



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PNÖMONİLİ SIĞIR AKCİĞER ÖRNEKLERİNDE
***Mycoplasma bovis*'in REAL TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Şifa KARAHAN
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN

VAN-2019

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PNÖMONİLİ SIĞIR AKCİĞER ÖRNEKLERİNDE
***Mycoplasma bovis*'in REAL TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Şifa KARAHAN
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN

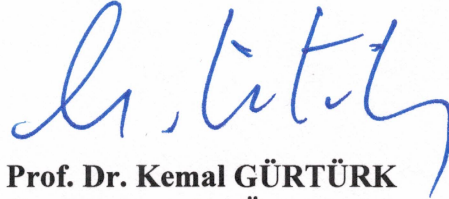
Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-7051 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2019

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji (Veteriner Programı) Anabilim Dalında Veteriner Hekim Şifa KARAHAN tarafından hazırlanan “Pnömonili Sığır Akciğer Örneklerinde *Mycoplasma bovis*’in Real Time PCR İle Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

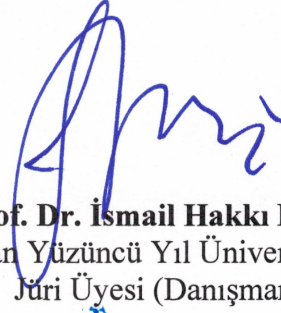
Tez Savunma Tarihi: 16 / 07 / 2019



Prof. Dr. Kemal GÜRTÜRK
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Hasan SOLMAZ
Adıyaman Üniversitesi
Jüri Üyesi



Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi (Danışman)

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.



Prof. Dr. Semiha DEDE
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

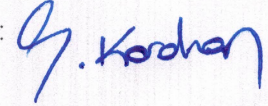
Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "**Pnömonili Sığır Akciğer Örneklerinde *Mycoplasma bovis*'in Real Time PCR İle Araştırılması**" başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Veteriner Hekim Şifa KARAHAN

16 / 07 / 2019

İmza:



TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının yürütülmesinde hoşgörü ve sabırlarını esirgemeyen, çalışmanın planlanması ve yürütülmesinin her aşamasında yardım ve önerileriyle büyük desteğini gördüğüm bilgi ve tecrübesinden her daim yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN başta olmak üzere, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Kemal GÜRTÜRK, Dr. Öğretim Üyesi Özgül GÜLAYDIN ve Arş. Gör. Cihat ÖZTÜRK'e, materyallerin toplanmasında destek sağlayan Tarım ve Orman Bakanlığı Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Sayın Ömer AKMAZ, Vet. Hekim Nevin TURUT, ve diğer personele, çalışmalarım esnasında büyük fedakarlıklarda bulunan ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Emin KARAHAN ve kardeşim Dr. Funda EŞKİ'ye beni bu süreçte hiç üzmeyen kıymetli çocuklarıma sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca, çalışmaya maddi destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Karahan Ş, Pnömonili Sığır Akciğer Örneklerinde *Mycoplasma bovis*'in Real Time PCR İle Araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Veteriner Programı), Yüksek Lisans Tezi, Van, Türkiye, 2019. Bu çalışmada, pnömonili sığır akciğerlerinde *Mycoplasma (M.) bovis*'in gen spesifik primerlerin kullanıldığı Real-Time PCR yöntemi ile araştırılması amaçlandı. Makroskopik olarak pnömoni tanısı koyulan 100 adet sığır akciğer örneğinin 52'sinde Real-Time PCR ile *M. bovis* identifiye edilirken, 58'inde konvansiyonel bakteriyolojik yöntemler ile çeşitli bakteriyel etkenlerin varlığı tespit edildi. Çalışmada *M. bovis*'den sonra en yüksek oranda (%25) *Escherichia coli* tespit edilirken, *Pasteurella multocida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Mannheimia haemolytica*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus* spp. örneklerin sırasıyla %13, %7, %7, %4, %1 ve %1'inden izole edildi. Akciğer örneklerinin 42'sinden ise konvansiyonel bakteriyolojik yöntemler ile bakteriyel etken izole edilmedi. Çalışmadan elde edilen bulgular ile *M. bovis*'in sığırlarda solunum sistemi hastalıklarına neden olan önemli bir etken olduğu belirlenmekle birlikte hastalığın teşhis ve tedavisinde diğer bakteriyel etkenlerin varlığının da göz önünde bulundurulması gerektiği kanatına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Sığır, Akciğer, *Mycoplasma bovis*, Real Time-PCR

