gelen hafif artıştır. Eğer pnömoni devam ederse, öksürük (% 71), ateş (% 68), letarji (% 53) ve artmış nefes zorluğu (% 43) gibi daha belirgin semptomlar ortaya çıkar. Etkilenen tayların küçük bir yüzdesi, uygun tedaviye rağmen düzelmeyen subakut form gösterirler. Bu taylar ölü bulunabilir, ya da öncü belirtiler olmadan yüksek ateş ve akut solunum stresi gösterebilirler (Chaffin ve ark, 2011).

R. equi endemik görüldüğü çiftliklerde sistemik tarama çalışmaları yapıldığında, en yaygın görülen tablo klinik belirti göstermeksizin ultrasonik muayenelerde periferik pulmoner konsolidasyon ya da abseleşme gösteren taylardır (Slovis ve ark, 2005; Venner ve ark, 2007). Genelde, taylarda pulmoner ultrasonografik değişikliklerin görülme sıklığı, klinik belirtilerin görülme sıklığından çok daha fazladır, bu da birçok subklinik tayın tedavisiz kendiliğinden iyileştiğini göstermektedir. Bu konuda son zamanlarda endemik çiftliklerde yapılan iki farklı çalışmada, ultrasonografik bulgular taşıyan tayların % 80-90'ı antibiyotik tedavisi olmadan iyileşmiştir (Chaffin ve ark, 2012; Venner ve ark, 2012).

R. equi'nin ekstrapulmoner hastalıkları (EPD) yaygındır (Reuss ve ark, 2009). Bazı EPD'ler, özellikle abdominal lezyonların antemortem tespitinin zor olmasına ve ancak nekropside tespit edilebilmelerine rağmen, yapılan bir çalışmada, bir araştırma hastanesine

getirilen 150 tayanın % 74'ünde 39 farklı EPD den en az biri tespit edilmiştir (Reuss ve ark, 2009). Hayatta kalma oranı, EPD'li taylarda % 43 iken EPD'siz taylarda % 82 dir (Reuss ve ark, 2009).

En sık tespit edilen EPD, hasta tayların yaklaşık % 50'sinde görülme oranıyla barsak lezyonlarıdır (Zink ve ark, 1986). Buna rağmen *R. equi* pnömonili tayların çoğu klinik barsak semptomları göstermez. Aynı çalışmada, tayların sadece % 4'ü klinik pnömoni göstermeyip barsak lezyonları göstermiştir (Zink ve ark, 1986). *R. equi* barsak formu, multifokal ülseratif enterokolitis, Peyer's plakları bölgesinde tifilitis, mezenterik ve kolonik lenf yumrularının granulomatoz ve supuratif enflamasyonu ile karakterizedir (Zink ve ark, 1986). Bazı vakalarda, tek abdominal lezyon genellikle mezenterik lenf yumrularında oluşan ve sıklıkla ince ya da kalın barsağa tutunan tek bir büyük bir absedir. Abdominal absesi olan tayların prognozu genellikle kötüdür (Reuss ve ark, 2009). Barsaklardaki enfeksiyon, patojenin ağız yoluyla alınmasıyla ya da akciğerdeki odaklardan disseminasyonla gerçekleşebilir.

R. equi bakteriyemi sanılandan daha yaygın olabilir ve metastazik yayılmayla sonuçlanabilir. Organizmanın akciğerlerden ya da sindirim kanalından kan yoluyla yayılması, zaman zaman septik artritis ve daha sık olarak osteomyelitisle sonuçlanabilir. Buna rağmen, taylar zaman zaman, tespit edilebilir akciğer hastalığı olmadan *R. equi* septik artritis ya da osteomyelitis gösterebilir. Tayların topallığının derecesi, *R. equi* kaynaklı septik artritisle, aseptik polisinoovitis tanısını ayırt etmede yardımcı olur. İki olasılıktan şüpheli vakalarda gerekli antimikrobiyel tedaviye ek olarak, sinoviyal sıvının bakteriyel kültürü ve sitolojisi yapılmalıdır. *R. equi* septik artritis ve osteomyelitisli taylar genellikle lokal agresif tedavi gerektirirler. *R. equi* vertebral osteomyelit ve diskospondilitis ve sonucunda vertebral kompresyon rapor edilmiştir (Giguère ve Lavoie, 1994; Olchowy, 1994; Chaffin ve ark, 1995). Diğer seyrek görülen EPD'ler perikarditis, endokarditis, selülitis, dermatitis, subkutan abseleşme, periferik lenfadenopati, guttural pouch ampiyemi, pleuritis, sinuzitis, ülseratif lenfanjitis, miyozitis, stomatitis, pyometra ve omfalitistir (Janicek ve ark, 2006; Reuss ve ark, 2009).

İmmün kaynaklı enflamatuar hastalıklar da sıklıkla *R. equi* enfeksiyonuyla ilişkilendirilir. Etkilenen tayların 1/3-1/4'ünde aseptik polisinoovitis görülür, hatta birden fazla eklemde şişmesi ilk belirtilen şikayettir (Sweeney ve ark, 1987; Madison ve Scarratt, 1988).

Bazı taylar, *R. equi* enfeksiyonu ile birlikte uveitis, keratoüveitis ve panoftalmitis gibi oküler semptomlar gösterirler (Reuss ve ark, 2009). Bu lezyonlar, direk disseminasyon sonucu ya da *R. equi*'ye sistemik enflamatuar cevapla oluşur. Diğer immün kaynaklı EPD'ler immün kaynaklı hemolitik anemi, immün kaynaklı trombositopeni ve telojen efliviyumdur (Reuss ve ark, 2009; Johns ve ark, 2011).

Pek çok yetişkin at enfeksiyona karşı bağımsızlık sahibi olduğundan rhodococcal hastalık yetişkin atlarda pek sık görülmez, fakat sporadik bazı vakalar bildirilmiştir (Ozgun ve ark, 2002; Vengust ve ark, 2002). Taylarda olduğu gibi, en yaygın klinik belirtiler süperatif bronkopnömoni ile bağlantılıdır. Bazen, plevrit görülebilmektedir. Diğer bildirilen belirtiler barsak lezyonları, lenfadenit, yara enfeksiyonları, osteomyeliti içermektedir. Yetişkin bir atta bilinmeyen bir nedenle beliren immunosupresyon sonucu *R. equi* septisemisi ve akciğerlerde abseleşme gözlenmiştir (Freestone ve ark, 1987). Organizmanın yetişkin atlardan izole edildiği her iki vaka da değerlendirilmiş ve virülans plazmidin mevcut olduğu gözlemlenmiştir (Ozgun ve ark, 2002; Vengust ve ark, 2002). *R. equi* enfeksiyonu olan yetişkin atların bağımsızlığının baskılanmış olduğu görülmüş ve her olguda bağımsızlık durumu değerlendirilmemiş olsa da, immün yetmezliği iki olguda bildirilmiştir (Freestone ve ark, 1987; Veronck ve ark., 2004).

2.10. Tanı

Hastalığın hızlı ve doğru teşhisinin yapılabilmesi; erken tanı ve tedaviyle prognozun iyileştirmesi açısından önemlidir. Sadece klinik bulgulara dayanarak, diğer patojenlerin neden olduğu pnömoniye, *R. equi* pnömonisinden ayırt etmek zordur. American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) konsensüs açıklamasında *R. equi* enfeksiyonu tanı, tedavi, kontrol ve önlenmesine ilişkin kanıtları gözden geçirmiş ve delillerin gücüne dayalı öneriler yapmıştır (Giguère ve ark, 2011). Bronkopnömoni için konsensüs ifadesi; aşağıdaki belirtilerden bir ya da daha fazlasına sahip taylardan trakeobronşial aspirasyon (TBA) sıvısından polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanarak *vapA* geni amplifikasyonu veya bakteriyolojik kültür üzerine tanı konmasını önermektedir: (1) alt solunum yolu hastalığının klinik bulguları, (2) sitolojik septik hava yolu inflamasyonu kanıtı, ya da (3) bronkopnömoniyeye dair radyografik veya ultrasonografik bulgular (Giguère ve ark, 2011). Ekstrapulmoner enfeksiyonlar için, tanının; enfeksiyon bölgesinden alınan örneklerden *vapA*'nın PCR amplifikasyonu veya hücre kültürüne dayalı yapılması tavsiye edilmektedir. *R. equi*'nin enfeksiyon bölgesinde tespit edilemediği, polisinoit ve üveit gibi vakalarda tanı; TBA veya diğer birincil enfeksiyon bölgesinden edinilen örnekten *R. equi*'nin identifikasyonuna dayalı olarak konulmalıdır. PCR ile *vapA* amplifikasyonu tek başına kullanılmamalıdır, çünkü ne diğer bakteriyel patojenlerin tanımlanmasına olanak sağlar ne de *R. equi* izolatlarının in vitro antimikrobiyal duyarlılık testine olanak tanır. Bu önerileri destekleyen kanıtların güçlü oldukları görülmüştür

2.10.1. Sitoloji

Sıvı örneklerin sitolojik değerlendirmesinde hücre içi Gram-pozitif pleomorfik çubukların görülmesi rhodococcal enfeksiyon tanısını desteklemektedir. Immun boyama prosedürleri de organizmanın bulunmasına yardımcı olmak üzere kullanılmıştır (Anzai ve ark, 1997; Sonmez ve ark, 2011). Organizmalar düşük sayılarda bulunabilir ve tespitleri zor olabilir. Sweeney ve arkadaşları (1987) 48 adet kültür pozitif sonuçlu tayın % 61'inde TBA sıvı sitolojisinde *R. equi* ile tutarlı organizmaların görüldüğünü bildirmişlerdir. Benzer şekilde, dolaylı bir floresan antikor tekniği kullanılarak, deneysel rhodococcal pnömoni başlatılmış 53 tayın % 62,3'ünün TBA sıvısı pozitif bulunmuştur (Anzai ve ark., 1997).

2.10.2. Kültür

Kültür ve ardından izolatların klasik morfolojik ve biyokimyasal testlerle fenotipik analizi, *R. equi* tanısında altın standart olmuştur. Organizma, tipik olarak çeşitli yöntemlerle toplanan TBA sıvısından elde edilir (Anzai ve ark, 1997; Hashikura ve ark, 2000). Örnek alınırken, bazı tayların ileri derecede solunum stresi olduğu göz önünde bulundurulmalı ve dikkatli davranılmalıdır. Eklem sıvısı ya da periton sıvısı gibi diğer örnek sıvılar vakaya bağlı olarak eğer uygunsa kültürlenebilir. Kan kültürü insanlarda hassas bir tanı aracı olmasına rağmen taylarda rutin olarak uygulanmaz. Aralıklı ya da inatçı bakteriyemi taylarda düşünüldüğünden daha da yaygın olabilir (Leadon ve ark, 1988; Giguère ve Prescott, 1997; Sellon ve ark, 2001). Yapılan bir çalışmada 19 taydan 11'inin kan örnekleri pozitif kültür vermiş, bu tayların hayatta kalma oranı, negatif kan kültürülere kıyasla daha düşük bulunmuştur (Reuss ve ark, 2009).

R. equi kolonileri katı besiyerinde aerobik koşullarda genellikle 48 saatte görülür hale gelir. Eğer örnek alınan taylar antibiyotikle tedavi ediliyorsa, daha uzun inkübasyon süresi gerekebilir (Prescott ve Hoffman, 1993; Giguère ve Prescott, 1997; Anzai ve ark, 1997; Quinn PJ ve ark, 2002; Muscatello ve ark, 2007). Nadiren, antimikrobiyel tedaviden sonra organizma ancak anaerob koşullarda izole edilebilir (Prescott ve Hofmann, 1993). *R. equi* kolonileri genellikle düzensiz, yuvarlak, pürüzsüz, yarı saydam ve mukoid görülebilir. Genellikle ilk 4-7 günden sonra beliren somon pembesi renkleri vardır. *R. equi* ile aynı anda farklı patojenler de izole edilebilir (Falcon ve ark, 1985; Sweeney ve ark, 1987; Ainsworth ve ark, 1993). Hasta taylardan alınan izolatlar genelde farklı testlere tabi tutulmadan virulent kabul edilirler. İstenirse izolatlar virülens plazmidi ya da virülens ilişkili antijenlerin varlığına karşı test

edilebilir (Takai ve ark, 1994; Haites ve ark, 1997; Higuchi ve ark, 1997; Hashikura ve ark, 2000)

Rhodococcal pnömoninin tanısında TBA sıvısından kültürün güvenilirliği farklı çalışmalarda farklılıklar gösterir (Johnson ve ark, 1982; Hillidge, 1987; Lavoie ve ark, 1994; Giguère ve Prescott, 1997; Sellon ve ark, 2001; Muller ve Madigan, 1992). Bazı çalışmalarda nekropside akciğer parankimlerinden *R. equi* izole edilen tayların tümünün TBA sıvısı ekimleri pozitifken, diğer çalışmalarda sonuçlar kararsızdır. Üç farklı çalışmanın kombinasyonundan % 86'lık sensitivite tespit etmiştir (Giguère ve ark, 2003)

2.10.3. Nükleik Asit Amplifikasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çeşitli örneklerden edinilen *R. equi* türüne ait kromozom veya plazmid DNA'sını çoğaltmak için bir dizi PCR tekniği geliştirilmiştir (Bell ve ark, 1996; Monego ve ark, 2009). Bu tekniklerin, genel olarak az sayıda organizmayı dahi tespit ederek, hızlı ve güvenilir olduğu görülmüştür.

vapA için primerler kullanılarak, *R. equi* virulent suşları 24 saatten az bir süre içinde tespit edilebilir. *vapA* haricindeki diğer genler odaklı PCR, çevresel örneklerden ya da at haricindeki türlerden, özellikle insan hastalardan, alınan örneklerin tanımlanmasında yardımcı olabilir; ancak klinik hastalığı olan taylar için *vapA* amplifikasyonunun kullanılması önerilmektedir (Giguère ve ark, 2011).

PCR hassasiyetini değerlendirmek için yapılan çalışmaların sonuçları, spesifik tahlil ve karşılaştırma için kullanılan altın standart gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak geniş çapta değişiklik göstermektedir. Hassasiyet (sensitivite) yaklaşık olarak % 10 ila %100, özgüllük (spesifite) ise % 78 ila % 91 oranları arasında değişiklik göstermektedir (Anzai ve ark, 1997; Takai ve ark, 1998; Sellon ve ark, 2001; Venner ve ark, 2007). Hepsinde olmasa da bir çok çalışmada PCR'ın bakteriyel kültürden daha hassas olduğu görülmüştür.

Subklinik hastalığı olan veya ortamdaki *R. equi*'nin solunum yoluyla alınıp hava yollarının kontamine olduğu vakalarda tayların trakeasından edinilen *R. equi* sitoloji, kültür ve PCR ile tamamen identifiye edilebilir. *Rhodococcus equi* tay pnömonisinin endemik görüldüğü bir çiftlikte yürütülen bir çalışmada, hiçbir solunum hastalığı belirtisi göstermeyen 216 tayın 77'sinin (% 35) TBA sıvısı pozitif kültür vermiştir (Takai ve ark, 2001). Bu nedenle kültür ve PCR sonuçlarını yorumlarken, klinik muayene bulguları, laboratuvar değerlendirmeleri ve tanısal görüntüleme sonuçlarını göz önünde bulundurmak önemlidir. Hastalığın herhangi bir klinik bulgusu olmayan bir taydan *R. equi* izolasyonu muhtemelen tesadüfidir (Ardans ve ark,

1986). *R. equi* toz partiküllerinin solunmasıyla üst solunum yolunun kontaminasyonu sonucu, nasal svaplarda mevcut olabilir. Ayrıca, *R. equi* çok sayıda sağlıklı at dışkısında da mevcut olabilir (Woolcock ve ark, 1980; Nakazawa ve ark; 1983; Takai ve ark, 1986a; Takai ve ark, 1986b). Aynı zamanda, negatif dışkı kültürleri enfeksiyonu ekarte etmez. Enfekte tayların genellikle kontamine spütum yutmalarına rağmen, bu konu üzerine yürütülmüş bir çalışmada *R. equi* pnömonisi olduğu doğrulanmış 30 adet tayın sadece 5'inin (% 17) pozitif dışkı kültürleri olduğu tespit edilmiştir (Ardans ve ark, 1986). Bu nedenle herhangi bir taydan alınan tek bir dışkı örneğinin tanısal değeri yoktur. Bir çalışmada *R. equi* enterit erken tanısında yardımcı olarak haftalık kantitatif dışkı kültürlerinin kullanılabilceği savunulmuştur, çünkü klinik belirtilerin başlangıcında dışkı gramı başına bakteri sayısında artış görülmektedir (Takai ve ark, 1986).

2.10.4. Serolojik Testler

R. equi türüne özgü antikorları tespit etmek için geliştirilmiş serolojik testler; ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), AGID (Agar Gel Immunodiffusion) ve sinerjistik hemoliz inhibisyon testlerini içerir (Prescott ve ark, 1984; Takai ve ark, 1986c, Anzai ve ark, 1997; Witkowski ve ark, 2012). Antikor mevcudiyeti; maternal antikor transferi, etkene maruz kalmış olma ya da subklinik veya klinik hastalığın sonucu olabilir. Antikor tespiti için yapılan serolojik testler, bilimsel araştırmalarda *R. equi* humoral bağışıklık seviyelerini ölçmek için kullanılmıştır. Bu testler, rhodococcal enfeksiyonun klinik tanısında da kullanılmış olmalarına rağmen, performanslarını değerlendiren bağımsız çalışmalar zayıf hassasiyet, zayıf özgüllük, ya da her ikisinin birden düşüklüğünü göstermiştir (Hines ve ark, 2001). Yapılan çalışmalarda, klinik olarak sağlıklı birçok tayda, VapA spesifik antikorlar dahil olmak üzere *R. equi* antikorlarına rastlanmıştır. Bu antikorların bir miktarı maternal kaynaklı olabilir, ancak titreler tüm analizlerde zaman içinde önemli bir artış göstermiştir, bu durum da tayların rutin olarak virülans suşlar da dahil olmak üzere, *R. equi*'ye maruz kaldıklarını düşündürmektedir. Bir çalışmada eşleştirilmiş serumlarla beş farklı immunolojik test değerlendirilmiş, ancak tanısal doğruluğu arttırmada başarısız olmuştur (Martens ve ark, 2002). Endemik olmayan çiftliklerde kullanılması durumunda serolojik testlerin tanı değerlerinin artacağı ileri sürülmüş, ancak bu durum etraflica değerlendirilmemiştir (Martens ve ark, 2002; Phumoonna ve ark, 2005). ACVIM konsensüs açıklamasında serolojinin *R. equi* pnömonisi için tanısal test olarak kullanılmamasını önermiştir (Giguère ve ark, 2011)

2.10.5. Yardımcı Tanı Testleri

2.10.5.1. Klinik patoloji

CBC (Complete blood count/Tam Kan Sayımı), fibrinojen ve serum biyokimyası profili rhodococcal enfeksiyonu olduğundan şüphelenilen hastaların değerlendirilmesinde yararlı bilgiler sağlayabilir (Giguère ve Prescott, 1997). Ancak anormal değerler inflamasyon varlığını yansıtır, spesifik değildir. Nadir olgularda normal fibrinojen konsantrasyonlarına rastlanırsa da, hiperfibrinojenemi, en tutarlı laboratuvar bulgusudur. Monositozis eşliğinde ya da tek başına; nötrofilik lökositoz da yaygındır. WBC > 20,000 hücre/ μ l, fibrinojen konsantrasyonu > 700 mg/dl ve ultrasonografik pulmoner abse varlığı, *R. equi* pnömonisinde, diğer patojenlerin oluşturduğu pnemönilere kıyasla daha belirgindir (Leclere ve ark, 2011). Ancak, hem farklı patojen kaynaklı pnömonisi olan taylara karşılaştırıldığında hem de kendi içlerinde *R. equi* pnömonisi olan tayların fibrinojen konsantrasyonlarında ve lökosit sayımlarında bulunan önemli farklılıklar, bu testlerin spesifik tanı veya prognoz göstergeleri olarak değerini sınırlanmaktadır (Falcon ve ark, 1985; Sweeney ve ark, 1987; Lavoie ve ark, 1994; Giguère ve ark, 2003; Giguère ve ark, 2011; Leclere ve ark, 2011). Genellikle, akut ya da kronik enflamasyon ile ilişkili olan trombositoz, aynı zamanda *R. equi* enfeksiyonu ile bağlantılı olarak bildirilmiştir, ancak bu bulgu değişkendir (Leadon ve ark, 1988; Giguère ve Prescott, 1997). Hiperglobülinemi bazı taylarda görülebilir.