ABSTRACT

Karahan Ş, Investigation of *Mycoplasma bovis* in Bovine Lung Samples with Pneumonia by Real Time PCR, Van Yüzüncü Yil University, Health Sciences Institute, Department of Microbiology (Veterinary Programme), Master Thesis, Van, Turkey, 2019. The aim of this study was to investigate *Mycoplasma (M.) bovis* from bovine lungs with pneumonia by Real-Time PCR. *M. bovis* was identified in 52 out of 100 bovine lung samples diagnosed with pneumonia macroscopically by Real-Time PCR whereas the presence of various bacterial agents was determined in 58 of the samples by conventional bacteriological methods. In the study, *Escherichia coli* was detected in the highest rate (25%) after *M. bovis* while *Pasteurella multocida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Mannheimia haemolytica*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus* spp. were isolated from 13%, 7%, 7%, 4%, 1% and 1% of the samples, respectively. Also, bacterial agent was not isolated from 42 of lung samples by conventional bacteriological methods. The findings of the study indicated that *M. bovis* was an important causative agent of respiratory diseases in cattle, and that the presence of other bacterial agents should be considered in the diagnosis and treatment of the disease.

Keywords: Bovine, Lung, *Mycoplasma bovis*, Real Time-PCR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
TABLolar LİSTESİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pnömoniler.....	4
2.1.1. Bronkopnömoni.....	5
2.1.2. İntersitisyel pnömoni.....	8
2.1.3. Granüloamatöz pnömoni.....	9
2.2. <i>Mycoplasma bovis</i>	10
2.2.1. Tarihçe.....	10
2.2.2. Etiyoloji.....	10
2.2.3. Epidemiyoloji.....	11
2.2.4. Patogenez.....	13
2.2.5. Tanı.....	14
2.2.5.1. Klinik teşhis.....	15
2.2.5.2. Nekropsi bulguları.....	15
2.2.5.3. Bakteriyoskopi.....	16
2.2.5.4. Kültür.....	16
2.2.5.5. Serolojik yöntemler.....	17

2.2.5.6. İmmunohistokimyasal yöntemler.....	17
2.2.5.7. Moleküler yöntemler.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Gereç.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Makroskobik incelemeler.....	20
3.2.2. Kültürel incelemeler.....	20
3.2.3. Moleküler incelemeler.....	20
3.2.3.1. DNA izolasyonu.....	20
3.2.3.2. Primerler.....	21
3.2.3.3. Real Time PCR yöntemi.....	21
4. BULGULAR.....	24
4.1. Makroskobik Bulgular.....	24
4.2. Real Time PCR Test Sonuçları.....	25
4.3. Bakteriyolojik Kültür Analizi Sonuçları.....	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	39
EKLER.....	40
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi.....	40
Ek 2. Tez Orijinallik Raporu.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate – Poly Acrylamide Gel
bp	: Base pair
ID	: Identification
ct	: Treshold cycle



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Lezyonlu akciğer dokusu: İrinli-nekrotik bronkopnömoni..... 24
- Şekil 2.** Fibrinli nekrotik bronkopnömonili akciğer dokusu mermer görünümü. 25
- Şekil 3.** Real Time PCR test sonuçları..... 25



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Çalışmada kullanılan oligo dizisi	21
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan mastermiks.....	22
Tablo 3.	Amplifikasyon protokolü.....	23
Tablo 4.	Real Time PCR test sonuçları.....	26
Tablo 5.	Real Time PCR yöntemiyle <i>M. bovis</i> yönünden pozitif bulunan örneklerde diğer bakteri türlerinin dağılımı.....	27
Tablo 6.	Real Time PCR yöntemiyle <i>M. bovis</i> yönünden negatif bulunan örneklerde diğer bakteri türlerinin dağılımı.....	28

1. GİRİŞ

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de sığırlarda sıklıkla karşılaşılan solunum sistemi hastalıkları, hayvan sağlığı açısından üzerinde durulması gereken önemli bir sağlık sorunudur.

Solunum sistemi hastalıklarının oluşmasında enfeksiyöz etkenler, bakım, besleme gibi çeşitli predispoze faktörler etkilidir. Viral enfeksiyöz etkenler arasında Bovine Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza Virus Type 3, Infectious Bovine Rhinotracheitis, Bovine Viral Diarrhea ve Bovine Herpes Virus gibi etkenler yer alırken bakteriyel etkenler arasında da *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* ve *Mycoplasma* spp. ön plana çıkmaktadır. Bu etkenler içerisinde özellikle mikoplazmalar ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Sığırlarda mikoplazmaların neden olduğu pnömonilerde *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) en önemli etken olarak ön plana çıkmaktadır (Radostitis ve ark., 1995).

Hastalık, erken dönemde önemli klinik semptomlara yol açmadığı için tanımlanması genellikle zordur. Geç dönemde de daha çok yetiştiricilik yönünden önem taşımakta ve enfeksiyon sonrası kondisyon kaybı, büyümede gerileme, pnömoni ve sekonder enfeksiyonlar nedeniyle ağır ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Güneş, 2018).

Pnömonili sığır akciğerlerinde *M. bovis* etkeninin moleküler tespitinde PCR yönteminin kullanılması erken tanı ve tedavi açısından kritik öneme sahiptir. Etkenin moleküler teşhisinde de çeşitli PCR teknikleri kullanılmaktadır (Altun, 2015; İssi ve ark., 2015).

Sığırlarda solunum sistemi hastalıklarının görüldüğü İngiltere, İspanya, Danimarka, Fransa, İsviçre, Almanya ve İsrail gibi ülkelerde solunum sistemi problemleri hayvanlarda *M. bovis*’in PCR yöntemi ile teşhisine yönelik yapılan araştırmalarda etkenin %25-33 oranında tespit edildiği bildirilmektedir (Kleinschmidt ve ark., 2013).

Türkiye’de ise 7 coğrafik bölgede 21 farklı süt sığırı işletmesinin 17’sinde (%80.9) mikoplazma kökenli solunum sistemi enfeksiyonlarının varlığı tespit edilmiş, PCR yöntemi ile *Mycoplasma* spp. yönünden pozitif bulunan 172 örneğin 149

(%87.6)'unda kültürel yöntemlerle *M. bovis* izole ve identifiye edilmiştir (Sayın ve ark., 2016). Doğu Anadolu Bölgesinde üç farklı işletmedeki 148 hayvandan alınan akciğer, burun sıvabı ve süt örneklerinin kültürel ve moleküler analizlerinde 3 akciğer örneğinin tamamında, 51 adet burun sıvabının %23.5'inde ve 90 süt örneğinin de %21.1'inde *M. bovis* tespit edildiği bildirilmiştir (Karahana ve ark., 2010). Özen ve ark., (2009), yaptıkları bir çalışmada 2565 adet akciğer örneğinin 100'ünde (%3.89) makroskopik olarak pneumoni lezyonları gözlediklerini ve PCR yöntemi ile yaptıkları analiz sonucunda örneklerin 19'unda *M. bovis*, *M. dispar* ve *M. bovinrhinis* belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Marmara Bölgesi'nde buzağı pnömonilerinde, *M. bovis*'in prevalansı %7.5 olarak belirlenmiştir (Erdağ ve ark., 1995). Erzurum ilinde lezyonlu sığır akciğerlerinde *M. bovis*'in PCR yöntemi ile teşhisine yönelik yapılan bir başka araştırmada %36 oranında pozitiflik tespit edilirken Kars ilinde bu oranın %4 olarak belirlendiği rapor edilmiştir (Özen ve ark., 2009).

Yapılan araştırmalarda, toplanan numunelerin özellikle klinik olarak solunum sistemi hastalıkları belirtileri gösteren ve sürü problemleri gruplardan temin edilmesi; *M. bovis* yönünden pozitiflik oranının çok yüksek olmasında etkili olduğu ifade edilmiştir (Soehnel ve ark., 2011; Akan ve ark., 2014)

Akciğerin lezyonlu dokularından, lenf yumrularından ve pleura sıvısından etkenin kültürel yöntemlerle izolasyonu mümkün olabilmektedir (Thomas ve ark., 2002). *M. bovis*'in PCR ile teşhisine yönelik çalışmalarda, özellikle irinli-nekrotik bronkopnömoni olgularında pozitifliğin yüksek olduğu bildirilmiştir (Maeda ve ark., 2003; Özen ve ark., 2009; Yılmaz, 2009; Gabinaitiene ve ark., 2011)

Mikoplazma türlerinin izolasyonu ve identifikasyonundaki zorluklar sebebiyle hastalığın erken ve hızlı tanısının zor olduğu bilinmesine rağmen ülkemizde bu konuda yapılan moleküler epidemiyolojik çalışmaların az sayıda olduğu görülmüştür (Nicholas ve ark., 2002; Özen ve ark., 2009, Yılmaz ve ark., 2009; Rosetti ve ark., 2010; Arcangioli ve ark., 2012; Adamu ve ark., 2013; Altun, 2015).