Serum amiloid A (SAA), enfeksiyöz hastalıklarda yararlı bir inflamatuvar belirteci olarak önerilen bir akut faz proteindir. Kısıtlı bir çalışmada, *R. equi* tanılı taylarda yüksek serum amiloid A (SAA) konsantrasyonları saptanmıştır (Hulten ve Demmers, 2002). İyileşen taylarda, fibrinojen konsantrasyonu artmadan ve nötrofil sayısı düşmeden önce SAA konsantrasyonunun düşmüş olması; SAA konsantrasyonlarının tedavi yanıtının takibinde faydalı olabileceğine işaret etmiştir. Klinik rhodococcal pnömoni öncesi ve esnasında taylarda SAA konsantrasyonlarını değerlendiren bir çalışmada; bu konsantrasyonlarının değişken olduğunu, bu sebeple ne yardımcı tanısal araç ne de hastalığın erken tanısı için bir ayırıcı olarak kullanılamayacağını ortaya konmuştur (Cohen ve ark, 2005). Yakın zamanda yapılan farklı bir çalışma plazma konsantrasyonları haftalık ölçüldüğünde SAA'nın *R. equi* erken tanısında güvenilir bir araç olmadığını ortaya koymuştur (Passamonti ve ark, 2015). Aynı çalışma bununla beraber, *R. equi* pnömonisi klinik belirtileri varlığında, SAA konsantrasyonlarının hem enfeksiyonun gidişatı hem de tedavinin etkinliği hakkında gerçek zaman verileri sağladığını bildirmiştir.

2.10.5.2. Tanısal görüntüleme

Göğüs radyografisi *R. equi* pnömonisi olduğundan şüphe duyulan tayları değerlendirmek için sık sık kullanılmaktadır (Smith ve Robinson, 1981; Falcon ve ark, 1985; Sweeney ve ark, 1987; Giguère ve Prescott, 1997; Anzai ve ark, 1997; Witkowski ve ark, 2012). Tipik olarak, bölgesel konsolidasyon ile belirgin alveoler yapı görülmektedir. Genellikle, pulmoner apse oluşumu ile tutarlı ayırık nodüller ve kaviter lezyonlar görülür ve bazı olgularda apseler içinde gaz saptanabilir. Trakeanın dorsal displazisine neden olan nodüller yoğunluklar ile karakterize trakeobronşiyal lenfadenopati görülebilir. Şiddetli solunum stresi ve belirgin bronkointerstisyel yapı gösteren taylarda sporadik bronkointerstisyel pnömoni sendromu düşünülmelidir. Bu sendromun nedeni belli değildir, ve zaman zaman vakalardan *R. equi* izole edilmiş olmasına rağmen, patogenezinde rolü belirsizdir (Lakritz ve ark, 1993). *R. equi* ve *Pneumocystis carinii* ile eş zamanlı enfekte olan 5 taydan 3 tanesinde belirgin retikülonodüler lezyonlar ile karakterize bir miliyer desen tarif edilmiştir (Ainsworth ve ark, 1993).

Toraks ve batin ultrasonografisi, şüphe duyulan rhodococcal hastalığın değerlendirilmesinde değerli bilgiler verebilir (Giguère ve Prescott, 1997; Ramirez ve ark, 2004; Reuss ve ark, 2011). Toraks taramalarında, ultrasonografi hava akımının ardında kalan akciğer kısımlarındaki lezyonları görüntüleyemez, bu nedenle öncelikle periferik tutulumlu lezyonları tespit etmede kullanılır. Hastalığa yakalanmış tayların çoğunda periferik apseler mevcuttur (Ramirez ve ark 2004; Slovis ve ark, 2005). *R. equi* pnömonisi doğrulanmış 17 tayın radyografi ve ultrasonografi sonuçları karşılaştırıldığında, bulgular 17 vakanın 15'inde tutarlı bulunmuş, diğer 2 vakada ise lezyonlar her iki teknikte de belirlenmiş olsa da radyografi sonuçları ultrasonografi sonuçlarından daha şiddetli bir tablo göstermiştir (Ramirez ve ark, 2004). Pulmoner apselerin radyografik veya ultrasonografik taramalarla saptaması rhodococcal pnömoni şüphesi endeksini yükseltmede yararlı olabilir, ancak *R. equi* pnömonisi için kesin bir tanı testi olarak tavsiye edilmemektedir (Lavoie ve ark, 1995; Giguère ve ark, 2011). *Streptococcus zooepidemicus* gibi diğer patojenler de pulmoner apse oluşumuna neden olabilir ve özellikle 3 aylıktan büyük taylarda dikkate alınmalıdırlar (Lavoie ve ark, 1995). Bununla birlikte, bazı *R. equi* vakalarında orta ve şiddetli bronkointerstisyel bulgular mevcutken, pulmoner apse oluşumu tespit edilemez.

CT (Computer Tomography, Bilgisayarlı Tomografi), MRI (Magnetic Resonans Imaging, Manyetik Rezonans Görüntüleme) ve sintigrafik görüntüleme gibi gelişmiş görüntüleme teknikleri, özellikle ekstrapulmoner tutulum var olduğunda, *R. equi* enfeksiyonu

olan bazı taylara endike olabilir. Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi, *R. equi* pnömonisi olan insanlarda lezyonları tanımlamak kullanılmaktadır (Marchiory ve ark, 2005). *R. equi* enfeksiyonunun atipik klinik semptomlarını gösteren şiddetli solunum stresli bir tayda, bu solunum stresine neden olan mediastinal apsenin tanısı CT ile konulmuştur (Wion ve ark, 2001). MRI ve CT taylarda septik physitis tanısı için kullanılmaktadır. Sintigrafik perfüzyon görüntüleme, deneysel oluşturulan rhodococcal pnömonili dört tayın akciğerlerinin etkilenen bölgelerinde perfüzyon kusurlarını göstermek için kullanılmıştır. Bulgular radyografik ve nekropsi lezyonları ile tutarlı bulunmuştur (Martens ve ark, 1989).

2.10.5.3. Patolojik bulgular

R. equi pnömonisinin gözle görülebilen lezyonların karakteri; konjeste ve kısmen atelektatik akciğer dokusundan ayrılmış sert nodüllerdir (Johnson ve ark, 1982; Martens ve ark 1983; Johnson ve ark, 1983; Zink ve ark, 1986, Ardans ve ark, 1986; Dungworth, 1993) Nodüller farklı boyutlardadır, bazı küçük odaklar birleşip daha büyük lezyonlar oluşturabilirler. Zaman zaman, birden fazla miliyer pyogranülomatöz odaklar görülebilir. Lezyonlar genellikle bilateral ve en şiddetli olarak cranioventral bölgede görülürler. Bazen, lezyonlar yaygın bir şekilde tüm akciğer boyunca dağılırlar. Lezyonlar sınırlandırıldıklarında genel olarak abse olarak tanımlanırken, daha az belirgin tanımlandıklarında süperatif bronkopnömoni olarak tarif edilmektedirler. Kazeöz nekrotik alanlar mevcuttur, ve çoğu vakada, nekrotik dokunun etrafında belirgin fibröz kapsül bulunmamaktadır. Pleura sıvısının varlığı nadirdir. Çoğu vakada, bronşiyal lenf yumruları genellikle genişlemiş ve ödematöz görülürken; kazeonekrotik odaklar mevcut olabilir. Rhococcal pnömonili bir tayda amfizematöz lenfadenit tarif edilmiştir (Mendoza ve ark, 2011).

Histolojik olarak lezyonlar çoğunlukla pyogranülomatöz bulunmaktadırlar. Erken akciğer lezyonları alveolar boşluğa infiltre olmuş büyük ölçüde makrofajlar ve çok çekirdekli dev hücreler; daha az sayıda nötrofillerle karakterizedir. Bakteriler genellikle makrofajlar ve dev hücreler içinde gözlenir. İlimli sayıda lenfosit ve plazma hücreleri temel olarak alveoler septada ve diğer interstisyel bölgelerde bulunur. Hastalık ilerledikçe, nekroz alveolar boşluğa yayılır ve makroskopik kazeöz nekrotik odaklar üreterek, akciğer parankimine geniş alanlı yayılım gösterir. Bakteri yüklü dejenere sayısız makrofaj bulunmaktadır. Sıklıkla, pyogranülomatöz lenfadenit de histolojik olarak mevcuttur (Long, 2007).

R. equi enfeksiyonunun akciğer dışında en sık görüldüğü bölgeler intestinal kanal ve mezenterik lenf düğümleridir. Ileum ile sekum ve kolonun lenfoid dokusunda, özellikle Peyer

plakları ile bağlantılı multifokal enterokolit ve tifilit görülebilir. Bronşiyal lenf yumrularına benzer şekilde, mezenterik ve kolon lenf yumruları da genişlemiş görülebilir ve üzerlerinde kazeonekrotik odaklar tespit edilebilir. Bazen, büyük bir abdominal abse varlığı söz konusu olabilir, bu apse genellikle mezenterik bir lenf yumrusunda oluşacaktır. Peritonit ve adezyonlar mevcut olabilir. Histolojik olarak, intestinal lezyonlar lenfoid dokunun pyogranülomatöz inflamasyonu ve bunu saran epitelyumun fibrinonekrotik ülserasyonundan oluşur (Long, 2007).

R. equi enfeksiyonu lezyonları organizmanın hematogen yayılmasına işaret ederek, daha yaygın bulunabilir. Tespit edilen bazı lezyonlar septik artritis, vertebral osteomyelitis, hipopiyon ve ülseratif lenfanjitisi içermektedir. Apseler hemen hemen her bölgede ortaya çıkabilir. Aborte bir fetusta plasentitis ve fetal pnömoni lezyonları *R. equi* enfeksiyonu ile ilişkili olarak bildirilmiştir (Vengust ve ark, 2002).

R. equi, çoğu vakada nekropside dokulardan izole edilebilir. Buna ek olarak, impresyon smear ve formalin ile fikse edilmiş doku örnekleri üzerinde immünohistokimya bir teşhis aracı olarak kullanılabilir ve bakteri kültürü kadar hassas olabilir (Ishino ve ark, 1992; Szerdi ve ark, 2001). Dokularda spesifik olarak virülant *R. equi* türünü belirlemek için, virülans ile bağlantılı 15 ila 17 kDa antijenlere karşı yönlendirilen monoklonal antikolar kullanılmıştır (Madarame ve ark, 1996; Mariotti ve ark, 2000).

2.11. Tedavi

Toprakta yaşayan bir bakteri olan *R. equi*, doğal olarak ortamda bulunan antimikrobiyel maddelere karşı koyabilmek için çekirdek genomu ile evrimleşmiş olan kromozomal dirençlilik determinantlarına sahiptir. Bunun yanı sıra, *in vitro* etkinlik gösteren ilaçların çoğu *in vivo* olarak etkisizdir, bunun nedeni muhtemel olarak antimikrobiyel ajanların hücre içine alınımının ve pyogranülomatoz lezyonlara penetrasyonun zayıflığıdır. Ayrıca, mikolik asit içeren hücre duvarı, bazı ajanlara karşı iç direnç mekanizmalarına katkıda bulunabilir. Sonuç olarak, *R. equi* enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan mevcut antimikrobiyel ajan sayısı gayet sınırlıdır.

2.11.1. Rifampin ve Makrolitler

Rifampin ve eritromisinin 1980'li yıllarda tedavi için tercih edilmeye başlanmasıyla taylarda mortalite oranları önemli ölçüde azalmıştır (Hillidge, 1987; Sweeney ve ark, 1987). Daha yeni jenerasyon olan iki makrolid, klaritromisin ve azitromisin; eritromisinin yerine rifampinle kombine kullanılmaya başlanmıştır (Giguère ve ark, 2004). Bu üç makrolid arasından klaritromisin, *in vitro* *R. equi* ve hücre kültürlerindeki intraselüler *R. equi*'ye karşı en aktif ajandır (Berghaus ve ark, 2012; Giguère ve ark, 2012). *R. equi* suşlarının % 90'ını inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon (MIC₉₀) klaritromisin, eritromisin ve azitromisin için sırayla 0,12-0,25 ve 1,0 µg/ml dir (Jacks ve ark, 2003). Makrolidler ve Rifampin, *in vitro* olarak *R. equi*'ye karşı yüksek derecede etkilidirler ama bu etki sadece bakteriostatiktir (Nordmann ve Ronco, 1992; Giguère ve ark, 2012). Bunun sonucu olarak makrolitler ve rifampin *in vitro* olarak *R. equi* ye karşı zamana bağımlı etki ederler (Giguère ve ark, 2012). Makrolid ve rifampin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak sinerjistik etkilidir ve iki farklı sınıf ajanın kullanılması *R. equi*'nin bu ajanlardan herhangi birine direnç kazanması ihtimalini azaltır (Prescott ve Nicholson, 1984; Nordmann ve Ronco 1992; Giguère ve ark, 2012). Taylarda klaritromisin ve azitromisinin eritromisine karşı avantajları artmış oral biyoyararlanım, uzamış yarı ömür ve BAL hücreleri (bronkoalveolar) ile PELF sıvısında (Pulmonary Epthelial lining fluid) artmış konsantrasyonlardır (Jacks ve ark, 2001; Davis ve ark, 2002; Womble ve ark, 2006). Yeni jenerasyon makrolitlerin bu özellikleri, daha düşük dozlarda kullanılmalarına ve doz aralıklarının uzamasına katkıda bulunur. Retrospektif bir çalışmada klaritromisin ve rifampin kombinasyonu, özellikle şiddetli radyografik bulguları olan *R. equi* pnömonili taylarda, azitromisin-rifampin ve eritromisin-rifampin kombinasyonlarından daha etkili bulunmuştur (Giguère ve ark, 2004). Bu çalışmada tedavi gruplarında bulunan taylar rastgele seçilmediği için ve retrospektif datada biaslar olabileceğinden çalışma sonuçları dikkatlice ele alınmalıdır. Yakın geçmişteki diğer çalışmalar rifampin ile uzun süreli tedavinin PELF ve BAL sıvılarında klaritromisin konsantrasyonunu belirgin düzeyde azalttığını (potansiyel olarak farklı makrolitlerin de) ortaya koymuş olmasına rağmen (Venner ve ark, 2010; Peters ve ark, 2011) taylar üzerinde makrolid ve rifampin kombinasyonunun ve sadece makrolidlerin kullanımının klinik etkilerinin karşılaştırılması henüz çalışılmamıştır. Tek başına makrolid kullanımının, rifampin ve makrolid kombinasyonu kadar etkili olduğu kanıtlanana kadar, makrolid (eritromisin, azitromisin ve klaritromisin) ve rifampin kombinasyonu tavsiye edilen tedavi şekli olarak kalacaktır (Giguère ve ark, 2011).

Klinik belirtilerin iyileşmesi, plazma fibrinojen konsantrasyonlarının normale dönmesi, akciğer lezyonlarının ultrasonografik ya da radyografik olarak iyileşmesi, genel olarak tedavini süresini belirler. Lezyonların şiddetine ve tedaviye verilen yanıtı bağlı olarak bu süre genellikle 3-12 haftadır. Ultrasonla belirlenen subklinik lezyonlara sahip taylar, solunum stresli ve şiddetli lezyonlara sahip taylara kıyasla daha kısa bir tedavi süresi gerektirirler. Aslında, subklinik ultrasonografik lezyonları olan tayların çoğu, tedavi görmeden enfeksiyonu kendileri temizlerler (Venner ve ark, 2012a, b). Henüz, subklinik ultrasonografik lezyonlu taylardan hangilerinin ileride enfeksiyonu kendileri temizleyeceği, hangilerinde enfeksiyonun hastalığa dönüşeceğinin ayrımını sağlayabilecek somut bir kriter saptanamamıştır.

Enfeksiyon bölgesinde terapötik konsantrasyonu koruyabilecek uzun etkili bir makrolidin varlığı tedavi aralıklarını kısaltarak uyumluluğu arttıracaktır. Sığırlarda ve domuzlarda kullanımı onaylanmış, semi sentetik bir makrolid olan tularitromisin taylara IM enjeksiyondan sonra BAL hücrelerinde konsantrasyonu tespit edilmiştir (Scheuch ve ark, 2007). Yüksek kümülatif *R. equi* insidensiyle sahip bir çiftlikte, subklinik ultrasonografik lezyonlu taylarda tularitromisin ile azitromisin rifampin kombinasyonu klinik etkileri karşılaştırılmış, iki grupta hayatta kalma oranları istatistiki olarak belirgin farklılık göstermese de tedavinin ilk haftası sonunda akciğer lezyonları tularitromisin grubunda daha büyük ve tedavi süresi tularitromisin grubunda belirgin olarak daha uzun saptanmış, tularitromisinin standart azitromisin rifampin tedavisi kadar etkili olmadığı sonucuna varılmıştır (Venner ve ark, 2007). Bu sonuçlar, tularitromisinin *R. equi*' ye karşı zayıf *in vitro* etkisi ($MIC_{90} > 64 \mu\text{g/ml}$) (Carlson ve ark, 2010) olduğu bulgusuyla açıklanabilir. Bu konsantrasyon, tularitromisinin önerilen doz olan 2,5 mg/kg dozda IM olarak taylara uygulandıktan sonra BAL hücrelerinde görülen konsantrasyonundan 100 kat daha fazladır (Scheuch ve ark, 2007).

Sığır ve domuzlarda kullanımı onaylanmış uzun etkili diğer bir makrolid olan tilmikosin, *R. equi*' ye karşı zayıf etkilidir ($MIC_{90} > 32 \mu\text{g/ml}$) ve taylarda enjeksiyon bölgesinde şişlik oluşturabilir (Womble ve ark, 2006). Benzer olarak tildipirosin *R. equi* karşısında zayıf ($MIC_{90} 32 \mu\text{g/ml}$) etkilidir. Sonuç olarak tularitromisin, tilmikosin ya da tildipirosin tayların *R. equi* pnömosi tedavisinde tavsiye edilmez. Buna karşılık, sağım döneminde olmayan sığırlarda respiratorik enfeksiyonlardan korunma ve tedavisi amacıyla kullanımı onaylanmış, uzun etkili diğer bir makrolid olan gamitromisin *R. equi* ye karşı *in vitro* etkilidir ($MIC_{90} 1,0 \mu\text{g/ml}$) (Berghaus ve ark, 2012). Gamitromisinin 6 mg/kg dozunda IM enjeksiyonunun ardından BAL hücrelerinde 7 gün boyunca MIC konsantrasyonunun üzerinde konsantrasyonlarda bulunduğu görülmüştür (Berghaus ve ark, 2012). Bu ilacın klinik etkinliği ve güvenliği tam olarak belirlenene kadar gamitromisin tedavisi tavsiye edilmemektedir.

Çoğu tay tarafından iyi tolere edilmelerine rağmen makrolidler genelde ılımlı diareye neden olurlar (Gustafsson ve ark, 1997; Stratton-Phelps ve ark, 2000; Giguère ve ark, 2014).

2.12. Koruma ve Kontrol

Koruma ve kontrol methodları; erken teşhis için tarama testleri, kemoprofilaksi ve aktif ve pasif immunizasyonu içerir.

2.12.1. Erken teşhis için taramalar

R. equi pnömonisinin fark edilmesi genelde hastalık ilerleyene kadar güçtür, bu yüzden tedavisi de zordur. Tarama çalışmalarının amacı taylar hastalığın ilk evrelerindeyken tespit edip uygun tedaviye başlatarak iyileşme tablosunu geliştirmektir. Tarama testlerinin tek başına tanı değerinin olmadığını hatırlamak gerekir. En yardımcı tarama testleri sonuçları yüksek pozitif sonuçlu (yüksek pozitif tahmin değeri) ya da düşük negatif sonuçlu (yüksek negatif tahmin değeri) olasılığı olanlardır. Çalışılan çiftlikte hastalığın prevalansının yüksek olması, tarama testinin pozitif tahmin değerinin yüksek olduğu anlamına gelir. Bu nedenle, çiftlikteki prevalans değerine göre, tarama testinin pozitif sonucu tanı testlerinin kullanılması (düşük ve orta dereceli prevalans) ya da tedaviye başlanması (yüksek prevalans) temelini oluşturur. Kontrolsüz yapılan bir takım çalışmalar, tarama testlerinin *R. equi* mortalitesini azalttığı sonucunu bulmuştur (Prescott ve ark, 1989; Slovis ve ark, 2005). Başarılı bir aşının ya da diğer korunma yöntemlerinin henüz bulunmadığı bu yıkıcı hastalığın kontrolünde endemik çiftliklerde tarama testlerinin kullanılması mantıklı bir uygulamadır. *R. equi*' nin sadece sporadik görüldüğü çiftliklerde tarama testi uygulamalarının verimi şüphelidir.

Tayların pnömoni klinik belirtileri için gözlemlenmesi, rektal ısının ölçülmesi, hematolojik parametreler, seroloji, thoraksın radyolojik ve ultrasonografik görüntülenmesi gibi çeşitli uygulamalar tarama teknikleri olarak açıklanmış, bu taramaların tay 3 haftalıkken başlanması ampirik olarak tavsiye edilmiştir (Cohen ve ark, 2000). Bu testlerin sistemik karşılaştırılması yapılmamıştır.

Bazı çalışmalar serumda *R. equi* antikorunu, SAA ve fibrinojen konsantrasyonlarının yararlı tarama testleri olmadığını göstermiştir (Martens ve ark, 2002; Giguère ve ark, 2003a; Cohen ve ark, 2005). WBC konsantrasyonları aylık taramalarda *R. equi* pnömonisi erken tanısında klinik olarak kabul edilebilir sensitivite (% 79) ve spesifite (% 91) göstermiştir (limit WBC 15.000 hücre/ μ l) (Giguère ve ark, 2003b). Farklı bir çiftlikte yapılan başka bir çalışmada, *R. equi*

pnömonisi olan tayların WBC ve nötrofil konsantrasyonlarının seri olarak ölçülmesi hastalığın seyri hakkında limitli performans sergilemiştir (Chaffin ve ark, 2012a).

Son 15 yılda, endemik çiftliklerin çoğunda *R. equi* enfeksiyonlarının kontrolü, ultrasonografik taramalarla subklinik lezyonların tespiti ve uygun antimikrobiyel tedaviyle hastalığı klinik belirtiler görülmeden tedavi etmek suretiyle gerçekleşmektedir (Slovis ve ark, 2005; Venner ve ark, 2007; McCracken ve Slovis, 2009). Göğüs ultrasonografisi diğer tekniklere nazaran bir çok avantaj sağlamaktadır: (1) sonuçlar pulmoner patoloji varlığı için spesifiktir; (2) prosedür her bir tay için diğer testlere nazaran daha hızlı gerçekleşir; (3) sonuçlar hemen belli olur. Kontrollü çalışmaların olmamasına rağmen, periyodik göğüs ultrasonografisinin bazı çiftliklerde *R. equi* mortalitesini düşürdüğü görülmüştür (Slovis ve ark, 2005; Venner ve ark, 2007; McCracken ve Slovis, 2009).

Bununla birlikte son yıllarda yapılan çift körlü rastgele placebo kontrollü çalışmalar küçük pulmoner lezyonlu (apse skoru 1-10cm) taylardan % 88' inin antimikrobiyel tedavi görmeden iyileştiğini göstermiştir. Ek olarak, küçük pulmoner lezyonlu taylarda antimikrobiyel tedavi, placebo grubuyla kıyaslandığında lezyon iyileşmesini belirgin düzeyde hızlandırmamıştır (Venner ve ark, 2012a, b).

R. equi pnömonisinin tespiti için ultrason taramalarının yararlılığı, endemik bir çiftlikte veteriner hekimlerin ve diğer personelin tarama sonuçlarını görmemesi üzerine planlanan bir çalışmayla araştırılmış (Chaffin ve ark, 2012b), taranan 270 taydan 216 tanesinde (% 80) sonografik olarak belirgin pulmoner lezyonlar tespit edilmiş olmasına rağmen sadece % 17'si klinik *R. equi* pnömonisi tablosu göstermiştir. Ultrasonografik lezyonları tespit edilen tayların % 79'u antimikrobiyel tedavi görmeden ve hastalığın klinik belirtilerini göstermeden kendiliğinden lezyonları temizlemiştir. Aynı çalışmada ultrasonografinin kümülatif sensitivitesi çok iyi (% 89), kümülatif spesifitesi ise düşük (% 62) bulunmuştur (Chaffin ve ark, 2012b).

Ultrasonografik lezyonlu taylardan hangilerinin tedavisiz iyileşebileceği bilinmediğinden ve *R. equi* klinik hastalık tablosu çok ağır olabildiğinden çoğu yetiştirme çiftliği, tüm ultrasonografik lezyonlu tayların tedavisini yapmayı tercih etmektedir. Bu yaklaşım, klinik hastalığı olmamasına rağmen birçok tayın *R. equi* pnömonisi varsayımıyla antimikrobiyel tedavi görmesine neden olmaktadır. Ultrason taramaları sonucunda makrolid ve rifampinin artan kullanımı ve son yıllarda dirençli suşların görülme sıklığında artış, bu uygulamanın sanıldığı kadar zararsız olmayabileceğini işaret eder. Ultrason taramaları sonucunda makrolid ve rifampinin yaygın olarak kullanıldığı bir yetiştirme çiftliğinde bu antibiyotiklere direnç geliştiği bulunmuştur (Burton ve ark, 2013). Bu çiftlikte yapılan taramalarda, pnömonisi olan

taylardan izole edilen *R. equi* izolatlarının % 20-40'ı dirençli bulunmuştur. Günümüzde dirençli suşların, ultrasonografik taramalar sonucu yaygın antibiyotik kullanan çiftliklerde geniş yayılımı olup olmadığı ya da sadece belli bölgelerde sınırlı kalıp kalmadığı tam olarak bilinmemektedir. Yaygın ve gereksiz antibiyotik kullanımı, maaliyetinin ve dirençli suşların oluşmasına neden olmasının yanısıra; bazı taylarda ishal ve yüksek ateş gibi ciddi ters reaksiyonlarla hayati tehlike oluşturabilir.

Ultrasonografik lezyonları olan tayların çoğunda bu lezyonların kendiliğinden iyileşmesi (Chaffin ve ark, 2012b; Venner ve ark, 2012a, b), bazı çiftliklerde makrolid ve rifampin dirençli suşların görülme sıklığının artmasıyla (Burton ve ark, 2013) kombine edildiğinde, klinik hastalığı olmayan taylara sadece ultrasonografik bulgular neticesinde antibiyotik tedavisi uygulamasının sonlandırılması gerektiğini göstermektedir. Hedef, birçok subklinik taydan hangi birkaçının hastalık tablosu gösterip antibiyotik tedaviye ihtiyacı olacağının daha belirgin bir şekilde tespit edilebilmesi olmalıdır. Subklinik taylarda tedavinin avantajları ve dezavantajlarının daha iyi kuantifiye edilebilmesi için, bu tayların tedaviye ihtiyaçlarının belirlenmesinde daha iyi kriterler yaratmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.12.2. Pasif İmmünizasyon

Çeşitli antijenler kullanılarak *R. equi*' ye karşı aşılardan alınıp, deneysel olarak enfeksiyona tabi tutulmuş taylara verilen HIP'nin (Hyper Immune plasma- hiperimmun plazma), enfeksiyonun şiddetini azaltarak etkili olduğu ispatlanmıştır (Martens ve ark, 1989b; Prescott ve ark, 1997; Hooper-McGrevy ve ark, 2005). Buna rağmen, çeşitli HIP'ların etkinliğini araştıran saha çalışmaları birbirinden farklı sonuçlar vermiştir. Sonuçların çatışmasına ve tamamının *R. equi* pnömonisi kümülatif insidensinde belirgin bir istatistiki azalma göstermemesine rağmen, 7 çalışmanın 5 tanesi relatif riskin azaldığını ve HIP faydalarını göstermiştir (Madigan ve ark, 1991; Muller ve Madigan 1992; Hurley ve Begg, 1995; Higuchi ve ark, 1999; Giguère ve ark 2002; Chaffin ve ark, 2003, 2011).

VapA ve VapC ile rekombine immunize edilen atlardan elde edilen saflaştırılmış immunoglobulinlerin IV verildiği taylarda, yüksek dozda *R. equi* ile oluşturulan deneysel enfeksiyonun şiddetinin, piyasada bulunan ticari HIP ile benzer miktarda azaldığı görülmüştür (Hooper-McGrevy ve ark, 2001). Bu sonuç, immunoglobulinlerin, özellikle VapA ve VapC spesifik olanların HIP ile sağlanan bağışıklıktan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. *R. equi*' ye karşı hiperimmunize edilmeyen atlardan elde edilen plazmaların *R. equi* korunmasında kullanılması tavsiye edilmemektedir. *R. equi*' nin bazı çiftliklerde endemik görülmesinin, bu

çifliklere özel suşlarla açıklanamaması ve enfekte tayların birden fazla suş içerebileceği düşünüldüğünde, taylara verilecek plazmanın aynı çiftlikte bulunan hiperimmunize atlardan elde edilme gerekliliği yoktur; herhangi bir virulent suşa karşı (VapA pozitif) hiperimmunize edilmiş atlardan alınan plazmanın yeterli olması gerekmektedir (Giguère ve ark, 2011b).

HIP transferi için optimum miktar ve yaş henüz tam olarak belirlenmemiştir. *R. equi* ile aerosol yolla enfekte edilen 9 taya, enfeksiyon sonrası 9. günde uygulanan HIP koruyucu etkinlik göstermemiştir, bu da HIP uygulamasının enfeksiyon oluşumundan önce yapılması gerektiğini göstermektedir (Chaffin ve ark, 1991). Bir çok tayın hayatlarının ilk günlerinde bu patojene maruz kaldıkları kanıtlandığından (Horowitz ve ark, 2001) tayların 1 litre HIP'yi hayatlarının 2. gününden önce almaları yaygın olarak tavsiye edilmektedir. Bu erken uygulamayla, pasif transfer edilen antikorlar, tayın hala çevresel olarak etkene maruz kaldığı ileri dönemlerde etkisiz konsantrasyonlara düşer, bu yüzden 2-4 haftalarda ikinci bir HIP uygulaması endemik çiftliklerde sıklıkla uygulanmaktadır.

HIP transfüzyonu hastalığın önlenmesinde tamamen etkili değildir, bu yüzden riskteki tayların dikkatle gözlenmesi gerekliliğini kaldırmaz. Korumada tam olarak etkili olmayışının yanısıra, HIP transfüzyonu taylara uygulama ve zaptırap esnasında travma, ayrıca ileri dönemlerde yan etkiler olasılıklarını barındırır. Bu uygulamalar hem zaman hem de işçilik gerektirdiğinden pahalı uygulamalardır ve tayın değeri ve hastalığın o çiftlikteki insidensi göz önünde bulundurularak değerlendirilir.

2.12.3. Kemoflaksi

Etkili bir aşımın eksikliğinden dolayı, endemik çiftliklerde *R. equi* enfeksiyonlarından korunmak için, çiftlikteki tüm tayların enfeksiyona en hassas oldukları dönemde profilaktik antimikrobiyellerin kullanımı önerilmiştir. Azitromisin, iyi oral biyoyararlanımı, uzun yarı ömrü ve PELF, BAL, ve nötrofillerde yakaladığı konsantrasyonlarla kemoprofilaksi için cazip bir alternatiftir. İki çalışma, azitromisinin kemoprofilaktik kullanımını araştırmıştır. Amerikada 10 çiftlikte 338 tayla yapılan rastgele kontrollü bir çalışmada, *R. equi* kümülatif insidensi % 21'den (tedavi görmeyen taylar), % 5'e (10 mg/kg PO azitromisin, q 48h, hayatın ilk 14 günü) düşmüştür (Chaffin ve ark, 2008). Buna karşılık, Almanya'da büyük bir yetiştirme çiftliğinde 70 tayla yapılan bir çalışmada kemoprofilaktik olarak azitromisin kullanımı (10 mg/kg PO azitromisin, q 24h, hayatın ilk 28 günü) pulmoner abseli hastalık kümülatif insidensini belirgin düzeyde düşürmemiştir. (Azitromisin kullanılan grupta insidens % 60, tedavi görmeyen grupta insidens % 69). Buna rağmen, azitromisin ile kemoprofilaktik tedavi gören taylarda abseleşme

başlaması daha geç yaşlarda gerçekleşmiştir (Venner ve ark, 2009). Bu iki çalışma sonuçları arasında farklılığın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Kemoprofilaktik azitromisin kullanımı bu iki çalışmadan bağımsız olarak, makrolid dirençli bakteri suşlarının görülmesini arttıracığından uygun bir teknik olarak görülmemektedir (Giguère ve ark, 2011b).

2.12.4. Aşılama

Etkili bir aşılama programı ile tayların ve kısırakların immunizasyonu *R. equi* pnömonisinin kontrolünde faydalı olacaksa da günümüzde bu konudaki çalışmalar hala istenilen sonuçları vermemektedir. *R. equi*'den kısmi korunmada antikorların rolü, kısırakların aşılmasının bir dereceye kadar koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir. Buna rağmen, hem saha hem de deneysel çalışmalarda, kısırakların aşılmasıyla, kolostrumda *R. equi* spesifik antikor sayısı ve bu antikorların taylara geçişi belirgin düzeyde artmış olsa da, *R. equi* pnömonisine karşı bir koruma sağlanamamıştır (Madigan ve ark, 1991; Martens ve ark, 1991). Daha sonra yapılan bir çalışmada az sayıda kısırağın VapA için su bazlı bir nanopartikül adjuvantıyla yapılan aşılmasıyla, hem kısıraklarda hem de taylarda anti VapA IgG konsantrasyonları yükselmiş, doğal oluşan enfeksiyona karşı, aşılınmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında koruyucu etki sağlamış olabilir (Cauchard ve ark, 2004). Aşılama programlarının yaygınlaşmasından önce, endemik çiftliklerde yapılacak daha büyük ölçekli çalışmalarla bu ilk çalışmalarda varılan sonuçların tasdiklenmesi gerekmektedir.

Hücrel bağışıklığın *R. equi* pnömonisinden korunmadaki olağanüstü önemi nedeniyle, tam bağışıklık yakalanabilmesi için tayların aktif immunizasyonunun gerekliliği düşünülmektedir. VapA antijeni ekspres eden *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ile oral aşılama sonucu farelerde *R. equi* pnömonisinden korunma sağlanmıştır (Oliveira ve ark, 2010). Önceki çalışmalar, bu aşının taylarda koruma sağlayabileceğini düşündürür (Porto ve ark, 2012). Farelerde yapılan çalışmalar VapA ile DNA immunizasyonunun, fareleri *R. equi* enfeksiyonundan koruduğunu ve IgG subizotip cevabının, Th1 kaynaklı immun cevapla benzerlik gösterdiğini önerir (Haghighi ve Prescott, 2005). *vapA* geni içeren benzer bir DNA aşısı, yetişkin atlarda güçlü hücrel immun yanıt oluştururken, taylarda bu cevap zayıf kalmıştır (Lopez ve ark, 2003). Yenidoğan taylara intrabronşiyal uygulanan canlı, tamamen attenüe, riboflavin okzotrofik *R. equi* suşuyla aşılması, immun yanıtı stimüle etsede, intrabronşiyal enfeksiyona karşı koruma sağlayamamıştır (Lopez ve ark, 2008). Canlı, avirüent plazmidten arınmış *R. equi*, adaptif immunizasyon sağlamamıştır ve hemen temizlenmiştir. Bu da güçlü hücrel immun yanıt için bakteriyel replikasyonun olması gerektiğini gösterir (Hines

ve ark, 2003). *icl* (isocitrate lyase) ve *choE* (cholesterol oxidase) kromozomal genlerinden arındırılmış *R. equi* delesyon mutanını uyguladığı üç tayıda tekrarlayan enfeksiyona karşı koruma sağlamıştır (Pei ve ark, 2007a, b). Fakat, iki tayıda uygulama sonrası pnömoni gelişmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda, tayıların canlı, attenüe, katabolik steroid yolda görevli genlerden ari bir aşıyla oral aşılması sonrasında deneysel oluşturulan intrabronşiyal enfeksiyona bağışıklıkları sağlanmıştır (Van der Geize ve ark, 2011). Bu veriler toplu yorumlandığında güçlü hücresel immun yanıtın oluşabilmesi için yeterli *R. equi* replikasyonu ile aşılana suşun hastalık oluşturması arasında ince bir çizgi olduğu kanısına varılmaktadır. Bir başka hassas nokta ise, tayıların hayatlarının ilk günlerinde aşılanaı gerekmesi ve etkili aşının, aşılana genç tayın henüz olgunlaşmamış bağışıklık sisteminin üstesinden gelebilmesidir. Günümüzde kısırakların ya da tayıların aktif immunizasyonu için henüz geliştirilmiş ticari bir aşı olmamasına rağmen, hala geliştirilmekte olan ve umut vaadeden birçok çalışma vardır.

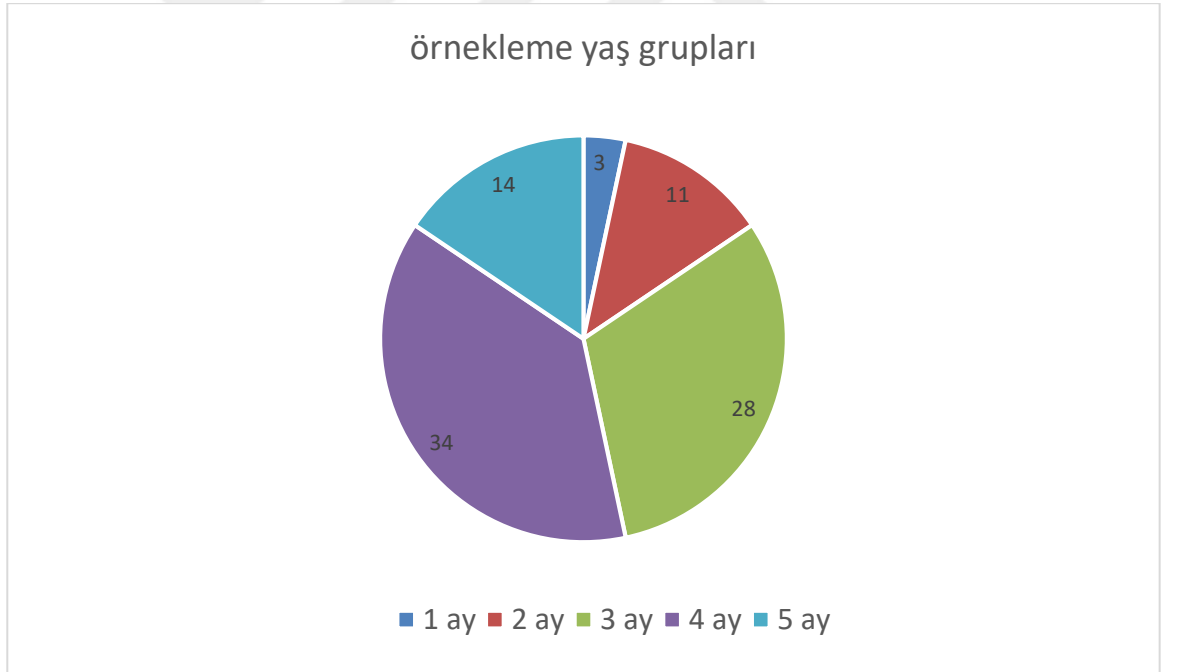
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Bu tez çalışmasında, 1-5 aylık 90 taydan alınan nazal svap örnekleri kullanılmıştır. Örneklemenin yapıldığı haralarda aşım sezonu Şubat ayında, doğum sezonu ise Ocak ayında başlamaktadır. Örneklemenin yapıldığı 2016 yılı Haziran ayında 90 taydan 3 tanesi 1 aylık, 11 tanesi 2 aylık, 28 tanesi 3 aylık, 34 tanesi 4 aylık ve 14 tanesi 5 aylık olduğu kayıt edilmiştir. Aseptik ve tekniğine uygun olarak alınan nazal svap örnekleri taşıma solüsyonlu svaplar içinde soğuk zincir altında analizleri yapılmak üzere Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirilmiştir.

Şekil 4. Örnekleme yaş grupları



3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.1. *R. equi* selektif NANAT besiyeri

Çalışmada kullanılan *R. equi* selektif NANAT besiyeri hazırlanmasında Muscatello ve arkadaşları (2007) referans alınmıştır.

Tryptone Soy Agar (Merck®) 40 g

Distile Su 1 lt

121° C' de 15 dakika sterilizasyonu takiben eklenen suplemler

Nalidiksik asit (20 µg/ml)

Novobiocin (25 µg/ml)

Actidione (sikloheksimit) (40 µg/ml)

Potasyum Tellurit (% 0, 0005)

3.1.2.2. TSA (Tryptic Soy Agar)

Kazein Peptonu..... 15,0 g/l

Soya Peptonu..... 5,0 g/l

NaCl5,0 g/l

Agar-agar15,0 g/140 gr

Dehidre besiyeri tartılarak 1 litre distile su ile homojenize edildikten sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanan besi yeri 50°C'ye kadar soğutulup steril petri kutularına dökülmüştür.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonlar

3.1.3.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8,0) Buffer

10X TBE Stok Solüsyonu

Tris Base..... 121,1 g

Borik Asit61,83 g

EDTA 5,84 g

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

0,5X TBE Kullanma Solüsyonu

10X TBE.....50 ml

Distile su.....950 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlandı.

3.1.3.2. Jel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi..... 25 mg
Sükroz4 g
H₂O10 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlandı.

3.1.3.3. Tris (1M)

Tris Base121 g

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

3.1.3.4. TE Buffer (10 mM tris, 1mM EDTA)

Tris (1M).....10 ml
EDTA(0,5 M)..... 2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlandı.

3.1.3.5. ExPrime Taq Premix (2X) (GeNet Bio®)

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

3.1.4. DNA Ekstraksiyon Kiti

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

3.1.4.1. Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification Kit Prosedürü:

- *Bir öze dolusu kültür 400 µl lizis solüsyonu ile süspanse edildi. 65°C'de 5 dk inkube edildi.
- *600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
- *800 µl presipitasyon solüsyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solüsyonunda çözdürüldü.