Bu çalışmada, sığır solunum sistemi hastalıklarının etiolojinde önemli bir yere sahip olduğu bilinen *M. bovis*'in Adana bölgesindeki sığırlardan alınan pnömonili akciğer nekropsi örneklerinde varlığı ve yaygınlığının Real-Time PCR yöntemi ile araştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

Solunum sistemi, canlının yaşadığı ortamdaki havayı kapillar damarlarda ki kan ile temasa getirerek oksijen ve karbondioksit alışverişini sağlayan kanallar sistemi olarak tanımlanmaktadır. Akciğerler Göğüs boşluğunda yer alır üst ve alt solunum yolları olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Üst solunum yolları burundan başlayıp akciğerlerde bronşiyollere kadar uzanırken alt solunum yolları da bronşiyollerden başlayıp alveoler kanallara ve keselere açılarak alveollerde sonlanır (Caswell ve Willams, 2007).

Trachea ve bronşların mukozası yalancı ve çok katlı silyumlu silindirik epitel ile kaplanmıştır (Caswell ve Willams, 2007; Eurell ve Frappier, 2006). Alveol parankimindeki tip I (solunan hava ve kan yoluyla gelen zararlı etkenlere karşı oldukça duyarlıdır) ve tip II (Tip I pnömositler için kök hücre görevi görürler) pnömositler önemli hücrelerdir (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Çakar ve ark., 2013).

Akciğerin makrofajlarını; alveoler, intersitisyel, pulmoner intravasküler makrofajlar ile dentritik hücreler oluşturmaktadır. Yangısal olaylarda kan monositleri alveollere geçerek alveoler makrofajları oluştururlar (McGavin ve Zachery, 2007). Solunan havanın ısı ve neminin ayarlanması, koku alma, ses çıkarma, asit-baz dengesinin düzenlenmesi ve kan depolama solunum sisteminin görevlerindedir (Caswell ve Willams, 2007; Çakar ve ark., 2013).

2.1. Pnömoniler

Pnömoni, basit ifade ile akciğer yangısı olarak tanımlanabilir. Enfeksiyöz (bakteriler, virüsler, mantarlar, parazitler), enfeksiyöz olmayan (ahır gazları, irrite edici gazlar vb.) etkenler veya kongenital ve edinsel yetersizlik solunum sistemi hastalıklarına sebep olmaktadır (Radostitis ve ark., 1995; Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Giovanni ve ark., 2013). Akciğerlere gelen etkenler akciğer intersitisyumu ve interalveoler bölümleri etkilerken aerojen yoluyla enfeksiyonlar ise solunum yollarının tahrip olmasında kaynaklanır. Solunum sisteminin alt bölümleri çok küçük partiküllerden, tahriş edici gazlardan ve alveol ile bronş epitellerine affinite

gösteren enfeksiyöz ajanlardan etkilenir (McGavin ve Zachery, 2007). Solunum sistemi lezyonlarının az rastlanan diğer tipleri travmatik ve komşu organ ya da dokulardaki lezyonların akciğerlere yayılması şeklinde olur.

Enfeksiyöz kökenli pnömonilerde stres faktörleri, özellikle viral ve bakteriyel etkenlerin aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden rastgele tedavi akılcı bir seçenek değildir. Sığırlarda bakteriyel etkenlerden pastörella ve mikoplazma türlerine karşı pnömonilerinin tedavisinde asıl etkin uygulama korumadır. Koruma, öncelikle stres yapıcı faktörleri önlenmesi ve ardından etkene karşı aşılama yöntemleriyle mümkün olur. Ancak ülkemizde çoğunlukla tedaviye yönelik kemoterapötük uygulamalar yapılmaktadır. Sığırların solunum yolu enfeksiyonlarında tedavi her zaman başarılı olmayacağı gibi, hastalık çoğunlukla nüksetmektedir. Tedavi giderleri ve nükslerin tekrar tedavi edilmesi önemli ölçüde ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Radostitis ve ark., 1995; Güneş, 2018).

Pnömoniler akut, subakut ya da kronik olarak sınıflandırılır ve ayrıca etiyolojilerine göre de sınıflandırılırlar (McGavin ve Zachery, 2007). Akciğerdeki yangıları eksudatın özelliğine göre ve doku reaksiyonlarına göre iki başlık altında incelenir. Eksudatif karakterdeki pnömoniler alveolleri kaplayan eksudatın özelliklerine göre; kataral, irnli, , fibrinli ve hemorajik olarak tanımlanır.

Bir başka yaklaşım ise pnömonileri akciğerdeki yayılımına ve lokalizasyonuna göre sınıflandırılmasıdır. Bu sınıflandırmada ise bronkopnömoni, lobar pnömoni ve intersitisyel pnömoni olmak üzere üç ana grup vardır (Maeda ve ark., 2003; Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Radelli ve ark., 2008).

2.1.1. Bronkopnömoni

Bronkopnömoni, akciğer alveollerinin ve bronşlarının birlikte yangısıdır. Ayrıca hayvanlarda en fazla görülen pnömoni tipi olup bakteriler hastalığın etiyolojisinde önemlidir (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007). Vücudun direncinin azalması, yorgunluk, sağlıksız barınaklarda uzun süreli yetiştirme ve üşütme gibi stres faktörleri predispoze faktörlerdir. Bu predispoze faktörler, vücutta bulunan saprofit mikroorganizmalar tarafından hastalığın ortaya çıkışında etkili olmaktadır. Bu

pnömonilerde lezyonlar genellikle kranial loplarda görülmektedir. Yangı bronşiyoller ve alveollerin sınırında başlayarak yukarı doğru bronşlara ve alveoler parankimine yayılır. Bu pnömonide biriken sıvı, genellikle bronş, bronşiyol ve alveol boşluklarında birikir (Radostitis ve ark., 1995; McGavin ve Zachery, 2007; Radelli ve ark., 2008; Özen ve ark., 2009). Akciğer yangılarında biriken eksudat, dokuların hava tutma kapasitesini azaltır. Yangısal olaylar odaklar halinde yayılmışsa lobuler pnömoni oluşumu görülür. Lobuler odaklar birleşerek büyür ve lobun tamamını veya akciğerlerin büyük kısmını kapsayan, bronş ve bronşiyollerin yangılarından kaynaklı geniş pnömoni alanları oluştururlar. Böylelikle endobronşiyal yayılma sonucu bronkopnömoni tablosu gelişir. Bronkopnömoniler biriken eksudatın karakterine göre patolojik olarak kataral, irinli ve fibrinli olarak sınıflandırılır. Nitekim histopatolojik incelemelerde pnömoni tabloları kataral-irinli, irinli-nekrotik ya da fibrinli-nekrotik tarzda teşhis edilebilmektedir (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Radelli ve ark., 2008).

İrinli - nekrotik bronkopnömoni, bronş, bronşiyol ve alveollerde purulent ya da mukopurulent bir eksudatın varlığı ile karakterizedir. Bu tip pnömonilerde bakteriyel enfeksiyonlardan; *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli* ve *Bordetella bronchiseptica* en çok izole edilen bakteri türleridir (Radostitis ve ark., 1995; Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007). Etkenler akciğere kan yoluyla gelir. Primer yangı odaklarından (endoarteritis, metritis ve omphaloflebitis gibi) kalp yoluyla akciğerlere ulaşırlar. Viral enfeksiyondan sonra sekonder komplikasyon şeklinde de gelişebilir (Caswell ve Willams, 2007). Makroskobik olarak yaygın hiperemik odaklar halinde akciğerin kranioventral loblarında göze çarpan ve düzensiz lezyonlar dikkati çeker. Akciğer kesitinde özellikle bronşlarda bol miktarda eksudat görülür (Maeda ve ark., 2003; McGavin ve Zachery, 2007; Radelli ve ark., 2008). Hastalığın başlangıcında özellikle lümenlerde şiddetli nötrofil lökosit eksudasyonları ile karakterize bronşitis ve bronşiolitis göze çarpar (McGavin ve Zachery, 2007; Yılmaz, 2009). Yangı endobronşiyoler ve peribronşiyoler tarzda alveoler parankime yayılır (Caswell ve Willams, 2007; Yılmaz, 2009). Alveollerde seröz bir eksudasyon ile yayılan bu yangı sonra nekrozlaşır ve irinleşir. Akciğerde zamanla yaygın irinli odaklar halinde alanlar şekillenir. Bu odaklar arasında normal atelektatik veya amfizematöz akciğer dokusu alanları da bulunabilir (Caswell ve Willams, 2007; Özen ve ark., 2009; Yılmaz, 2009;

Kleinschmidt ve ark., 2013). Şiddetli olgularda bronş ve bronşiyollerdeki epitel hücreleri ve alveoler epitel hücreleri nekroze olarak lümene dökülür. Genellikle pleura etkilenmez ve irinli-nekrotik bronkopnömoniler zamanla tamamen iyileşebilirler. Ancak apseleşme, atalektazi, fibrözleşme ve saprofit bakterilerin bulunmasıyla gangren de gelişebilir (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Özen ve ark., 2009; Yılmaz, 2009).