*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C’de bekletildi. 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70’lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

3.1.5. Primerler

Çalışmada kullanılan *16S rRNA* primerleri Mir ve ark (2015), *vapA* ve *vapB* primerleri Al-Graibawi ve Mohammed (2015) tarafından belirtilen şekilde dizayn ettirilmiştir. Primer dizilimleri ve bant aralıkları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. *R. equi* Primerleri

Primerler	Nükleotid sekansı	Ürün büyüklüğü
<i>16S rRNA</i> F	5’ GGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTC 3’	450 bp
<i>16S rRNA</i> R	5’ CGCAAGCTTGGGGTTGAGCCCAA 3’	
<i>vapA</i> F	5’ GACTCTTCACAAGACGGT 3’	286 bp
<i>vapA</i> R	5’ TAGGCGTTGTGCCAGCTA 3’	
<i>vapB</i> F	5’ TGATGAAGGCTCTTCATAA 3’	477 bp
<i>vapB</i> R	5’ TTATGCAACCTCCCAGTTG 3’	

3.1.6. Agaroz Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma®)..... .2 g

TBE (0,5X)100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50°C’ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışıma 3 µl etidyum bromid ilavesinden sonra jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

3.1.7. Marker

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

3.1.8. Ethidium Bromid

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

3.1.9. Standart Suş

Biyokimyasal ve moleküler testlerde kalite kontrol suşu olarak *Rhodococcus equi* ATCC 6939 kullanılmıştır.

3.1.10. Antibiyotikler

Araştırmamızda elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla amoksisilin, streptomisin, kanamisin, amoksisilin klavulanik asit, amikasin, klaritromisin, azitromisin, sefoksitin, klindamisin, rifampin, eritromisin (Oxoid®) kullanılmıştır.

3.1.10.1. Antibiyotik sulandırmaları

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}{\text{Deney Potensi } (\mu\text{g/mg})}$$

NCCLSI M31-A2 standartında belirtildiği üzere antibiyotik tozlar hesaplanmış ve uygun solvent ve diluente sulandırılmıştır.

3.1.11. Kullanılan Cihazlar

Konvansiyonel yöntemle tanımlanan *R. equi* izolatları BD Phoenix M50 otomatize identifikasyon sistemiyle biyokimyasal olarak doğrulanmıştır. PCR işlemi 96 örnek kapasiteli ABI GeneAmp PCR System 9700 termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR aşaması tamamlanan örnekler elektroforez işlemi Biorad® marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Toplanması

Örnekleme yapılacak taylar hem tayın hem yardımcı personelin hem de araştırmacının güvenliği göz önünde bulundurularak, minimum stresle zaptı rapt edilmiş, svaplar sol ya da sağ ventral meatustan ilerletilmiş, nazal pasajda yaklaşık 5 saniyelik rotasyon hareketiyle örnekler alınmıştır. Alınan 90 nasal svap örnekleri stuart besiyeri içeren taşıma solüsyonuyla aynı gün içinde soğuk zincirde Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilmiştir.

3.2.2. Fenotipik İzolasyon ve İdentifikasyon

Laboratuara getirilen örnekler vakit kaybetmeden NANAT *R. equi* selektif besiyerine ekilerek 37° C' de 48 saat inkubasyona bırakılmıştır. Üreme gerçekleşen örneklerin koloni makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelenmiş, Gram boyama ve biyokimyasal testler (katalaz, oksidaz, üreaz, lipaz, fosfataz, *S. auerus* ATCC 25923 ile CAMP) yapılmış, Gram pozitif küçük kokoid etkenlerin BD Phoneix 50 otomatize identifikasyon cihazıyla biyokimyasal testleri doğrulanmıştır.

3.2.3. Genotipik İdentifikasyon

3.2.3.1. PCR

3.2.3.1.1. *Rhodococcus equi* 16S rRNA PCR aşaması

Araştırmamızda DNA ekstraksiyonu yapılan *Rhodococcus equi* izolatlarının 16S rRNA PCR işlemleri Mir ve ark (2015) tarafından bildirilen protokole göre yapıldı.

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

Mastermikslere hazırlandıktan sonra 0,2 ml'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 18'er µl hazırlanan mastermikslere ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklendi ve ağızları

sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra ABI GeneAmp PCR System 9700 termal döngüleme cihazına yüklenip, programlandı. 16S rRNA analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Tablo 7’de gösterilmiştir

Tablo 7. *R. equi* 16S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	35	94°C	30 sn
Bağlanma		56°C	30 sn
Uzama		72°C	30 sn
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

PCR kondisyonları 94° C’de 5 dakika ön denatürasyonu takiben 35 siklus olmak üzere 94° C’de 30 saniye denatürasyon, 56° C’de 30 saniye bağlanma, 72° C’de 30 saniye uzama ve 72° C’de 5 dakika son uzama aşamaları şeklinde gerçekleştirilmiştir.

PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde elektroforzeze tabi tutulmuş ve Vilbert Lourmat UV transilluminator cihazında jel görüntülemesi yapılmıştır. *R. equi* için 450 bp büyüklüğündeki bant oluşumu gözlenmiştir.

3.2.3.1.2. *R. equi vapA* ve *vapB* gen varlığının belirlenmesi

16S rRNA pozitif örneklerin moleküler karakterizasyonu için *vapA* ve *vapB* genleri Al-Graibawi ve Mohammed (2015) çalışmasında belirttiği protokole göre uygulanmıştır.

vapA ve *vapB* genleri multipleks PCR işleminde 20 µl toplam hacimde, son konsantrasyonu 1x ExPrime Taq premix 10 µl, 1 µl primerler (her biri için 10 µM), olacak şekilde hazırlanır ve kalan miktar deiyonize su ile tamamlanır.

Mastermikslar hazırlandıktan sonra 0,2 ml’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 17’er µl hazırlanan mastermikslar ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’lardan 3’er µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra ABI GeneAmp PCR System 9700 termal döngüleme

cihazlarına yüklenip, programlandı. *vapA* ve *vapB* genleri analizlerinde kullanılan multipleks PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Tablo 8’de gösterilmiştir

Tablo 8. *R. equi vapA* ve *vapB* geni PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	35	94°C	1 dk
Bağlanma		48°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	10 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

PCR ürünleri %2’lik agaroz jelde elektroforzeze tabi tutulmuş ve Vilbert Lourmet UV transilluminator cihazında jel görüntülemesi yapılmıştır. *R. equi vapA* geni için 286 bp ve *vapB* geni için 477 bp büyüklüğündeki bant oluşumları gözlemlendi.

3.2.4. Antibiyogram

3.2.4.1. Bakteri inokulumun hazırlanması

TSA’ da saf olarak üremiş *R. equi* kolonilerinden 5 koloni Triptic Soy Broth’a ekilmiştir. 0.5 MacFarland bulanıklığına ulaşana dek 37°C’de 2-8 saat inkübe edilmiştir (1×10^8 CFU/ml). Bakteri suspansiyonları 1:10 oranında sulandırılmıştır. Böylece bakteri inokulumu 1×10^7 CFU/ml konsantrasyonuna ayarlanmıştır.

3.2.4.2. Broth Mikrodilüsyon

Mikropleyttteki tüm kuyucuklara 100 µl Katyonu Ayarlanmış Mueller Hinton Broth konulmuş daha sonra ilk kuyucuklara 256 µg/ml antibiyotik solüsyonundan 100 µl eklenmiştir ve ilk kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu 128 µg/ml olarak ayarlanmıştır. Bu konsantrasyondan 100 µl alıp 128 µg/ml konsantrasyonuna aktararak dilüsyon yapılmıştır. Bu işlem 0,0625 µg/ml konsantrasyondaki kuyucuğa kadar tekrarlanmış ve en son 100 µl atılmıştır.

Mikropleylerdeki antibiyotik ajanların final konsantrasyonları 0,0625-128 µg/ml arasında olmuştur. Tüm kuyucuklara 1×10^7 CFU/ml konsantrasyonundaki bakteri inokulumundan 5 µl eklenmiştir. Böylece bakteri inokulumu final konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml'ye ayarlanmıştır.

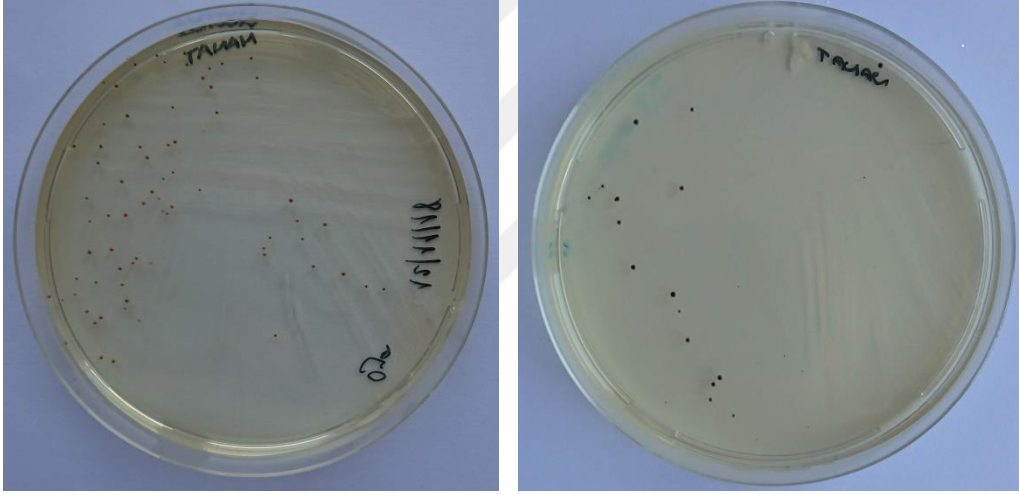
Pleytler 35 °C'de 18-24 saat inkube edilmiştir. Üremenin gözlenmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIC değeri olarak kaydedilmiştir (CLSI, 2005; Riesenberk ve ark 2014).



4. BULGULAR

4.1. Fenotipik Bulgular

Laboratuara getirilip NANAT besiyerine ekimi yapılan ve 37° C' de 24-48 saat inkübasyona bırakılan nasal svap örneklerinden (n=90), 10 tanesinde gri-siyah renkte, smooth karakterde koloniler gözlenmiştir (Resim 4). Üreyen kolonilerin (n=10) Gram boyamaları yapılmış ve Gram pozitif, kokoid etkenlere biyokimyasal testler uygulanmış ve örneklerin tümü (n=10) Katalaz, üreaz, lipaz, fosfataz ve CAMP testi (*S. aureus* ATCC 25923) pozitif, sitokrom c oksidaz negatif bulunmuştur.



Resim 4. NANAT ta üreyen *R. equi* kolonileri

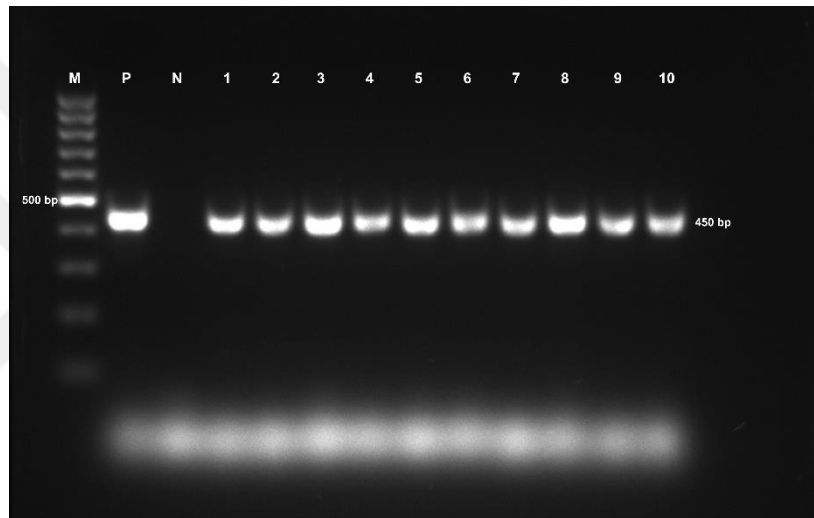
Tablo 9. Örneklerin Gram Boyama ve Biyokimyasal Özellikleri

Numune No	NANAT ÜREME	Gram Morfoloji	Katalaz	Oksidaz	Üreaz	Lipaz	Fosfataz	CAMP
20	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
33	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
53	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
56	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
57	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
60	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
61	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
77	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
82	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
90	Pozitif	G (+) kokobasil	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif

Gram boyama ve biyokimyasal testlerle *Rhodococcus equi* olduğu belirlenen 10 izolat (%11,1) PMIC/ID-87 panel kitleri kullanılarak BD Phoenix cihazına yüklenmiş ve tamamının *Rhodococcus equi* olduğu tespit edilmiştir.

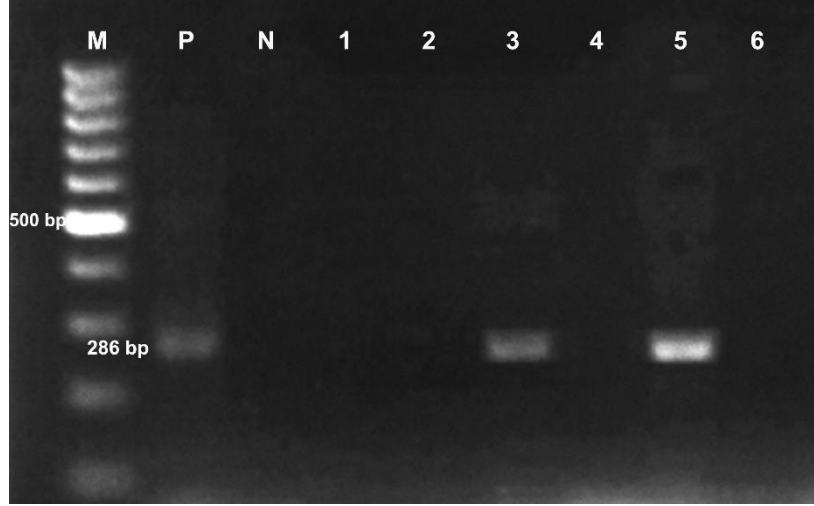
4.2. PCR Bulguları

İdentifikasyonu yapılan 10 örneğin 16S rRNA PCR amplifikasyonları agaroz jel elektroforezle görüntülenmiştir. Tüm *R. equi* izolatları (n:10) 450 bp bant aralığında 16S rRNA pozitif bulunmuştur (Resim 5).



Resim 5. 16S rRNA elektroforez görüntüsü; M: 100bp DNA işaretleyici, P: Pozitif kontrol, *Rhodococcus equi* ATCC6939 standart suş, N: Negatif kontrol, 1-10: *Rhodococcus equi* 16S rRNA pozitif örnekler.

16S rRNA PCR ile pozitif bulunan örnekler *vapA* geni için amplifiye edilmiş, 10 örneğin 2 tanesinde 286 bp bant aralığında *vapA* geni varlığı tespit edilmiştir (Resim 6).



Resim 6. *vapA* Elektroforez görüntüsü; M: 100bp DNA işaretleyici, P: Pozitif kontrol – *Rhodococcus equi* ATCC 6939 standart suş, N: Negatif kontrol, 3 ve 5: *Rhodococcus equi vapA* geni pozitif örnekler, 1,2,4,6: *Rhodococcus equi vapA* geni negatif örnekler.

16S rRNA PCR ile pozitif bulunan örnekler *vapB* geni için amplifiye edilmiş ancak pozitif örnek tespit edilmemiştir.

Araştırmamızda nazal svaplardan izole edilen *R. equi* suşlarının moleküler çalışmaları sonucunda elde edilen veriler Tablo 10’da gösterilmektedir. Tüm izolatların 16S rRNA PCR ile doğrulandığı, 53 ve 57 nolu izolatlarda (%20’sinde) *vapA* geni varlığının olduğu görülmektedir.

Tablo 10. *R. equi* PCR Sonuçları

Numune No	16S rRNA	<i>vapA</i>	<i>vapB</i>
20	Pozitif	Negatif	Negatif
33	Pozitif	Negatif	Negatif
53	Pozitif	Pozitif	Negatif
56	Pozitif	Negatif	Negatif
57	Pozitif	Pozitif	Negatif
60	Pozitif	Negatif	Negatif
61	Pozitif	Negatif	Negatif
77	Pozitif	Negatif	Negatif
82	Pozitif	Negatif	Negatif
90	Pozitif	Negatif	Negatif

4.3. Antibiyogram sonuçları

Araştırmamızda identifiye edilen 10 *R. equi* izolatının mikrodilüsyon tekniği ile 11 farklı antimikrobiyel ajana karşı duyarlılıkları tespit edilmiştir. *R. equi* izolatlarının MIC değerleri Tablo 11’de görülmektedir.



Tablo.11 *R. equi* (n=10) izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirten MIC değerleri

Antibiyotikler	MIC Değerleri (µg/ml)													MIC 50 (µg/ml)	MIC 90 (µg/ml)	MIC Aralığı (µg/ml)
	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			
Amoksisilin					1	2	2				4	1		≤4	≥64	1-128
Streptomisin				1	2	1	1			3	2			≤4	64	0,5-64
Kanamisin							1	1		1	4	2	1	≤64	≥128	4-256
Amoksisilin Klavulanik Asit					2	2					3	3		≤64	128	1-128
Amikasin							2	1			3	3	1	≤64	≥128	4-256
Klaritromisin					1	2	1	2	3	1				≤8	≥16	1-32
Azitromisin					2	1	1	1	2	3				≤8	32	1-32
Sefoksitin					1	1		1	4	2	1			≤16	≥32	1-64
Klindamisin				2		1	1	4	2					≤8	16	1-16
Rifampisin				3			1	4	2					≤8	16	1-16
Eritromisin			2		1	2		1	4					≤2	16	0,25-16

Araştırmamızda identifiye edilen *R. equi* (n=10) izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirten MIC değerleri incelendiğinde, MIC aralığının $\leq 0,25$ - ≥ 256 aralığında olduğu görülmektedir. En düşük MIC50 değeri ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ ile eritromisinde, en yüksek MIC90 değeri ise ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ düzeyi ile kanamisin ve amikasinde görülmektedir. Araştırmamızda kullanılan antibiyotiklerin CLSI standartları Tablo 12’de gösterilmektedir.

Tablo 12. *R. equi* CLSI AST MIC standartları

	Antimikrobiyel Ajan	S	I	R
AML	Amoksisilin	≤ 8		≥ 32
S	Streptomisin	≤ 6		≥ 25
K	Kanamisin	≤ 16	32	≥ 64
AMC	Amoksisilin Klavulanik Asit	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
AK	Amikasin	≤ 16	32	≥ 64
CLR	Klaritromisin	≤ 2	4	≥ 8
AZM	Azitromisin	≤ 2	4	≥ 8
FOX	Sefoksitin	≤ 4		≥ 8
DA	Klindamisin	$\leq 0,5$	1-2	≥ 4
RD	Rifampin	≤ 1	2	≥ 4
E	Eritromisin	$\leq 0,5$	1-4	≥ 8

S: Duyarlı (Susceptible), I: Intermediate, R: Dirençli (Resistant)
CLSI M100, VET06, M31-A4, M31-S2 (2013)’den modifiye edilmiştir.

Araştırmamızda identifiye edilen *R. equi* (n=10) izolatlarının antibiyogram sonuçları CLSI standartlarına göre değerlendirildiğinde, izolatların %80’inin sefoksitine, %70’inin kanamisin, amikasin, klindamisin ve rifampine, %60’ının Amoksisilin-Klavulanik asit, klaritromisin ve azitromisine in vitro dirençli oldukları tespit edilmiştir. *R. equi* (n=10) izolatlarının %60’ının streptomisine ve %50’sinin amoksisilin ve eritromisine duyarlı oldukları görülmektedir (Tablo 13).