Eksudatta fibrin bulunması ile karakterize olan bu tip pnömonilerin etiolojisinde *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* gibi bakteriyel etkenler bazen primer bazen de viral enfeksiyonları takiben sekonder olarak rol oynarlar. Hastalıklı akciğer loblarının üzerini örten pleura genellikle yangılandığından bir pleuropnömoni tablosu vardır. Zaman içerisinde bu tip olguların çoğunda nekroz gelişir (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Nicholas ve ark., 2008; Radelli ve ark., 2008; Yılmaz, 2009).

Fibrinli pnömonilerde; yangısal hiperemi, kırmızı hepatizasyon, gri hepatizasyon ve son olarak lizis devreleri olmak üzere dört dönem oluşur. İlk olarak yangısal hiperemi döneminde hastalıklı akciğer lobları kıvamı artmış bir halde olup koyu kırmızı renk almıştır. Çok miktarda kırmızı-gri renkte eksudat kesit yüzeyinde mevcuttur (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Yılmaz, 2009). İçerik fibrince zengin olan ve bu eksudat pıhtılaştığı için de akciğerin kesit yüzünden sızmaz. Histopatolojik olarak yapılan incelemelerde akciğer kapillar damarlarının dolu olduğu, alveollerde açık kırmızı renkte homojen, ince granüllü seröz bir sıvı toplandığı görülmektedir. Sıvı içerisinde nötrofil, eritrosit, lökosit ve dökülmüş epitel hücreleri bulunabilir. Kırmızı hepatizasyon döneminde ise akciğer loplarındaki kapiller damarlar eritrositler ile dolu olduğundan kırmızı renkte olduğu görünür. Akciğer loplarının etkilenen bölümlerinde fazla fibrin birikimi ve hücrel infiltrasyonundan dolayı, lopların hacim ve kıvamının artması sonucu karaciğer kıvamını almasıyla hepatizasyon şekillenir. Histolojik olarak kapillar damarlarda hipereminin alveollerde fazla miktarda fibrin arasında az sayıda eritrosit, nötrofil, lökosit ve epitel hücreleri bulunur (McGavin ve Zachery, 2007; ; Yılmaz, 2009, Radelli ve ark., 2008; Yılmaz, 2009; Özen ve ark., 2009).

Evcil hayvanlarda nadir görülen lizis evresinde, lökositlerden salınan proteolitik enzimler ile pnömoni lezyonu görülen alanlardaki eksudatı eritir (McGavin ve Zachery, 2007). Bu evrede etkilenen akciğerin lobu yangısal hiperemi evresine benzer şekilde koyu kırmızı bir renk alır. Lenf damarları ve kapiller damarlar ile eriyen eksudat kitleleri rezorbe edilir (Caswell ve Willams, 2007). Sığırlarda nadir de olsa sağlam kalan alveol epitelleri yenilenerek etkilenen loplarda yeniden ventilasyonu sağlar. Evcil hayvanlarda etkilenen akciğer kısımları çoğunlukla organizasyona uğrar. Rezorbsiyon amacıyla damarlardan zengin bir granülasyon dokusu üreyerek hiyalin kitleleri haline dönüşmüş olan alveollerdeki eksudat içinde bir organizasyon meydana getirir. Hastalıktan etkilenen akciğer lopları küçülerek et rengini ve kıvamını alır (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007).

Yabancı maddelerin akciğere aspirasyonu ile meydana gelir. (McGavin ve Zachery, 2007). Özellikle yutkunma güçlükleri, farinks felci ile seyreden kuduz, botilusmus gibi hastalıklarda, kafa travmaları ve özefagusun tıkanmaları durumlarında yabancı ve cisimlerin sıvıların bakterilerle birlikte aspire edilmesi en fazla rastlanılanıdır. Bilinç kaybı sırasında meydana gelen kusmalarda mide içeriği akciğerlere kaçabilir. Ayrıca üst solunum yolunun irinli veya nekrotik yangılı enfeksiyonlarında ortaya çıkan eksudatın aspire edilmesi akciğerlerin özellikle kranioventral loblarında irinlive apseli bronkopnömoniler meydana gelir. Ayrıca sondalama uygulamalarındaki hatalar ile verilen ilaçların doğrudan akciğere gönderilmesi sonucuda bu pnömoniler şekillenir. Aspire edilen yabancı maddeler önce irinli-ülseratif bronşitis, daha sonra ise irinli- gangrenöz pnömoniler oluştururlar. İçleri kirli ve fena kokulu kitlelerle dolu kavernler oluşur. Bunlar daha sonra göğüs boşluğuna açılırlar. Genellikle gazlı gangren akciğerde ölümle sonuçlanır (Radostitis ve ark., 1995; McGavin ve Zachery, 2007).