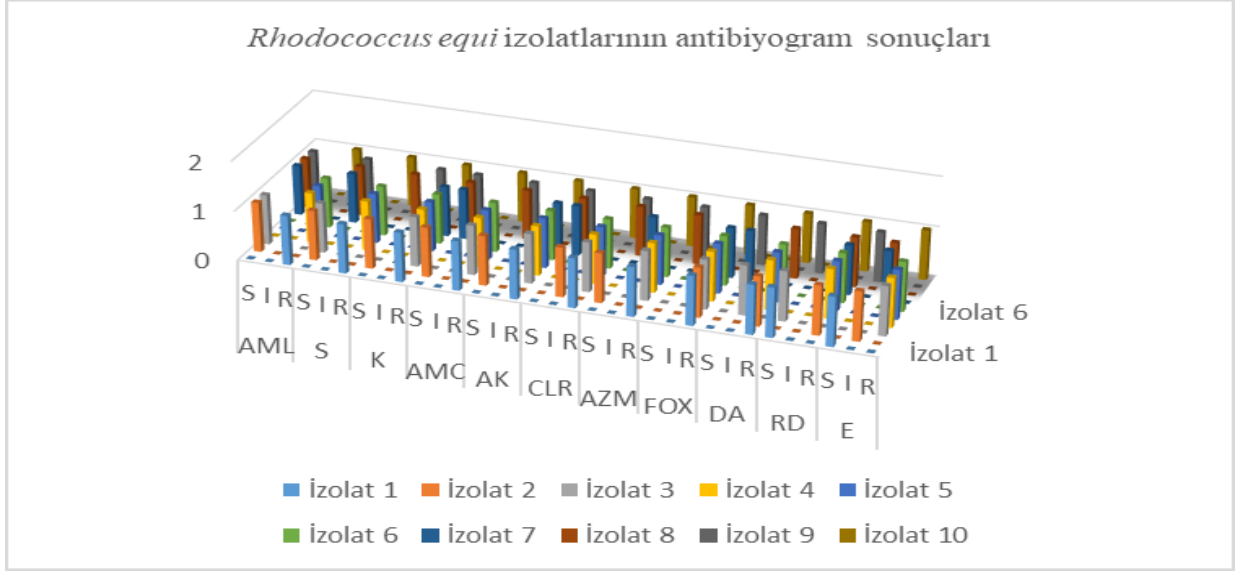
Tablo 13. Antibiyogram Sonuçları

Örnek No	AML	S	K	AMC	AK	CLR	AZM	FOX	DA	RD	E
20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
33	S	S	S	S	S	I	S	R	R	R	I
53	S	S	R	R	R	R	R	R	I	S	R
56	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
57	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
60	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
61	S	S	R	S	R	S	I	R	S	R	I
77	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I
82	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
90	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S: Duyarlı, I: Orta Derece Dirençli, R: Dirençli; AML: Amoksisilin, S: Streptomisin, K: Kanamisin, AMC: Amoksisilin Klavulanik asit, AK: Amikasin, CLR: Klaritromisin, AZM: Azitromisin, FOX: Sefoksitin, DA: Klindamisin, RD: Rifampisin, E: Eritromisin

R. equi (n=10) izolatlarının antibiyogram tablosu incelendiğinde, 56,57,60,90 nolu (n=4) izolatların araştırmamızda kullanılan 11 antibiyotiğe karşı çoklu antibiyotik direnci geliştirdiği belirlenmiştir (Grafik 2).

şekil 5. *R. equi* antibiyogram sonuçları



TARTIŞMA

Bir çok organizma taylarda pnömoni oluşturabilmesine rağmen, *R. equi* enfeksiyonları taylarda görülen şiddetli pnömoninin en yaygın sebebidir (Prescott, 1991; Takai ve ark, 1995). Dünya genelinde geniş bir yayılıma sahip *R. equi* tay pnömonisi (REFP) bazı çiftliklerde endemik görülürken, bazılarında sporadik, kimi çiftliklerde ise hiç görülmemektedir (Prescott, 1991). REFP'nin endemik görüldüğü çiftliklerde ise kümülatif insidensler arasında belirgin farklılıklar vardır (Chaffin ve ark, 2003; Cohen ve ark, 2005). Bunun yanısıra, hastalığın endemik görüldüğü bu çiftliklerde tanı çiftlik menejerleri ve Veteriner Hekimler tarafından çoğunlukla varsayıma dayalı yapılır. Bunun nedeni, tanıda altın standart olarak kabul edilen TBA kültürü tekniğinin (Giguère ve Prescott, 1997), tayların sağlığını tehdit edebilmesi, uzun süre ve fiziksel efor gerektirmesi ve maaliyetinin yüksek olmasıdır. Sonuç olarak taylarda hastalığa neden olan *R. equi*'nin populasyon seviyesinde yükünü tam olarak karakterize etmek zordur. Genel olarak, 0-6 aylık taylarda kümülatif insidensin %10-20 arasında olduğu düşünülmektedir (Chaffin ve ark, 2003a, Chaffin ve ark, 2003b).

R. equi'ye bağlı akciğer abseleşmelerini erken tespit edebilmek için ultrasonografik taramalar bir çok çiftlikte artan bir sıklıkla kullanılmaktadır. Taylar, ultrasonografik bulgular neticesinde *R. equi* için tedavi edildiğinde, ileride klinik hastalık tablosu göstermeyecek taylar, klinik hastalık tablosu sergileyecek taylarla bir tutulduğundan kümülatif insidenste artış meydana gelir. Örnek olarak Teksas'ta büyük bir yetiştirme çiftliğinde 270 tayla yapılan çalışmada, bu tayların %80'i (216/270) ultrasonografik bulgu (çapı 10mm den büyük abseler ve konsolidasyon) sergilemiş, bu 216 tayın sadece 46 tanesi (%21) ileri de klinik hastalık tablosu göstermiştir (Chaffin ve ark, 2013).

REFP klinik belirtileri genellikle yavaş gelişir ve akciğerlerde abseler oluşuncaya kadar farkedilmesi zordur, geç beliren klinik belirtiler tanı ve tedaviye başlama sürelerini geciktirerek prognozu da etkiler. Tanıda altın standart olan TBA sıvısı kültürü methoduyla; muhtemel antibiyotik kullanımı (Hondalus ve Mosser, 1994; Lavoie ve ark, 1994) ya da farklı patojen mikroorganizmaların varlığında (Falcon ve ark, 1985) tek bir örnekten *R. equi* üretmenin zor olabileceği bildirilmiştir. Nekropside pozitif *R. equi* kültürü veren 11 taydan 7 si (%62) ve akciğer abselerinin radyografik görüntülediği 89 taydan 57 tanesi (%64) TBA sıvısı kültüründe pozitif bulunmuştur (Hillidge, 1987). Diğer çalışmalar, daha sonradan nekropsiyile *R. equi* konfirmasyonu yapılan vakaların TBA kültürlerinden %100 pozitif sonuç almıştır (Lavoie ve ark, 1994; Muller ve Madigan, 1992).

Farklı örnekleme tekniklerinin sonuçlarının araştırıldığı bir çalışmada, öksürük, nasal akıntı, patolojik akciğer sesleri, ateş ve artmış respirasyon sayısı olan 0-8 aylık 53 taydan alınan TBA sıvısı, nasal svap, serum ve plazma numunelerinin kültür, seroloji ve PCR la tanısı gerçekleştirilmiş, kültürü yapılan (Colistin-Nalidiksik asit agar ve %5 koyun eritrositi eklenmiş Columbia agar da %5 CO₂ 37°C) 51 TBA örneğinden 48 tanesinde (%94.1) bakteriyel üreme gözlenmiş, üreme gerçekleşen örneklerin 10 tanesinde (%18.9) *R. equi* izole edilmiştir. *R. equi* pozitif 10 örneğin 9 tanesi PCR ile Virülans Plazmidi (VP) pozitif, 1 tanesi VP negatif bulunmuştur. Aynı çalışmada 38 nasal svap örneğinin 6 tanesi (%15,8) PCR ile VP pozitif, 36 nasal svap örneğinin 5 tanesi (%13.9) *R. equi* 16S rRNA pozitif bulunmuştur. Çalışma sonunda *R. equi* VP için nasal svap PCR (VP) sensitivitesi %50, spesifitesi %88, hastalık insidansı %18 bulunmuştur (Sellon ve ark, 2001).

Nasotracheal ve transtracheal aspirasyon tekniklerinin tanısal değerini ölçmek için pnömoni tablosu olan 117 tayla yapılan diğer bir çalışmada, 96 taydan alınan nasotracheal aspirasyon örneklerden 59 tanesinde (%61), 21 taydan alınan transtracheal aspirasyon örneklerden 14 tanesinde (%66) *R. equi* pozitif kültür (%10 at kanı eklenmiş triptik soy agar, DHL agar, NANAT) sonucu alınmıştır. Nasofarinkteki mikroorganizmaların nasotracheal aspirat örneklerini kontaminasyonunu değerlendirmek için yapılan nasal svap kültürlerinde 56 örnekten 2 tanesi *R. equi* pozitif bulunmuştur. (Hashikura ve ark, 2000).

R. equi'nin ekolojisi ve atlarda, domuzlarda ve insanlarda oluşturduğu hastalığın epidemiyolojisi hakkındaki çalışmalar, Woolcock ve arkadaşları tarafından (1979) geliştirilen selektif bir medya ile hız kazanmıştır. Diğer birçok kompetitif mikroorganizmanın üremesini engelleyen bu selektif medya triptikaz soy agara nalidiksik asit (20µg/ml), novobiosin (25 µg/ml), sikloheksimid (40 µg/ml) ve potasyum tellurit (%0.005) eklenmesiyle elde edilmiş ve NANAT olarak adlandırılmıştır. Eklenen nalidiksik asit hem Gram negatif hem Gram pozitif bakterilere, novobiosin stafilokoklara, sikloheksimid mantarlara ve potasyum tellurit bir çok anaerobik ve aerobik bakteriye karşı etkilidir. NANAT, bulunduğu günden beri *R. equi* ile ilgili ekolojik ve epidemiyolojik çalışmalarda rutin olarak kullanılmaktadır (Woolcock ve ark, 1980, Takai ve ark, 2001).

von Graevenitz ve Punter-Streit tarafından (1995) geliştirilen alternatif bir selektif medya, Mueller-Hinton agara ceftazidime (20 µg/ml) ve novobiocin (25µg/ml) eklenmesiyle elde edilmiş, CAZ-NB olarak adlandırılmıştır. NANAT besi yerinde izole edilemeyen 11 *R. equi* suşu, CAZ-NB besi yerinde üreyebilmiştir. *R. equi* üremesinin minimum inhibisyonu ve diğer birçok ilgili aktinomisetlerin ve Gram negatif kontaminantların üremesinin inhibisyonu, CAZ-NB'nin *R. equi* izolasyonu için daha elverişli bir medya olduğunu düşündürmüştür (von

Graevenitz ve Punter-Streit, 1995). Fungal üremeler bu medyada bir problem olarak görülmüş, anisomycin eklenmesi bu problemin çözülmesi için önerilmiştir.

Toprak örneklerinden *R. equi* izolasyonunda bu iki selektif medyanın karşılaştırmasını yapan ilk çalışmada (Martens ve ark, 2000), bir medyada üreyen örnekler, çoğunlukla diğer medyada ürememiştir. Japonya ve Amerikada iki farklı laboratuarda farklı medya (Japonya-NANAT, Texas-CAZ-NB) kullanılarak kültürlenmiş örneklerden, *R. equi* endemik çiftliklerden alınan 33 çift örnekten 12 tanesi (%36,4), kontrol çiftliklerinden alınan 33 çift örnekten 18 tanesi (%54,5) her iki medyada da üremiştir. Toplamda her iki medyanın ortak pozitif kültür sonuç oranı %48,5 bulunmuştur.

Tanımlanmış 6 farklı klinik *R. equi* suşunun izolasyonu ile avirulent ve virulent *R. equi*'nin 60 çift toprak numunesinden izolasyonu ve sayımı için bu iki selektif medyayı karşılaştıran diğer bir çalışmada (Muscatello ve ark, 2007), CAZ-NB medyası fungal üremenin inhibisyonu için 40 µg/ml sikloheksimid eklenerek modifiye edilmiş (mCAZ-NB), tanımlanmış 6 farklı *R. equi* suşu içeren toplam 7 klinik izolatin kurtarılabiliirliği ve toprak örneklerinde pozitif kültür veren avirulent ve virulent *R. equi* oranı iki medya arasında belirgin bir fark göstermemiştir. mCAZ-NB medyasında kültürlenmiş toprak örneklerinde belirgin olarak daha fazla sayıda virulent *R. equi* kolonisi üremiş, mCAZ-NB medyasında üreyen virulen *R. equi* oranı, NANAT medyasında olandan 3 kat fazla bulunmuştur.

Çalışmamızda örnekleme kısmında *R. equi* tanısı için altın standart olan TBA sıvısı kullanılmamasının nedeni bu örnekleme tekniğinin deneyimli personel ve ekipman gerektirmesi ve çiftlik yönetimi ile at sahiplerinin tayların sağlığını göz önünde bulundurmuş olmasıdır.

Çalışmamızda NANAT besi yerine ekimi yapılmış 90 farklı nasal svap örneğinden 10 (%11,1) tanesinde üreme gerçekleşmiş, üreyen tüm kolonilerin küçük (1-2mm çapında), siyah, pürüzsüz ve parlak morfolojileri *R. equi* izolasyonunda daha önce yapılmış çalışma sonuçlarıyla örtüşmüştür (Soedarmanto ve ark, 1997; Fuhrmann ve Lammler, 1997; Chaffin ve ark, 2003a, Chaffin ve ark, 2003b). İzolasyon sonrasında yapılan katalaz, oksidaz, lipaz, fosfataz ve üreaz gibi biyokimyasal testler ve gram boyama gibi kültür özellikleri tür bazında identifikasyon için ilk önemli verileri sağlamıştır.

Fekal ve nasal svap örneklerinde *R. equi*'nin PCR ile tespitinin tanısal değerlendirmesinin yapıldığı bir başka çalışmada, pnömoni belirtileri gösteren 1-7 aylık 31 taydan 12 tanesi (%39) anamnez, klinik belirtiler, radyografik ve laboratuvar bulguları (CBC, Biyokimyasal panel, TBA sıvı sitolojisi), kültür ve PCR sonuçları ve postmortem bulgularla *R. equi* pozitif kabul edilmiş, bu 12 tayın 1 tanesi nasal svap PCR sonucu *R. equi* pozitif, 9 tanesi

fekal PCR sonucu *R. equi* pozitif sonuç vermiş, çalışma sonuçlarına göre TBA sıvısı kültürü %82 sensitivite, %100 spesifite, TBA sıvısı PCR %100 sensitivite ve %100 spesifite, nasal svap PCR %8,3 sensitivite ve %100 spesifite, fekal PCR %75 sensitivite, %100 spesifite göstermiştir (Pusterla ve ark, 2007).

Bazı çalışmalarda *R. equi*'nin klinik örneklerden tespitinde 16S rRNA PCR metodu, kültür metodundan daha hassas bulunmuştur (Vivrette ve ark, 2000, Mir ve ark, 2014). Buna rağmen, PCR methoduyla ölü ve canlı mikroorganizmaların ayrımı mümkün değildir, yüksek duyarlılığa bağlı hatalı pozitif sonuçlar, tekniğin pahalı ekipman ve uzman personel gerektirmesi diğer dezavantajlarıdır.

Biyokimyasal testler sonrasında tür identifikasyonunun PCR ile konfirmasyonu için, *R. equi* spesifik 16S rRNA kodlayan gen sekansı hedeflenmiş, ve geçmişteki çalışmalarda (Bell ve ark, 1996) olduğu gibi, dizayn edilen primerler *R. equi*'yi bu cinsin diğer türlerinden açıkça ayırt etmiştir.

Çalışmamızda kültür özelliklerine göre ön identifikasyonları yapılmış 10 örneğin 10 (%100)'u, 16S rRNA PCR sonucu *R. equi* olarak tespit edilmiştir. Benzer metodoloji ile tür spesifik DNA amplikasyonunun yapıldığı diğer bir çalışmada, yetişkin atlardan alınan 98 ve taylardan alınan 43 nasal svap örneğinden sırasıyla 3 ve 9 adet *R. equi* pozitif sonuç alınmış, prevalans yetişkin atlar için %4,08 ve taylar için %25,58 bulunmuştur (Mir ve ark, 2014). Araştırmamızda ise taylarda *R. equi* prevalansı %11,1 oranında bulunmuştur.

R. equi enfeksiyonunun virülans mekanizmalarının anlaşılmasında büyük bir adım vap ailesi genlerinin bulunmasıyla atılmıştır (Takai ve ark, 1991, Tan ve ark, 1995). Bu genler *R. equi*'ye makrofajlar içinde çoğalıp, fagozomun oluşmasını engelleme kabiliyetini verir. *R. equi* genelde sağlıklı atlar ve topraktan izole edilse de, virülans ilişkili genlerin tespiti, *R. equi* enfeksiyonlarının patojenitesini karakterize etmede önemlidir (Monego ve ark, 2009). Patojenitenin belirlenmesinde *vapA* geninin tespiti, kongo kırmızısı bağlanması, konvensiyonel bakteriyel testler, antibiyotik resistansı ve karbon kaynakları taşımalarının tespitinden daha etkili bulunmuştur (DeLa-PenaMoctezuma ve ark, 1996). Bir çok çalışma *vapA* genini *R. equi* patojenitesi ve taylardaki letalite ile ilişkilendirmiştir (Takai ve ark, 1995; Takai ve ark 1996, Wada ve ark, 1997) ve bu gen atlarda ve insanlarda patojenitenin epidemiyolojik çalışmalarında kullanılmıştır (Cohen ve ark, 2005; Takai ve ark, 1999).

Rhodococcus equi pangenomu 2016 senesinde açıklanmış (Anastasi ve ark, 2016), aynı grup *R. equi* virülans genomunun karşılaştırmalı analizini 2017 senesinde yayınlamıştır (MacArthur ve ark, 2017). Konak ilişkili 3 plazmidten sirküler yapıdaki pVAPA plazmidi at türüyle, sirküler yapıdaki pVAPB plazmidi domuz türüyle (Letek ve ark, 2008), lineer yapıdaki

pVAPN sığır türüyle ilişkilendirilmiştir (Valero-Rello ve ark, 2015) Her üç tip plasmid insanlarda görülmüştür (Ocampo-Sosa ve ark, 2007).

Çalışmamızda 16S rRNA tür identifikasyonu yapılan 10 örnekten 2 tanesi *vapA* pozitif bulunmuş ve virulent *R. equi* görülme oranı %20 olarak hesaplanmıştır. Araştırmamızda moleküler yöntemle tür identifikasyonu yapılan 10 adet örneğin *vapB* genine yönelik PCR amplikasyonunda, örneklerde *vapB* geni varlığı tespit edilmemiştir.

Taylardan örneklenen *R. equi* izolatlarının çoğunun makrolidlere ve rifampine yüksek oranda duyarlı olmasına rağmen, her iki sınıf ilaca direnci olan suşlar rapor edilmiştir. Rifampinin tek başına kullanılması direnç oluşumunu hızlandıracığı için önerilmemektedir (Nordmann ve Ronco, 1992; Takai ve ark, 1997). Direnç gelişimi, RNA polimeraz β -alt ünitesi kodlayan *rpoB* genindeki mutasyonla ilişkilidir (Asoh ve ark, 2003; Fines ve ark, 2001). Eritromisin ve Rifampine tedavi süresinde progresif gelişen dirençlilik çok seyrek olmasına rağmen rapor edilmiştir (Kenney ve ark, 1994). Giguere ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Florida ve Teksas eyaletlerindeki taylardan 10 senelik süre boyunca toplanan örneklerde rastlanan dirençlilik prevalansı %4 bulunmuştur. Aynı çalışma dirençli suşlarla enfekte tayların ölüm oranınının 7 kat fazla olduğunu bulmuştur (Giguere ve ark, 2010). Buna ek olarak aynı çalışma, makrolidlere duyarlı bazı *R. equi* suşlarının dirençli olarak yanlış sınıflandırıldığını, bu yüzden dirençlilik söz konusu olduğunda laboratuarlarda testin tekrar edilmesini önermiştir

Makrolidlerin ve rifampinin subklinik taylarda yaygın kullanılması sonucu dirençli suşlar bildirilmiştir (Chaffin ve ark, 2009; Coleman ve ark, 2010). Burton ve arkadaşları, Kentucky eyaletinde bir yetiştirme çiftliğinden topladıkları 38 örneğin 14 tanesinde makrolid ve rifampine dirençli izolatlar bulmuştur. Aynı çalışmada dirençlilik insidensi tedaviye başlamamış taylarda %24, tedavi görmüş taylarda %62 olarak tespit edilmiştir (Burton ve ark, 2013). Riesenber ve arkadaşları tarafından 200 *R. equi* izolatıyla yapılan bir çalışmada *R. equi* örneklerinin %3'ü rifampin dirençli bulunmuştur (2013).

Makrolid tedavisi esnasında diyare geliştiren tayların ya da makrolid dirençli suşlarla enfekte tayların tedavisi, alternatif antimikrobiyellerin limitli olmasından dolayı sorun oluşturmaktadır. Makrolid ve rifampine dirençli *R. equi* suşları in vitro olarak florokinonlara, aminoglikozitlere, oksalolidinonlara ve glikopeptid antimikrobiyelerine duyarlı bulunmuştur (Carlson ve ark, 2010; Giguere ve ark, 2010). Yapılan bir çalışmada, 24 izolattan 18 tanesi ayrıca kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim sülfametoksazole duyarlı bulunmuştur (Giguere ve ark, 2010).

Makrolidlere ve rifampine duyarlı suşlarla enfekte tayların tedavisi için tercih edilen antimikrobiyellerin listelendiği bir veri bulunmamaktadır. Bu konudaki data eksikliklerine rağmen taylarda *R. equi* tedavisinde birçok farklı sınıf antimikrobiyel kullanılmıştır. Oral doksisisilin, rifampinle kombine kullanıldığında, taylarda *R. equi* pnömonisini tedavi ettiği konusunda anektodal bilgiler mevcuttur. Doksisisiklin ve rifampin in vitro olarak *R. equi*'ye karşı güçlü sinerjistik etki gösterirler (Giguere ve ark, 2012).

Araştırmamızda identifiye edilen 10 *R. equi* izolatının mikrodilüsyon tekniği ile 11 farklı antimikrobiyel ajana karşı duyarlılıkları tespit edilmiştir. İdentifiye edilen *R. equi* (n=10) izolatlarının antibiyogram sonuçları CLSI standartlarına göre değerlendirildiğinde, izolatların %80'inin sefoksitine, %70'inin kanamisin, amikasin, klindamisin ve rifampine, %60'ının amoksisilin-klavulanik asit, klaritromisin ve azitromisine dirençli oldukları tespit edilmiştir. *R. equi* (n=10) izolatlarının %60'ının streptomisine ve %50'sinin amoksisilin ve eritromisine duyarlı oldukları görülmektedir. Araştırmamızda *vapA* geni pozitif olan iki izolattan birinin kullanılan 11 antibiyotiğe dirençli ve diğer izolatın ise yedi antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir. İzolatlarda tespit edilen klaritromisin, azitromisin, rifampin direnci varlığı daha önce yapılan araştırmalarla uyum göstermektedir (Chaffin ve ark, 2009; Coleman ve ark, 2010; Burton ve ark, 2013).

Antibiyogram sonuçları klinik tedavi yönünden değerlendirildiğinde, bu sonuçlarının in vitro olduğu unutulmamalı, ve *R. equi*'nin makrofajlarda hücreiçi yerleşiminden dolayı, seçilecek antibiyotiklerin hücre penetrasyon özelliklerinin göz önünde bulundurulması gerekir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Marmara Bölgesindeki yarış atı yetiştirme çiftliklerinden toplanan numunelerde *R. equi* varlığının konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması, izolatların moleküler karakterizasyonu ve patojen suşların moleküler yöntemlerle tespit edilmesi ve in vitro antimikrobiyel duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda taylardan alınan 90 adet nazal svap örneğinden NANAT *R. equi* selektif besiyerine ekim yapılmış, biyokimyasal testler ve BD Phoenix otomatize identifikasyon sistemiyle doğrulanarak 10 adet (%11,1) *R. equi* izolatu elde edilmiştir. Elde edilen suşlarının moleküler yöntemlerle doğrulanması amacıyla öncelikle 16S rRNA PCR işlemine tabi tutulmuş ve tüm izolatların (%100) *R. equi* olduğu tespit edilmiştir. Moleküler doğrulaması yapılan *R. equi* izolatlarından 2 (%20)'sinde *vapA* geni varlığı belirlenirken, hiçbir izolatta *vapB* geni varlığı bulunmamıştır.

Araştırmamızda identifiye edilen 10 *R. equi* izolatının mikrodilüsyon tekniği ile 11 farklı antimikrobiyel ajana karşı duyarlılıkları tespit edilmiştir. İdentifiye edilen *R. equi* (n=10) izolatlarının MIC aralığının $\leq 0,25$ - ≥ 256 aralığında olduğu görülmüştür. En düşük MIC50 değeri ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ ile eritromisinde, en yüksek MIC90 değeri ise ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ düzeyi ile kanamisin ve amikasinde görülmüştür. İzolatların %80'inin sefoksitine, %70'inin kanamisin, amikasin, klindamisin ve rifampine, %60'ının amoksisilin-klavulanik asit, klaritromisin ve azitromisine dirençli oldukları tespit edilmiştir. *R. equi* (n=10) izolatlarının %60'ının streptomisine ve %50'sinin amoksisilin ve eritromisine duyarlı oldukları belirlenmiştir. *R. equi* (n=10) izolatlarının antibiyogram tablosu incelendiğinde, 4 izolatın araştırmamızda kullanılan 11 antibiyotiğe karşı çoklu antibiyotik direnci geliştirdiği belirlenmiştir.

Klinik olarak etkili tek kombinasyon olan makrolidler ve rifampine gelişen dirençlilik, alternatif tedavi protokollerinin geliştirilememiş olmasından dolayı büyük önem arz etmektedir. Dirençli örneklerin sayısındaki artış, endemik çiftliklerde kontrol amaçlı yapılan ultrason taramaları sonucunda henüz klinik belirti göstermeyen tayların antimikrobiyel tedaviye başlatılmasıyla ilişkilendirilebilir. Bu sebeple, Veteriner Hekimlerin ve çiftlik yönetimlerinin, klinik pnömoni tablosu göstermeyen taylara tedavi uygulamadan önce mümkünse nazal svap veya TBA sıvısından alınan örneklerden kültür, sitoloji ve özellikle moleküler yöntemler ile tanıyı kesinleştirmeleri ve tayın klinik tablosunu daha detaylı inceleyerek karar vermeleri önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aderem A, Underhill DM.** Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Ann Rev Immunol* 1999, 17, 593-623.
- Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clark S.** Neonatal adaptive immunity comes of age. *National Reviews Immunology* 2004, 4, 553-564.
- Ainsworth DM, Weldon AD, Beck KA.** Recognition of *Pneumocystis carinii* in foals with respiratory distress, *Equine Veterinary Journal* 1993, 25, 103.
- Ainsworth DM.** The impact of foal pneumonia on future racing performance. *Proceedings Dubai International Equine Symposium*, s 241-243, 29 Mart-1 Nisan 1997, Dubai.
- Al-Graibawi MAA, MohammedQA.** Molecular Detection of *vapA* and *vapB* genes in *Rhodococcus equi* isolated from human and horses by multiplex PCR in Baghdad. *Journal of Animal Health and Production* 2016, 4, 1, 9-14.
- Alpuche Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI.** *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89, 10079 - 10083
- Anastasi E, MacArthur I, Scotti M, Alvarez S, Giguère S, Vázquez-Boland JA.** Pangenome and Phylogenomic Analysis of the Pathogenic Actinobacterium *Rhodococcus equi*. *Genome Biology and Evolution* 2016, 23, 8, 3140-3148.
- Anzai T, Wada R, Nakanishi A.** Comparison of tracheal aspiration with other tests for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, *Veterinary Microbiology* 1997, 56, 335.
- Ardans AA, Hietala SK, Spensley MS.** Studies of naturally occurring and experimental *Rhodococcus equi* (*Corynebacterium equi*) pneumonia in foals, *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners* 1986, 32, 129.
- Armstrong JA, Hart PD.** Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli, reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *Journal of Experimental Medicine* 1975, 142, 1-16.
- Arora K, Whiteford DC, Lau-Bonilla Di Davitt CM, Dahl JL.** Inactivation of *lsr2* results in a hypermotile phenotype in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* 2008, 190, 4291- 4300.
- Asoh N, Watanabe H, Fines-Guyon M, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Kunsuikmengrai K, Kahintapong S, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T.** Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* with several types of

mutations in the *rpoB* gene among AIDS patients in northern Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 2003, 41(6), 2337-2340.

Bargen KV, Haas. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews* 2009, 33, 5, 870–891.

Barton MD, Hughes KL. *Corynebacterium equi*: a review. *Veterinary Bulletin* 1980, 50, 65-80.

Bell KS, Philip JC, Christofi N. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction, *Letters in Applied Microbiology* 1996, 23, 72.

Benoit S, Benachour A, Taouji S, Auffray Y, Hartke A. H₂O₂ which causes macrophage related stress, triggers induction of Vap genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response. *Research in Microbiology* 2002, 152, 439-449.

Benoit S, Taouji S, Benachour A, Hartke A. Resistance of *Rhodococcus equi* to acid pH, *International Journal Food Microbiology* 2000, 55, 295-298.

Berghaus LJ, Giguère S, Sturgill TL, Bade D, Malinski TJ, Huang R. Plasma pharmacokinetics, pulmonary distribution, and in vitro activity of gamithromycin in foals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2012, 35, 59-66.

Boland CA, Meijer WG. The iron regulatory protein IdeR (DtxR) of *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Letters* 2000, 191, 1–5.

Boyd NK, Cohen ND, Lim WS, Martens RJ, Chaffin MK, Ball JM. Temporal changes in cytokine expression of foals during the first month of life. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2003, 92, 75-85.

Breathnach CC, Sturgill-Wright T, Stiltner JL, Adams AA, Lunn DP, Horov DW. Foals are interferon gamma-deficient at birth. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006, 112, 199-209.

Burton AJ, Giguère S, Sturgill TL, Berghaus LJ, Slovis NM, Whitman JL, Levering C, Cohen ND. Macrolide and rifampin resistant *Rhodococcus equi* on horse breeding farm, Kentucky, USA. *Emerging Infectious Diseases* 2013, 19, 282-285.

Byrne BA, Prescott JF, Palmer GH, Takai S, Nicholson VM, Alperin DC, Hines SA. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. *Infection and Immunity* 2001, 69, 650–656

Byrne GA, Russell DA, Chen X, Meijer WG. Transcriptional regulation of the virR operon of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Journal of Bacteriology* 2007, 189, 5082-5089.

Caldwell AL, Gulig PA. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid encodes a positive regulator of a plasmid-encoded virulence gene. *Journal Bacteriology* 1991, 173, 7176 - 7185.

Calhoun DH, Bonner CA, Gu W, Xie G, Jensen RA. The emerging periplasm-localized subclass of AroQ chorismate mutases, exemplified by those from *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biology* 2001, 2, research 0030, 1-16

Carlson K, Kuskie K, Chaffin K, Libal M, Giguère S, Lawhon S, Cohen N. 2010. Antimicrobial Activity of Tulathromycin and Other Antimicrobials Against Virulent *Rhodococcus equi* In Vitro. 2010 11, E1-E9.

Caston SS, McClure SR, Martens RJ, Chaffin MK, Miles KG, Griffith RW, Cohen ND. Effect of hyperimmune plasma on the severity of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in experimentally infected foals. *Veterinary Therapeutics* 2006, 7, 361-375.

Cauchard J, Sevin C, Ballet JJ, Taouji S. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Veterinary Microbiology* 2004, 104, 73-81.

Cauchard S, Giguère S, Venner S, Muscatello G, Cauchard J, Cohen ND, Haas A, Hines SA, Hondalus MK, Horohov DW, Meijer WG, Prescott JF, Vázquez Boland J. *Rhodococcus* research 2008-2012. *Equine Veterinary Journal* 2013, 45, 523-526.

Chaffin K, Cohen ND, Martens RJ, O'Connor M, Bernstein LR. Chemoprophylactic effects of gallium maltolate against *Rhodococcus equi* pneumonia among foals at endemic equine breeding farms. *Proceedings of the 55th annual meeting of the American Association of Equine Practitioners*, 2009, 55, 36-37.

Chaffin MK, Cohen ND, Blodgett GP, Syndergaard M. Evaluation of hematologic screening methods for early detection of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012a, 32, 20.

Chaffin MK, Cohen ND, Blodgett GP, Syndergaard M. Evaluation of hematologic screening methods for predicting subsequent onset of clinically apparent *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *American Association of Equine Practitioners Proceedings* 2013, 59, 267

Chaffin MK, Cohen ND, Blodgett GP, Syndergaard M. Evaluation of ultrasonographic screening methods for early detection of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012b, 32, 20-21.

Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ, Edwards RF, Nevill M. Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia on farms with endemic infection. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2003a, 223, 1791-1799.

Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ, O'Connor M, Bernstein LR. Evaluation of the efficacy

of gallium maltolate for chemoprophylaxis against pneumonia caused by *Rhodococcus equi* infection in foals. *American Journal of Veterinary Research* 2011, 72, 945-957.

Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ. Chemoprophylactic effects of azithromycin against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia among foals at equine breeding farms with endemic infections. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2008, 232, 1035-1047.

Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ. Evaluation of equine breeding farm characteristics as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2003b, 222, 467– 475.

Chaffin MK, Fajt V, Martens RJ, Arnold CE, Cohen ND, O’Conor M, Taylor RJ, Bernstein LR. Pharmacokinetics of an orally administered methylcellulose formulation of gallium maltolate in neonatal foals. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapy* 2010, 33, 376-382.

Chaffin MK, Martins RJ, Martens JG. Therapeutic effects of immune plasma in foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal* 1991, 12, 23-29.

Chen JM, German GJ, Alexander DC, Ren H, Tan T, Liu J. Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* 2006, 188, 633-641.

Chirino-Trejo JM, Prescott JF, Yager JA. Protection of foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1987, 51, 444-447.

Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *Journal of Biology and Chemistry* 1994, 269, 21–24.

Clemens DL, Hortwitz MA. The *mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously added transferrin. *Journal of Experimental Medicine* 1996, 184, 1-7.

Clemens DL. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Trends Microbiology* 1996, 4, 113-118.

CLSI National Committee for Clinical Laboratory Standards (M100- S15). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 2005. Vol. 15th Informational Supplement., Pennsylvania Wayne.

Cohen ND, Chaffin MK, Martens RJ. Control and prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 2000, 22, 1062-1070.

Cohen ND, Chaffin MK, Martens RJ. How to prevent and control pneumonia caused by *Rhodococcus equi* at affected Farms. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP vol48, s 295-299, 4-8 Aralık 2002, Orlando-FL.

Cohen ND, Chaffin MK, Vandenplas ML, Edwards RF, Nevill M, Moore JN, Martens RJ. Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal* 2005, 37, 212-216.

Cohen ND, Chaffin MK, Vandenplas ML. Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia, *Equine Veterinary Journal* 2005, 37, 212.

Cohen ND, O’Conor MS, Chaffin MK. Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2005, 226, 404–413.

Cohen ND, Smith KE, Ficht TA, Takai S, Libal MC, West BR, delRosario LS, Becu T, Leadon DP, Buckley T, Chaffin MK, Martens RJ, Epidemiologic study of results of pulse-field gel electrophoresis of isolates of *Rhodococcus equi* obtained from horses and horse farms. *American Journal of Veterinary Research* 2003, 64, 153-161.

Cohen ND. Epidemiology of *Rhodococcus equi* foal pneumonia. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. 2010, Baltimore MD USA

Colangeli R, Haq A, Arcus VI, Summers E, Magliozzo RS, McBride A, Mitra AK, Redjaina M, Khajo A, Jacobs Jr WR, Salgame P, Alland D. The multifunctional histone-like protein *Lsr2* protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. *Proceedings National Academy of Science* 2009, 106, 4414-4418.

Coleman M , Kuskie K, Liu M, Chaffin K, Libal M, Giguere S, Bemstein L, Cohen N. *In vitro* antimicrobial activity of gallium maltolate against virulent *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* 2010, 146, 175-178.

Darrah PA, Hondalus MK, Chen Q, Ischirropoulos H, Mosser DM. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activates macrophages. *Infection and Immunology* 2000, 68, 3587-3593.

Davis JL, Gardner SY, Jones SL, Schwabenton BA, Papich MG. Pharmacokinetics of azithromycin in foals after i.v. and oral dose and disposition into phagocytes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy* 2002, 25, 99-104.

Dawson DR, Nydam DV, Price CT, Graham JE, Cynamon MH, Divers TJ, Felipe MJ. Effects of opsonization of *Rhodococcus equi* on bacterial viability and phagocyte activation. *American Journal of Veterinary Research* 2011, 72, 1465-1475.

- DeLaPenaMoctezuma A, Prescott JF, Goodfellow M.** Attempts to find phenotypic markers of of the virulence plasmid of *Rhodococcus equi*. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1996, 60, 1, 29-33.
- Desjardins M.** Biogenesis of phagolysosomes, the “kiss and run” hypothesis. *Trends Cell Biology* 1995, 5, 183-186.
- Dungworth DL: The respiratory system.** In **Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N, editors: Pathology of domestic animals, ed 4, vol 2, San Diego, 1993, Academic Press, pp 652-655.**
- Eberson F.** A Bacteriologic Study of the Diphtheroid Organisms with Special Reference to Hodgkin's Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 1918, 23:1, 1-42.
- Falcon J, Smith BP, O'Brien TR.** Clinical and radiological findings in *Corynebacterium equi* pneumonia of foals, *Journal of American Veterinary Medicals Association* 1985, 186, 593-599.
- Fernandez AS, Prescott JF, Nicholson VM.** Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA)-enriched antigens. *Veterinary Microbiology* 1997, 56, 187-192.
- Fernandez-Mora E, Polidori M, Luhrmann A, Schaible UE, Haas A.** Maturation of *Rhodococcus equi* containing vacuol is arrested after completion of the early endosome stage. *Traffic* 2005, 6, 635-653.
- Fines M, Pronost S, Maillard K, Taouji S, Leclercq R.** Characterization of mutations in the *rpoB* gene associated with rifampin resistance in *Rhodococcus equi* isolated from foals. *Journal Clinical Microbiology* 2001, 39, 8, 2784-2787.
- Flaminio MJ, Nydam DV, Marquis H, Matychak MB, Giguere S.** Foal monocyte-derived dendritic cells become activated upon *Rhodococcus equi* infection. *Clinic Vaccine Immunology* 2009, 16, 176-183.
- Flaminio MJ, Rush BR, Shuman W.** Peripheral blood lymphocyte subpopulations and immunoglobulin concentrations in healthy foals and foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1999, 13, 206-212.
- Flynn O, Quigley F, Costello E, O'Grady D, Gogarty A, McGuirk J, Takai S.** Virulence associated protein characterization of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. *Veterinary Microbiology* 2001, 78, 221-228.
- Fraser G.** The effect on animal erythrocytes of combinations of diffusible substances produced by bacteria. *Journal of Pathology Bacteriology* 1964, 88, s 43-53.
- Fuhrmann C, Lammler Ch.** Charakterisierung von *Rhodococcus equi* Isolaten von Pferd und Mensch. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift*. 1997, 110, 54-59.

Fuhrmann C, Soedarmanto I, Lämmler C. Studies on the rod-coccus life cycle of *Rhodococcus equi*. *Journals of Veterinary Medicine Series B* 1997, 44, 287-294.

Fuller ME, Perreault N, Hawari J. Microaerophilic degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by three *Rhodococcus* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51, 313-318.

Garton NJ, Gilleron M, Brando T, Dan HH, Giguere S, Puzo G, Prescott JF, Sutcliffe IC. A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 31722–31733.

Giguere S, Cohen N, Chaffin MK. Diagnosis, treatment, control and prevention of inflections caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011a, 25, 1209.

Giguère S, Cohen ND, Chaffin MK, Slovis NM, Hondalus MK, Hines SA, Prescott JF. Diagnosis, treatment, control, and prevention of infections caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011b, 25, 1209-1220.

Giguère S, Gaskin JM, Miller C, Bowman JL. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2002, 220, 59-63.

Giguère S, Hernandez J, Gaskin J, Prescott JF, Takai S, Miller C. Performance of five serological assays for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 2003a, 10, 241-245.

Giguere S, Hernandez J, Gaskin J. Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia, *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2003, 223, 1300.

Giguère S, Hernandez J, Gaskin JM, Miller C, Bowman JL. Evaluation of WBC concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2003b, 12 222, 775-781.

Giguère S, Jacks S, Roberts GD, Hernandez J, Long MT, Ellis C. Retrospective comparison of azithromycin, clarithromycin, and erythromycin for the treatment of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2004, 18, 568-573.

Giguère S, Lee E, Williams E, Cohen ND, Chaffin MK, Halbert N, Martens RJ, Franklin RP, Clark CC, Slovis NM. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in

foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R. equi*. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2010, 237, 74-81.

Giguère S, Lee EA, Guldbach KM, Berghaus LJ. In vitro synergy, pharmacodynamics, and post antibiotic effect of 11 antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* 2012, 160, 207-213.

Giguère S, Prescott JF. Clinical manifestations, diagnosis, treatment and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Microbiology* 1997, 56, s 313-334.

Goethals K, Vereecke D, Jaziri M, Van Montagu M, Holsters M. Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annual Review Phytopathology* 2001, 39, 27–52.

Goodfellow M, Alderson G. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the “rhodochrous” complex. *Journal of General Microbiology* 1977, 100, 99-122.

Goodfellow M, Sangal V, Jones AL, Sutcliffe IC. Charting stormy waters: A commentary on the nomenclature of the equine pathogen variously named *Prescotella equi*, *Rhodococcus equi* and *Rhodococcus hoagii*. *Equine Veterinary Journal* 2015, 47, 508-509.

Gordon AH, Hart PD, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 1980, 286, 79–80

Graevenitz VA, Pünter-Streit V. Development of a new selective plating medium for *Rhodococcus equi*. *Microbiology Immunology* 1995, 39, 4, 283-284.

Grimm MB, Cohen ND, Slovis NM Evaluation of fecal samples from mares as a source of *R. equi* for their foals by use of a quantitative bacteriologic culture and colony immunoblot analyses. *American Journal of Veterinary Research* 2007, 68, 63–71.

Groisman EA. The pleiotropic two component regulatory system *PhoP-PhoQ*, *Journal of Bacteriology* 2001; 183, 1835–1842.

Gustafsson A, Baverud V, Gunnarsson A, Rantzen MH, Lindholm A, Franklin A. The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. *Equine Veterinary Journal* 1997, 29, 314-318.

Haas A, Lührmann A, Mauder N, Fernandez-Mora E, Schulze-Luhrmann J. Cell biology of *R. equi* infected macrophages: Phagosome biogenesis and host cell toxicity. *Dorothy Russell Havemeyer Foundation Workshop on Rhodococcus equi and equine rhodococcal pneumonia*, Temmuz 2002, Pullman, Washington.

Haghighi HR, Prescott JF. Assessment in mice of vapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. *Veterinary Immunology Immunopathology* 2005, 104, 215-225.