2.1.2. İntersitisyel pnömoni

İnteralveoler septumlarda görülen intersitisyel pnömoni; aerojen virüs enfeksiyonlarının meydana gelmesinde önemli rol oynadığı proliferatif olgulardır (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Nicholas ve ark., 2008). Klamidya, mikoplazma, parazitler (Caswell ve Willams, 2007), ilaç reaksiyonları, aşırı

duyarlılık reaksiyonları, endojen metabolik toksik maddeler (üremi, pankreatitis, şok, dissemine intravasküler koagülasyon) intersitisyel pnömoniler görülebilmektedir (McGavin ve Zachery, 2007).

Makroskopik olarak tanısı zor olmasına rağmen, kıvamlı ve sönmemiş akciğer bölgeleri tanıda dikkati çeker. Kronik olgularda bağ dokusu artışı ile kalınlaşmış bir intersitisyum, peribronşial düğümçükler ve yaygın amfizem görülebilir (McGavin ve Zachery, 2007; Radelli ve ark., 2008). Akciğerin tüm loblarında makroskopik lezyonlar görülebilse de özellikle kaudo-dorsal bölgelerde daha sık rastlanır. İntersitisyel pnömonilerin bronkopnömonilerden ayırt edilmesinde lezyonların bu lokalizasyonu önemlidir (Caswell ve Willams, 2007).

Histopatolojik olarak; akut dönemde alveollerin lümeni seröz-fibrinli eksudatla dolu, alveol duvarları da ödemli ve konjesyonedir. Alveoler lümende biriken fibrin ve diğer serum proteinleri ile hücreli artıklar yoğunlaşarak hiyalin membranlar oluştururlar. Yangısal infiltrasyonlar tek tük nötrofil lökositleri ile daha yoğun lenfosit, histiyosit ve plazma hücrelerinden ibarettir (Caswell ve Willams, 2007; McGavin ve Zachery, 2007; Radelli ve ark., 2008). Sekonder bakteriyel enfeksiyonlar intersitisyel pnömoni tablosunu maskeleyebilirler. Eksojen ve endojen toksik maddeler ya da enfeksiyöz etkenler özellikle alveol duvarının kapillar endotel hücrelerinde ve alveol duvarını döşeyen epitel hücrelerinde akut zedelenme-yıkım oluştururlar. Akut zedelenmede öncelikli olarak onarım özelliği zayıf, rejenerasyon kapasitesi de yetersiz olan alveol tip I hücreleri daha hassastır. Alveol duvarındaki tip II epitel hücreleri sağlam bazal membran üzerinde proliferasyon olarak dejenere olmuş tip I epitel hücrelerinin yerini alır (Çakar ve ark., 2013).

2.1.3. Granümatöz pnömoni

Granümatöz pnömonilere hayvanlarda fagositozla yok edilemeyen organizmalar sebep olmaktadır. Etkenin fagositoza dayanıklı ve dokuda uzun süre kalabilen özellikte olması gerekmektedir (Caswell ve Willams, 2007). Granümatöz pnömonilerin nedenleri arasında özellikle; *Cryptococcosis*, *Actinobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., *Histoplasmosis* ve *Mycobacterium* spp. vb. sayabilir. Solunum yoluyla aspire edilen ve çözünmeyen partiküllerde granümatöz pnömoniyeye

neden olabilmektedir. Yangının meydana gelmesi daha çok eksudatif karakterde olması hastalanan hayvan türüne, vücudun immünolojik olarak reaksiyonu durumuna ve etkenin patojenitesine bağlıdır (McGavin ve Zachery, 2007).

Granülomatöz pnömonilerde, farklı büyüklük ve yerleşim gösteren, kazeöz veya kazeöz olmayan granülomlara akciğerlerde rastlanılmaktadır. Kesitte çevreleri soluk beyaz renkte bağ doku kuşağı ile çevrili olan nekroz alanları görülür (Caswell ve Willams, 2007; Yılmaz, 2009).

2.2. *Mycoplasma bovis*

2.2.1. Tarihçe

İlk olarak Frank tarafından 1889'da mantarlara olan morfolojik benzerliklerinden dolayı (mykes-fungus: plasma formunda), Mikoplazma ismini kullanılmıştır. Bu etkenleri Novak, 1973 yılında sığırlarda bulaşıcı plöropnömoni etkeni olarak tanımlamıştır. Mikoplazmaların, Mollocutes sınıfının *Mycoplasma* genusunun önemli üyesi olan *M. bovis* pnömonilerin oluşumunda primer patojenik tür olduğu bildirilmektedir (Divers ve Peek, 2008). En küçük serbest yaşayanlar olarak bilinen organizmalardır. Mikoplazma cinsini içeren sekiz cins 120'den fazla tür vardır. Bu türlerin bazıları, insanlar ve diğerleri hayvanlar ve bitkiler için patojen olabilmektedir (Foddai ve ark., 2005).