Halbert ND, Cohen ND, Slovis NM. Variations in equis SLC11A1 (NRAMP1) genes and associations with *Rhodococcus pneumonia* in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006, 20, 974-979

Hantke K. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion Microbiology* 2001, 4, 172–177.

Harris SP, Fujiwara N, Mealey RH, Alperin DC, Naka T, Goda R, Hines SA. Identification of *Rhodococcus equi* lipids recognized by host cytotoxic T lymphocytes. *Microbiology* 2010, 156, 1836-1847.

Harris SP, Hines MT, Mealey RH, Alperin DC, Hines SA. Early development of cytotoxic T lymphocytes in neonatal foals following oral inoculation with *Rhodococcus equi*. *Veterinary Immunology Immunopathology* 2011, 141, 312-316.

Hashikura S, Higuchi T, Taharaguchi S, Orita Y, Nanao Y, Takai S. Evaluation of nasotracheal aspiration as a diagnostic tool for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Equine Veterinary Journal* 2000, 32, 6, 560-564.

Hashikura S, Higuchi T, Taharaguchi S. Evaluation of nasotracheal aspiration as a diagnostic tool for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, *Equine Veterinary Journal* 2000, 32, 560.

Hietala SK ve Ardans AA. Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi* exposed and non-exposed foals. *Veterinary Microbiology* 1987, 14, 307-320.

Hietala SK, Ardans AA, Sansome A. Detection of *Corynebacterium equi*-specific antibody in horses by enzyme- linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary research* 1985, 46, 13–15

Higuchi T, Arakawa T, Hashikura S, Inui T, Senba H, Takai S. Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. *Zentralbl Veterinarmed* 1999, B 46, 641-648.

Higuchi T, Hashikura S, Hagiwara S. Isolation of virulent *Rhodococcus equi* from transtracheal aspirates of foals serodiagnosed by enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Veterinary Medicine Science* 1997, 59, 1097.

Hillidge CJ. Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Veterinary Microbiology* 1987, 14, 215-224.

Hines MT, Paasch KM, Alperin DC, Palmer GH, Westhoff NC, Hines SA. Immunity to *Rhodococcus equi*: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. *Veterinary Immunology Immunopathology* 2001, 79, 101-114.

Hines SA, Stone DM, Hines MT, Alperin DC, Knowles DP, Norton LK, Hamilton MJ, Davis WC, McGuire TC. Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the

lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic Gamma interferon production by CD4(+) and CD8(+) T Lymphocytes. *Clinical Diagnostic Lab Immunology* 2003, 10, 208-215.

Hondalus MK, Mosser DM. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infection and Immunology* 1994, 62, 4167-4175.

Hooper-McGrevy KE, Giguere S, Wilkie BN, Prescott JF. Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia. *American Journal of Veterinary Research*. 2001, 62, 1307-1313.

Hooper-McGrevy KE, Wilkie BN, Prescott JF. Virulence-associated protein-specific serum immunoglobulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent *R. equi*. *Vaccine* 2005, 23, 5760-5767.

Horin P, Sabakova K, Futas J. Immunity related gene single nucleotide polymorphisms associated with *Rhodococcus equi* infection in foals *International Journal Immunogenetics* 2010, 37, 67–71

Horowitz ML, Cohen ND, Takai S, Becu T, Chaffin MK, Chu KK, Magdesian KG, Martens RJ. Application of Sartwell's model (lognormal distribution of incubation periods) to age at onset and age at death of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia as evidence of perinatal infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2001, 15, 171-175.

Hulten C, Demmers S. Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen, *Equine Veterinary Journal* 2002, 34, 693.

Hurley JR, Begg AP. Failure of hyperimmune plasma to prevent pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Australian Veterinary Journal* 1995, 72, 418-420.

Ishino S, Kumagai K, Kuniyoshi S. Immunohistochemical observations on pneumonic lesions caused by *Rhodococcus equi* in foals, *Journal of Veterinary Medicine Science* 1992, 54, 509.

Jacks S, Giguere S, Crawford PC, Castleman WL. Experimental infection of neonatal foals with *Rhodococcus equi* triggers adult-like gamma interferon induction. *Clinical Vaccine Immunology* 2007, 14, 669-677.

Jacks S, Giguère S, Gronwall PR, Brown MP, Merritt KA. Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals. *American Journal of Veterinary Research* 2001, 62, 1870-1875.

Jacks S, Giguère S, Nguyen A. In vitro susceptibilities of *Rhodococcus equi* and other common equine pathogens to azithromycin, clarithromycin and 20 other antimicrobials. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2003, 47, 1742-1745.

- Jacks S, Giguere S.** Effects of inoculum size on cell-mediated and humoral immune responses of foals experimentally infected with *Rhodococcus equi*: a pilot study. *Veterinary Immunology Immunopathology* 2010, 133, 282-286.
- Jain S, Bloom BR, Hondalus MK.** Deletion of vapA Encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Molecular Microbiology* 2003, 50, 115-128.
- Jensen HL.** Studies on saprophytic mycobacteria and corynebacteria. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 1934, 59, 19-61.
- JL, Fontecave M.** Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry, *Biometals* 1999, 12, s 195-199
- Jones AL, Sutcliffe IC, Goodfellow M.** *Prescottella equi* gen. nov., comb. nov.: a new home for an old pathogen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2013a, 103, 655-671.
- Jones AL, Sutcliffe IC, Goodfellow M.** Proposal to replace the illegitimate genus name *Prescottia* Jones .2013 with the genus name *Prescottella* gen.nov. and to replace the illegitimate combination *Prescottia equi* Jones .2013 with *Prescottella equi* comb.nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2013b, 103, 1405-1407.
- Kakuda T, Miyazaki S, Hagiuda H, Takai S.** Transcriptional regulation by *VirR* and *VirS* of members of the *Rhodococcus equi* virulence associated protein multigene family. *Microbiology and Immunology* 2015, 59, 495-499.
- Kämpfer P, Dott W, Martin K, Glaeser SP.** *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. *International Journal Systemic Evolution Microbiology* 2014, 64, 755-761.
- Kanaly ST, Hines SA, Palmer GH.** Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. *Infection Immunology* 1995, 63, 3037-3041.
- Kanaly ST, Hines SA, Palmer GH.** Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4 T-lymphocyte-deficient transgenic mice. *Infection Immunology*. 1993, 61, 4929-4932.
- Kanaly ST, Hines SA, Palmer GH.** Transfer of a CD4+Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. *Infection Immunology* 1996, 64, 1126-1132.
- Karlson AG, Moses HE, Feldman WH.** *Corynebacterium equi* (Magnusson, 1923) in the submaxillary lymph nodes of swine. *Journal Infection Disease* 1940, 67, 243-251.

Kasuga-Aoki H, Takai S, Sasaki Y, Tsubaki S, Madarame H, Nakane A. Tumour necrosis factor and interferon-gamma are required in host resistance against virulent *Rhodococcus equi* infection in mice: cytokine production depends on the virulence levels of *R. equi*. *Immunology* 1999, 96, 122-127.

Kenney DG, Robbins SC, Prescott JF, Kaushik A, Baird JD. Development of reactive arthritis and resistance to erythromycin and rifampin in a foal during treatment for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal* 1994, 26, 3, 246-248.

Khan MY, Ali S, Baqi S. *Rhodococcus equi* pneumonia in a live related renal transplant recipient. *Journal of the Pakistan Medical Association* 2013, 63, 5, 635-638.

Kuskie K. Epidemiology of airborne virulent *rhodococcus equi* at horse, 2011

Lakritz J, Wilson WD, Berry CR. Bronchointerstitial pneumonia and respiratory distress in young horses: clinical, clinicopathologic, radiographic, and pathological findings in 23 cases (1984-1989), *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1993, 7, 277.

Lambert KN, Allen KD, Sussex IM. Cloning and characterization of an esophageal gland specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 1999, 12, 328–336.

Lavoie JP, Fiset L, Laverty S. Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses, *Equine Veterinary Journal* 1994, 26, 348-352.

Leadon D, Farrelly B, Fogarty U. Platelet counting in diagnosis of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Research* 1988, 123, 279.

Leclere M, Magdesian KG, Kass PH. Comparison of the clinical, microbiological, radiological and hematological features of foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi* and other bacteria, *Veterinary Journal* 2011, 187, 109.

Letek M, González P, Macarthur I, Rodríguez H, Freeman TC, Valero-Rello A, Blanco M, Buckley T, Cherevach I, Fahey R, Hapeshi A, Holdstock J, Leadon D, Navas J, Ocampo A, Quail MA, Sanders M, Scortti MM, Prescott JF, Fogarty U, Meijer WG, Parkhill J, Bentley SD, Vázquez-Boland JA. The genome of a pathogenic *rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genetics* 2010, 30, 6, 9, e1001145.

Letek M, Ocampo-Sosa AA, Sanders M, Fogarty U, Buckley T, Leadon DP, González P, Scortti M, Meijer WG, Parkhill J, Bentley S, Vázquez-Boland JA. Evolution of the *Rhodococcus equi* vap pathogenicity island seen through comparison of host-associated vapA and vapB virulence plasmids. *Journal of Bacteriology* 2008, 190, 17, 5797-5805.

- Lichtinger T, Reiss G, Benz R.** Biochemical Identification and Biophysical Characterization of a Channel-Forming Protein from *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of Bacteriology* 2000. 182(3), 764–770.
- Liu M, Bordin A, Liu T, Russell K, Cohen N.** Gene expression of innate Th1-, Th2-, and Th17-type cytokines during early life of neonatal foals in response to *Rhodococcus equi*. *Cytokine*, 2011, 56, 356-364.
- Liu T, Nerren J, Liu M, Martens R, Cohen N.** Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals. *Vaccine* 2009, 27, 674-683.
- Long M, Sellon DC.** Equine Infectious Diseases. Saunders Elsevier, Washington, 2007, 287-302.
- Lopez AM, Hines MT, Palmer GH, Alperin DC, Hines SA.** Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. *Clinical Diagnostics Laboratory Immunology* 2002, 9, 1270-1276.
- Lopez AM, Hines MT, Palmer GH, Knowles DP, Alperin DC, Hines SA.** Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the vapA gene of *Rhodococcus equi*. *Vaccine* 2003, 21, 3815-3825.
- Lopez AM, Townsend HG, Allen AL, Hondalus MK.** Safety and immunogenicity of a live-attenuated auxotrophic candidate vaccine against the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Vaccine* 2008, 26, 998-1009.
- Luhrmann A, Mauder N, Sydor T, Fernandez-Mora E, Schultze-Luehrmann J, Takai S, Haas A.** Necrotic death of *Rhodococcus equi* infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. *Infection Immunology* 2004, 72, 853-862.
- MacArtur I, Anastasi E, Alvarez S, Mariela S, Vasquez-Boland JA.** Comparative Genomics of *Rhodococcus equi* Virulence Plasmids Indicates Host-Driven Evolution of the vap Pathogenicity Island. *Genome Biology Evolution* 2017, 9, 5, 1241-1247.
- Madarame H, Takai S, Matsumoto C, Minamiyama K, Sasaki Y, Tsubaki S, Hasegawa Y, Nakane A.** Virulent and avirulent *Rhodococcus equi* infection in T-cell deficient athymic nude mice: pathologic, bacteriologic and immunologic responses. *FEMS Immunology Medicine Microbiology* 1997, 17, 251-262.
- Madarame H, Takai S, Morisawa N.** Immunohistochemical detection of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* in pulmonary lesions of foals, *Veterinary Pathology* 1996, 33, 341.
- Madigan JE, Hietala S, Muller N.** Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi*

pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. *Journal of Reproduction Fertility* 1991, 44, 571-578.

Magnusson H. Spezifische infektiöse pneumonie beim fohlen. Ein neuer eitererreger beim Pferd. *Arch. Wiss. Prakt. Tierheilk* 1923, 50, 22-37.

Majidzadeh M. ve Fatahi-Bafghi M. Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2018, 37, 2045–2062.

Marchiori E, Muller NL, de Mendonca RG. *Rhodococcus equi* pneumonia in AIDS: high resolution CT findings in five patients, *BR Journal Radiology* 2005, 78, 783.

Mariotti F, Cuteri V, Takai S. Immunohistochemical detection of virulence-associated *Rhodococcus equi* antigens in pulmonary and intestinal lesions in horses, *Journal Clinical Pathology* 2000, 123, 186.

Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical Veterinary Microbiology 2nd ed. *Mosby Elsevier* 2014, 135-145.

Martens RJ, Cohen ND, Chaffin MK, Takai S, Doherty CL, Angulo AB, Edwards RE. Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2002, 221, 825-833.

Martens RJ, Cohen ND, Chaffin MK. Association of pneumonia in foals caused by *Rhodococcus equi* with farm soil geochemistry. *American Journal of Veterinary Research* 2002, 63, 95–98

Martens RJ, Cohen ND, Chaffin MK. Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia of foals, *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2002, 221, 825.

Martens RJ, Cohen ND, Jones SL, Moore TA, Edwards JF. Protective role of neutrophils in mice experimentally infected with *Rhodococcus equi*. *Infection Immunology* 2005, 73, 7040-7042.

Martens RJ, Martens JG, Fiske RA, Hietala SK. *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. *Equine Veterinary Journal* 1989b, 21, 249-255.

Martens RJ, Martens JG, Fiske RA, *Rhodococcus equi* foal pneumonia: pathogenesis and immunoprophylaxis. *Proceedings American Association Equine Practitioners* 1989a, 35, 189-213.

Martens RJ, Martens JG, Fiske RA. Failure of passive immunization by colostrum from immunized mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal* 1991, 12, 19-22.

- Martens RJ, Martens JG, Fiske RA.** *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals, *Equine Veterinary Journal* 1989, 21, 249.
- Martens RJ, Takai S, Cohen ND.** Association of disease with isolation and virulence of *Rhodococcus equi* from farm soil and foals with pneumonia. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2000, 217, 200-225.
- Mayorga LS, Bertini F, Stahl PD.** Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell-free system. *Journal Biology Chemistry* 1991, 266, s 6511–6517.
- McCracken JL, Slovis NM.** Use of thoracic ultrasound for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia on endemic farms. *Proceedings American Association Equine Practitioners* 2009, 55, 38-44.
- McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Mihre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJ, Holt R, Brinkman FS, Miyauchi K, Fukuda M, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD.** The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *PNAS* 2006, 103 (42), 15582–15587.
- Meijer GW, Prescott JF.** *Rhodococcus equi*. *Vet Res* 2004, 35, 383-396.
- Mendoza FJ, Perez-Ecija RA, Estepa JC.** Thoracic emphysematous lymphadenitis in a foal, *Journal of Clinical Pathology* 2011, 145, 77.
- Mir IA, Kumar B, Taku A, Bhardwaj RK, Bhat MA, Badroo GA.** Prevalence and Antibigram study of *Rhodococcus equi* in equines of Jammu and Kashmir, India. *Journal Equine Science* 2015, 26, 1, 21–24.
- Miranda-Casoluengo R, Duffy PS, O’Connell EP, Graham BJ, Mangan MW, Prescott JF, Meijer WG.** The iron regulated iupABC operon is required for saprophytic growth of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* at low iron concentrations. *Journal of Bacteriology* 2005, 187, 3438-3444.
- Miranda-Casoluengo R, Miranda Casoluengo AA, O’Connell EP, Fakey RJ, Boland CA, Vazquez-Boland JA, Meijer WG.** The *vapA* co-expressed virulence plasmid gene *vcbB* (orf10) of the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Microbiology* 2011, 157, 2357-2368.
- Monego F, Maboni F, Krewer C.** Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farms by means of multiplex PCR for the *vap* gene family, *Current Microbiology* 2009, 58, 399.

Morse ME. A study of the diphtheria group of organisms by the biometrical method. *Journal of Infectious Diseases*, 1912, 11, 253-285.

Morton AC, Begg AP, Anderson GA. Epidemiology of *Rhodococcus equi* strains on Thoroughbred horse farms. *Applied Environmental Microbiology* 2001, 67, 2167–2175.

Muller F, Schaal KP, von Graevenitz A, von Moos L, Woolcock JB, Wust J, Yassin AF. Characterization of *Rhodococcus equi*-like bacterium isolated from a wound infection in a noncompromised host. *Journal Clinical Microbiology* 1988, 26, 618-620.

Muller NS, Madigan JE. Methods of implementation of an immunoprophylaxis program for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia: results of a 5-year field study, *Proceedings American Association Equine Practitioners* 1992, 38, 193.

Muller NS, Madigan JE. Methods of implementation of an immunoprophylaxis program for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia: Results of a 5-year field study. *Proceedings American Association Equine Practitioners* 1992, 38, 193-201.

Multimer MD, Woolcock JB. Some problems associated with the identification of *Corynebacterium equi*. *Veterinary Microbiology* 1981, 6, 331 – 338.

Muscatello G, Anderson GA, Gilkerson JR. Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian Thoroughbred farms. *Applied Environmental Microbiology* 2006, 72, 6152– 6160.

Muscatello G, Gilkerson JR, Browning GF. Comparison of two selective media for the recovery, isolation, enumeration and differentiation of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* 2007, 119, 324.

Mutimer MD, Woolcock JB. Some problems associated with the identification of *Corynebacterium equi*. *Veterinary Microbiology* 1981, 6, 331-338.

Nakazawa M, Sugimoto C, Isayama Y. Quantitative culture of *Rhodococcus equi* from feces of horses, *Natl Inst Anim Health Q (Jpn)* 1983, 23, 67.

ND, Carter CN, Scott HM. Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. *American Journal of Veterinary Research* 2008, 69, 385–395.

Nerren JR, Martens RJ, Payne S, Murrell J, Butler JL, Cohen ND. Age-related changes in cytokine expression by neutrophils of foals stimulated with virulent *Rhodococcus equi* in vitro. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 2009, 127, 212-219.

Nordmann P, Keller M, Espinasse F, Ronco E. Correlation between antibiotic resistance, phage-like particle presence and virulence in *Rhodococcus equi* human isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1994, 32, 377-383.

Nordmann P, Ronco E, Nauciel C. Role of T-lymphocyte subsets in *Rhodococcus equi* infection. *Infection Immunology* 1992a, 60, 2748-2752.

Nordmann P, Ronco E. In-vitro antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 1992b, 29, 383-393.

Ocampo-Sosa AA, Lewis DA, Navas J, Quigley F, Callejo R, Scotti M, Leadon DP, Fogarty U, Vazquez-Boland JA. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on *traA*, *vapA*, and *vapB* virulence plasmid markers. *Journal Infectious Diseases* 2007, 196, 5, 763-769.

Oliveira AF, Ruas LP, Cardoso SA, Soares SG, Roque-Barreira MC. Vaccination of mice with salmonella expressing VapA: mucosal and systemic Th1 responses provide protection against *Rhodococcus equi* infection. *PLoS. One.* 2010, 5, e8644.

O'Loughlin EJ, Kehrmeyer SR, Sims GK. Isolation, characterization, and substrate utilization of a quinoline degrading bacterium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 1996, 38 (2), 107-118.

Oren A, Garrity G. Notification that new names of prokaryotes, new combinations and new taxonomic opinions have appeared in volume 64, part3, of the IJSEM. *International Systematic Evolution Microbiology* 2014, 64, 1827-1829.

Oyston PCF, Dorrell N, Williams K, Li SR, Green M, Titball RW, Wren BW. The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infection Immunology* 2000, 68, 3419–3425.

Ozgun NY, Ikiz S, Bagcigil F. : *Rhodococcus equi* pneumonia in a mare in Turkey, *Veterinary Record* 2002, 151, 613.

Pargass LS, Wills TB, Davis WC, Wardrop KJ, Alperin DC, Hines SA. The influence of age and *Rhodococcus equi* infection on CD1 expression y equine antigen presenting cells. *Veterinary Immunology Immunopathol.* 2009, 130, 197-209.

Passamonti F, Vardi DM, Stefanetti V, Marenzoni ML, Prato S, Cevese P, Coletti M, Pepe M, Casagrande Proietti P, Olea-Popelka F. *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: An assessment of the early diagnostic value of serum amyloid A and plasma fibrinogen concentrations in equine clinical practice. *The Veterinary Journal* 2015, 203, 211-218.

Patrauchan MA, Florizone C, Dosanjh M, Mohn WW, Davies J, Eltis LD. Catabolism of Benzoate and Phthalate in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1: Redundancies and Convergence. *Journal of Bacteriology* 2005. 187(12),4050-4063.

Patton KM, McGuire TC, Hines MT, Mealey RH, Hines SA. *Rhodococcus equi*-specific cytotoxic T lymphocytes in immune horses and development in asymptomatic foals. *Infection Immunology* 2005, 73, 2083-2093.

- Pei Y, Nicholson V, Woods K, Prescott JF.** Immunization by intrabronchial administration to 1-week-old foals of an unmarked double gene disruption strain of *Rhodococcus equi* strain 103+. *Veterinary Microbiology* 2007, 125, 100-110.
- Pei Y, Parreira V, Nicholson VM, Prescott JF.** Mutation and virulence assessment of chromosomal genes of *Rhodococcus equi* 103. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2007, 71, 1-7.
- Pei Y, Parreira V, Nicholson VM, Prescott JF.** Mutation and virulence assessment of chromosomal genes of *Rhodococcus equi* 103. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2007, 71, 1-7.
- Pei Y, Dupont C, Sydor T, Haas A, Prescott JF.** Cholesterol oxidase (ChoE) is not important in the virulence of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* 2006, 118, 240-246.
- Perkins GA, Yeagar A, Erb HN, Nydam DV, Divers TJ, Bowman JL.** Survival of foals with experimentally induced *Rhodococcus equi* infection given either hyperimmune plasma containing *R. equi* antibody or normal equine plasma. *Veterinary Therapy*. 2001, 3, 334-346.
- Peters J, Block W, Oswald S, Freyer J, Grube M, Kroemer HK, Lammer M, Lutjohann D, Venner M, Siegmund W.** Oral absorption of clarithromycin is nearly abolished by chronic comedication of rifampicin in foals. *Drug Metabolism Disposals* 2011, 39, 1643-1649.
- Phumoonna T, Barton MD, Heuzenroeder MW.** Recognition of a B-cell epitope of the VapA protein of *Rhodococcus equi* in newborn and experimentally infected foals, *Journal of Veterinary Medicine* 2005, 52, 291.
- Pierre JL, Fontecave M.** Iron and activated oxygen species in biology: the basis chemistry. *Biometals* 1999, 12, 195-199.
- Porto ACRC, Oliveira AF, Fernandes WR, Roque-Barreira MC, Soares SG.** Oral administration in foals of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing vapA antigen. *Proceedings of the 5th Havemeyer Workshop on Rhodococcus equi* 2012, 5, 81.
- Prescott JF, Coshan-Gauthier R, Barksdale L.** Antibody to equi factor(s) in the diagnosis of *Corynebacterium equi* pneumonia of foals, *Canadian Journal Comperative Medicine* 1984, 48, 370.
- Prescott JF, Hoffman AM.** *Rhodococcus equi*, *Veterinary Clinics North American Equine Practitioners* 1993, 9, 375.
- Prescott JF, Lastra M, Barksdale L.** *Equi* factors in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. *Journal of Clinical Microbiology* 1982, 16, 988-990.
- Prescott JF, Machang'u R, Kwiecien J, Delaney K.** Prevention of foal mortality due to *Rhodococcus equi* pneumonia on an endemically affected farm. *Canadian Veterinary Journal*

1989, 30, 871-875.

Prescott JF, Nicholson VM, Patterson MC, Zandona Meleiro MC, Caterino dA, Yager JA, Holmes MA. Use of *Rhodococcus equi* virulence-associated protein for immunization of foals against *R equi* pneumonia. *American Journal of Veterinary Research*. 1997, 58, 356-359.

Prescott JF, Nicholson VM. The effects of combinations of selected antibiotics on the 2 growth of *Corynebacterium equi*. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapy* 1984, 7, 61-64.

Prescott JF. *Rhodococcus equi*: an Animal and Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 1991, 4, 20-34.

Pusterla N, Wilson WD, Mapes S, Leutenegger M. Diagnostic evaluation of real time PCR in the detection of *Rhodococcus equi* in feces and nasopharyngeal swabs from foals with pneumonia. *Veterinary Record* 2007, 161, 272-275.

Pusterla N, Wilson WD, Spensley MS, : Diagnostic evaluation of real-time PCR in the detection of *Rhodococcus equi* in feces and nasopharyngeal swabs from foals with pneumonia, *Veterinary Record* 2007, 161, 272.

Ramirez S, Lester GD, Roberts GR. Diagnostic contribution of thoracic ultrasonography in 17 foals with *Rhodococcus equi* pneumonia, *Veterinary Radiology Ultrasound* 2004, 45, 172.

Ramos-Vivas J, Pilares-Ortega L, Remuzgo-Martinez S, Padilla D, Gutierrez-Diaz JL, Navas-Mendez J. *Rhodococcus equi* human clinical isolates enter and survive within human alveolar epithelial cells. *Microbes Infection* 2011, 12, 438-446.

Ren J, Prescott JF. Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC33701. *Veterinary Microbiology* 2003, 94, 167–182.

Reuss SM, Chaffin MK, Cohen ND. Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infection in foals: 150 cases (1987-2007). *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2009, 235, 855.

Reuss SM, Chaffin MK, Schmitz DG. Sonographic characteristics of intraabdominal abscessation and lymphadenopathy attributable to *Rhodococcus equi* infections in foals, *Vet Radiology Ultrasound* 2011, 52, 462.

Riesenberg A, Feßler AT, Erol E, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Böse R, Heusinger A, Klarmann D, Werckenthin C, Schwarz S. MICs of 32 antimicrobial agents for *Rhodococcus equi* isolates of animal origin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2014, 69, 4, 1045-1049.

Riesenberg A, Feßler A, Frömke C, Kadlec K, Klarmann D, Kreienbrock L, Werckenthin C, Schwarz S. Harmonization of antimicrobial susceptibility testing by broth microdilution for

Rhodococcus equi of animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013, 68, 9, 1, 2173–2175.

Riess FG, Lichtinger T, Yassin AF, Schaal KP. The cell wall porin of the Gram positive bacterium *Nocardia asteroides* forms cation-selective channels that exhibit asymmetric voltage dependence. *Arch Microbiology* 1999, 171, 173-182.

Rodriguez GM, Marras SA, Pentecost M, Smith I. The *mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Molecular Microbiology* 2001, 42, 851-865.

Ross TL, Balson GA, Miners JS, Smith GD, Shewen PE, Prescott JF, Yager JA. Role of CD4+, CD8+ and double negative T-cells in the protection of SCID/beige mice against respiratory challenge with *Rhodococcus equi*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1996, 60, 186-192

Russel DG. What does “inhibition of phagosome-lysosome fusion” really mean? *Trends Microbiology*. 1998, 6, 212-213.

Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: Here today, and here tomorrow, *National Review Molecular Cell Biology* 2001, 2, 569–577.

Ryan C, Giguère S, Hagen J, Hartnett C, Kalyuzhny AE. Effect of age and mitogen on the frequency of interleukin- and interferon gamma secreting cells in foals and adult horses as assessed by an equine-specific ELISPOT assay. *Vet Immunology Immunopathology*. 2010, 7 133, 66-71.

Ryan C, Giguère S. Equine neonates have attenuated humoral and cell-Medicieneiated immune responses to a killed adjuvanted vaccine compared to adult horses. *Clinical Vaccine Immunology* 2010, 17, 1896-1902.

S, Hines SA, Sekizaki T, Nicholson VM, Alperin DA, Osaki M, Osaki D, Nakamura M, Suzuki K, Ogino N, Kakuka T, Dan H, Prescott JF. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103, *Infection Immunology* 2000; 68: 6840–6847.

Salter S, Cox M, Turek E, Calus S, Cookson W, Moffatt M, Turner P, Parkhill J, Loman N, Walker A. Reagent contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology* 2014, 12, 87.

Schell MA. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annual Review Microbiology* 1993, 47, 597–626.

Scheuch E, Spieker J, Venner M, Siegmund W. Quantitative determination of the macrolide antibiotic tulathromycin in plasma and broncho-alveolar cells of foals using tandem mass

spectrometry. *Journal Chromatography B Analytics Technology Bio Medicine Life Sciences* 2007, 850, 464-470.

Sellon DC, Besser TE, Vivrette SL. Comparison of nucleic acid amplification, serology, and microbiologic culture for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal Clinical Microbiology* 2001, 39, 1289.

Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved list of bacterial names 1980, *International Journal of Systemic Bacteriology* 1980, 30, s 225-420.

Slovis NM, McCracken JL, Mundy G. How to use thoracic ultrasound to screen foals for *Rhodococcus equi* at affected farms. *Proceedings American Association Equine Practitioners* 2005, 51, 274-278.

Slovis NM, McCracken JL, Mundy G. How to use thoracic ultrasound to screen foals for *Rhodococcus equi* at affected farms, *Proc Am Assoc Equine Practitioners* 2005, 51, 274.

Slovis NM, McCracken JL, Mundy GD. How to use thoracic ultrasound to screen foals for *Rhodococcus equi* at affected farms. *Proceedings. 51st Annual American Association of Equine Practitioners Convention* 2005, 274 –278.

Smith BP, Robinson RC. Studies of an outbreak of *Corynebacterium equi* pneumonia in foals, *Equine Veterinary Journal* 1981, 13, 223.

Soedarmanto I, Oliveria R, Lammler Ch, Dürrling H. Identification and epidemiological relationship of *Rhodococcus equi* isolated from cases of lymphadenitis in cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1997, 286, 457-467.

Soedarmanto I, Zhicai W, Setyamahanani A, Lammler C. Pheno- and genotyping of *Rhodococcus equi* isolated from faeces of healthy horses and cattle. *Research in Veterinary Science* 1998, 64, 181-185.

Sonmez K, Gurel A, Takai S. Immunocytochemical detection of *Rhodococcus equi* in tracheal washers of foals. *Journal Competitive Pathology* 2011, 145, 6.

Stratton-Phelps M, Wilson WD, Gardner IA. Risk of adverse effects in pneumonic foals treated with erythromycin versus other antibiotics: 143 cases (1986-1996). *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2000, 217, 68-73

Sutcliffe IC. Macroamphiphilic cell envelope components of *Rhodococcus equi* and closely related bacteria. *Veterinary Microbiology* 1997, 56, 287-299.

Sweeney CR, Sweeney RW, Divers TJ. *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy. *Veterinary Microbiology* 1978, 14, 329-336.

- Sydor T, von Bargaen K, Becken U, Spuerck S, Nicholson VM, Prescott JF, Haas A.** A mycolyl transferase mutant of *Rhodococcus equi* is lacking capsule integrity is fully virulent. *Veterinary Microbiology* 2007, 128, 327-341.
- Szerdi L, Makrai L, Denes B.** Rapid immunohistochemical detection of *Rhodococcus equi* in impression smears from affected foals on postmodern examination, *Journal of Veterinary Medicine B Infect Dis Vet Public Health* 2001, 48, 751.
- Takai S, Fukunaga N, Ochiai S, Sakai T, Sasaki Y, Tsukabi S.** Isolation of virulent and interMedicineiately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. *Journal Medicine Science* 1996, 58, 669-672.
- Takai S, Henton MM, Picard JA, Guthrie AJ, Fukushi H, Sugimoto C.** Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil collected from two horse farms in South Africa and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in the isolates from infected foals, a dog and a monkey. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* 2001, 68, 2, 105-110.
- Takai S, Hidaka D, Fujii M.** Serum antibody responses of foals to virulence-associated 15 to 17 kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* 1996, 52, 63–71.
- Takai S, Hines SA, Sekizaki T, Nicholson VM, Alperin DA, Osaki M, Takamatsu D, Nakamura M, Suzuki K, Ogino N, Kakuda T, Dan H, Prescott JF.** DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infection and Immunology.* 2000, 68, 12, 6840-6847.
- Takai S, Iie M, Watanabe Y, Tsubaki S, Sekizaki T.** Virulence associated 15- to 17-kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens, *Infection Immunology* 1992, 60, 2995–2997.
- Takai S, Imori S, Tsubaki S.** Quantitative fecal culture for early diagnosis of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* enteritis in foals, *Canadian Journal of Veterinary Research* 1986, 50, 479.
- Takai S, Ikeda T, Sasaki Y, Watanabe Y, Ozawa T, Tsukabi S, Sekizaki T.** Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding 15- to 17- kilodalton antigens. *Journal Clinical Microbiology* 1995, 33, 1624-1627.
- Takai S, Imai Y, Fukunaga N, Uchida Y, Kamisawa K, Sasaki Y, Tsubaki S, Sekizaki T.** Identification of virulence associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS, *Journal of Infectious Diseases.* 1995, 172, 1306 – 1311.

- Takai S, Koike K, Ohbushi S, Izumi C, Tsubaki S.** Identification of 15- to 17- kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology* 1991a, 29, 11, 439-443.
- Takai S, Morishita T, Nishio Y.** Evaluation of a monoclonal antibody-based colony blot test for rapid identification of virulent *Rhodococcus equi*, *Journal of Veterinary Medicine Science* 1994, 56, 681.
- Takai S, Nakata I, Fukii N, Kimura Y, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Kondo T, Sugiura T.** Isotype-specific antibody responses to *Rhodococcus equi* in foals on a horse-breeding farm with a persistent incidence of *R. equi* infection. *Journal Equine Science*. 2002, 13, 63-70.
- Takai S, Ohbushi S, Koike K, Tsubaki S, Oishi H, Kamada M.** Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse breeding farms with and without endemic infections. *Journal of Clinical Microbiology* 1991, 29, 2887-2889.
- Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsukabi S.** Association between a large plasmid and 15- to 17- kilodalton antigen in virulent *Rhodococcus equi*. *Infection Immunology* 1991b, 59, 3, 4056-4060.
- Takai S, Vigo G, Ikushima H.** Detection of virulent *Rhodococcus equi* in tracheal aspirate samples by polymerase chain reaction for rapid diagnosis of *R. equi* pneumonia in foals, *Veterinary Microbiology* 1998, 61, 59.
- Takai S.** Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. *Veterinary Microbiology* 1997, 56, 167–176.
- Takai S.** Restriction fragment length polymorphism of virulence plasmids in *Rhodococcus*. *Journal of Clinical Microbiology* 1999, 37, 10, 3417-3420.
- Takai T, Yamasaki M, Yoshida M.** Cesium accumulation of *Rhodococcus erythropolis* CS98 strain immobilized in hydrogel matrices. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2014, 117 (4), 497-500.
- Tan C, Prescott JF, Patterson MC, Nicholson VM.** Molecular characterization of a lipid modified virulence associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1995, 59, 51-59.
- Tan C, Prescott JF, Patterson MC, Nicholson VM.** Molecular characterization of a lipid-modified virulence associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1995, 59, 51-59.
- Tindall BJ.** A note on the genus name *Rhodococcus* Zopf 1891 and its homonyms. *International Systematic Evolution Microbiology* 2014, 64, 1062-1064.

Tjelle TE, Lovdal T, Berg T. Phagosome dynamics and function, *Bioessays* 2000, 22, 255-263.

Tkachuk-Saad O, Lusic P, Welsh RD, Prescott JF. *Rhodococcus equi* infections in goats. *Veterinary Record* 1998, 143,311-312.

Valero-Rello A, Hapeshi A, Anastasi E, Alvarez S, Scortti M, Meijer WG, MacArthur I, Vázquez-Boland JA. An Invertron-Like Linear Plasmid *Medicinei*ates Intracellular Survival and Virulence in Bovine Isolates of *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunology*. 2015, 83, 7, 2725-2737

van der Geize R, Grommen AW, Hessels GI, Jacobs AA, Dijkhuizen L. The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* is important for pathogenesis and a target for vaccine development. *PLoS*. 2011, 7, e1002181.

Vazquez-Boland JA, Prescott JF, Meijer WG, Leadon DP, Hines SA. Havemeyer workshop report: *Rhodococcus equi* comes of age. *Equine Veterinary Journal* 2009, 41, 93-95.

Vazquez-Boland JA. Focus Article: Recent advances in *Rhodococcus equi*. *AHT/BEVA/DEFRA Equine Quarterly Disease Surveillance Report* 2010, vol6, 4, 13- 17.

Vengust M, Staemflfi H, Prescott JF. *Rhodococcus equi* pleuropneumonia in an adult horse. *Canadian Veterinary Journal* 2002, 43, 706.

Venner M, Astheimer K, Lammer M, Giguère, S. Efficacy of Mass Antimicrobial Treatment of Foals with Subclinical Pulmonary Abscesses Associated with *Rhodococcus equi*. *Journal of Veterinary Internal. Medicine* 2012a, 27, 171-176.

Venner M, Heyers P, Stutzberg-Minder K, Lorenz N. Detection of *Rhodococcus equi* by microbiological culture and by polymerase chain reaction in samples of tracheobronchial secretions of foals, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007, 120, 126.

Venner M, Kerth R, Klug E. Evaluation of tulathromycin in the treatment of pulmonary abscesses in foals. *Veterinary Journal* 2007, 174, 418-421.

Venner M, Peters J, Hohensteiger N, Schock B, Bornhorst A, Grube M, Adam U, Scheuch E, Weitschies W, Roskopf D, Kroemer HK, Siegmund W. Concentration of the macrolide antibiotic tulathromycin in broncho-alveolar cells is influenced by comedication of rifampicin in foals. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacology* 2010, 381, 161-169.

Venner M, Reinhold B, Beyerbach M, Feige K. Efficacy of azithromycin in preventing pulmonary abscesses in foals. *Veterinary Journal* 2009, 179, 301-303.

Venner M, Rodiger A, Laemmer M, Giguère S. Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing of subclinical pulmonary abscesses on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus equi*. *Veterinary Journal* 2012b, 192, 293-298.

- Verge J, Senthille F.** Caracteres differentiels de *Corynebacterium equi*, agent de l'adenites pseudotuberculeuse du porc. *C. R. Seance Soc. Biology (Paris)* 1942, 136, 295-296.
- Veronck F, Deprez P, Decostere A.** : B and T cell suppression in an Arabian horse with *Rhodococcus equi* infection, *Veterinary Record* 2004, 154, 149.
- Vivrette SL, Sellon DC, Gibson DS.** Clinical application of a polymerase chain reaction assay in the diagnosis of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in a horse. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 2000, 217, 9, 1348-50.
- Wada R, Kamada M, Anzai T, Nakanishi A, Kanemaru T, Takai S, Tsubaki S.** Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. *Veterinary Microbiology* 1997, 16, 56, 301-312.
- Wagner B, Burton A, Ainsworth D.** Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin13 10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory T(R)1 cell activation 14 and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Veterinary Research.* 2010, 41-47.
- Wall DM, Duffy PS, Dupont C, Prescott JF, Meijer WG.** Isocitrate lyase activity is required for virulence of the intravascular pathogen *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunology* 2005, 73, 6736-6741.
- Watson JL, Bosio CM, Hietala SK, Bea J, Wilson WD.** Preliminary investigations of innate immunity to *Rhodococcus equi* infection. *Dorothy Russell Havemeyer Foundation Workshop on Rhodococcus equi and equine rhodococcal pneumonia*, Temmuz 2002, Pullman, Washington.
- WEB_1.** (2019). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net/rhodococcus.html> (01.10.2018)
- Williams GD, Flanigan WJ, Campbell GS.** Surgical management of localized thoracic infections in immunosuppressed patients. *Ann. Thor. Surg.* 1971, 12, 471-482.
- Wion L, Perkins G, Ainsworth DM.** Use of computerized tomography to diagnose a *Rhodococcus equi* Mediastinal abscess causing severe respiratory distress in a foal, *Equine Veterinary Journal* 2001, 33, 523.
- Witkowski L, Kaba J, Rzewuska M, :** Developmant of ELISA test for determination of the level of antibodies against *Rhodococcus equi* in equine serum and colostrum, *Vet Immunopathology* Jul 24, 2012.
- Womble A, Giguère S, Lee EA.** Pharmacokinetics of oral doxycycline and concentrations in body fluids and bronchoalveolar cells of foals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2007, 30,3, 187-193
- Womble A, Giguère S, Murthy YV, Cox C, Obare E.** Pulmonary disposition of tilmicosin in

foals and in vitro activity against *Rhodococcus equi* and other common equine bacterial pathogens. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapy* 2006, 29, 561-568.

Woolcock JB. A.-M. T. Farmer, and M. D. Mutimer. Selective Medium for *Corynebacterium equi* isolation. *Journal Clinical Microbiology* 1979, 9, 640-642.

Yager JA, Foster SF, Zink MC, Prescott JF, Lumsden JH. In vitro bactericidal efficacy of equine polymorphonuclear leukocytes against *Corynebacterium equi*. *American Journal of Veterinary Research*. 1986, 47, 438-440.

Yager JA, Prescott CA, Kramar DP, Hannah H, Balson GA, Croy BA. The effect of experimental infection with *Rhodococcus equi* on immunodeficient mice. *Veterinary Microbiology* 1991, 28, 363-376.

Yano K, Wachi M, Tsuchida S, Kitazume T, Iwai N. Degradation of benzotrifluoride via the dioxygenase pathway in *Rhodococcus* sp. 065240. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2015, 79 (3), 496-504.

Zink MC, Yager JA, Prescott JF, Fernando MA. Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 1987, 14, 295-305.

Zink MC, Yager JA, Smart NL. *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958-1084: a review of 131 cases, *Can Veterinary Journal* 1986, 27, 213.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ORAL, Elif Oya
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Tekirdağ 04/12/1984
Telefon : 0532 2328548
E-mail : dreostephens@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji A.B.D.
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	01/02/2010

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2009-2010	Keane Stud LLC New York/ABD	Veteriner Hekim Asistanı
2011-2012	TJK Şirinyer At Hastanesi İzmir	Veteriner Hekim
2012-2014	IBB İzulaş A.S. Fayton Operasyonu İzmir	Sorumlu Veteriner Hekim
2014-2016	Keane Stud LLC New York/ABD	Veteriner Hekim Asistanı
2017- ...	KR Animals NY/ABD	İdari Sorumlu

AKADEMİK YAYINLAR