2.2.2. Etiyoloji

Mycoplasma cinsine dâhil türler hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür. Fimbria ve pilusları yoktur. Çoğu mikoplazmalar fakültatif anaerobtur. Diğer tüm bakterilerden farklı olarak hücre duvarından yoksundurlar. Gram negatifler fakat Gram boyama yöntemiyle güç boyanırlar. Giemsa veya Castaneda yöntemleri ile boyanmaları gerekir (Walker, 1999; Quinn ve ark., 2002; Whithear ve Browning, 2004; Brown ve ark., 2007; Caswell ve Willams, 2007; Giovannini ve ark., 2013).

En iyi karanlık saha ve faz kontrast mikroskopunda incelenirler. Hücre duvarlarının olmaması nedeniyle oldukça pleomorfiktirler. En sık rastlanan temel

şekil 0.3-0.8 µm çaplı kokoid formlardır. Mikoplazmaları üretmek diğer bakterilere göre güçtür. Nazlı üreyen mikroorganizmalar oldukları için bazı spesifik üretme faktörlerine ihtiyaç vardır. Mikoplazma etkenleri ekstraselüler etkenler olup bazılarının mukoz membranlara tutunma özellikleri vardır. Eklemleri ve seröz boşlukları çevreleyen mezenşimal hücreler ile epitel hücrelerine karşı affiniteleri vardır. Solunum yollarına yerleşme eğilimi gösteren mikoplazmaların silier aktiviteyi bozmaları patogenezlerinde önemlidir. Mikoplazmalar beta laktam antibiyotikler gibi tüm hücre duvar sentez inhibitörlerine doğal dirençlidirler. Mikoplazmalar fiziksel ve kimyasal etkilere duyarlıdır. 37 °C'de 35-40 gün, -20 °C'de 6-12 ay canlı kalabilir. Ultraviyole ışınlarına dayanıklıdır. Diğer bakterilerin aksine dondurulup çözündürülmeye dirençlidirler. Fakat kuruluğa duyarlıdır. Penisilin ve sefalosporinlerin dâhil olduğu hücre duvarı sentez inhibitörü antibiyotikler ile sülfonamidlere doğal dirençlidirler. Mikoplazmal hastalıkların tedavisinde kullanılan başlıca antibiyotik grupları makrolidler, tetrasiklinler, linkozamidler ve florokinolonlardır. *M. bovis*(eski adıyla *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*) ilk olarak 1961 yılında bir mastitis vakasından tespit edilmiş ve mastitis nedeni olarak tanımlanmıştır (Hale ve ark., 1962). Daha sonra 1976'da hayvanlarda solunum yolu hastalıklarının tedavisi sırasında *M. bovis* önemli bir etken olarak tespit edilmiştir (Gourlay ve ark., 1976). Sığır ve süt buzağlarında pneumoni yanında artrit ve tenosinovit olgularından da izole edilmiştir (Caswell ve Archambault, 2008).

Hücre duvarları olmadığından lipid, karbonhidrat ve proteinlerden oluşan plasma membrana sahiptirler. Mikoplazmalar çok küçük yaşayan prokaryotlardır. Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz, aerobik ve anaerobik ortamlarda üreyen mikroorganizmalardır. (Walker ve ark. 1999; Caswell ve Williams, 2007; Yılmaz, 2009; Giovannini ve ark., 2013).

2.2.3. Epidemiyoloji

Solunum sistemi hastalıkları, tüm dünyada olduğu gibi (Nicholas ve ark., 2002; Lee ve ark., 2008; Schoot ve ark., 2013), Türkiye'de de sığırlarda sıklıkla karşılaşılan hayvan sağlığı açısından üzerinde durulması gereken önemli bir sağlık

sorunudur (Özen ve ark., 2009; Karahan ve ark., 2010; Kuiluka ve ark., 2000; İssi ve ark., 2015).

Hastalık solunum yoluyla direkt olarak bulaşmaktadır. Hastaların ve portörlerin akciğer ve burunlarından gelen eksudatta bol miktarda etken bulunmaktadır. Hastalığın çıkışı ve etkenlerin çevreye yayılışında hasta hayvanların yanısıra, bakım besleme koşullarının kötü oluşu, soğuk, açlık ve diğer stres faktörlerinin de rolü çoktur. *M. bovis* enfeksiyonları kronik ve sekonder polimikrobiyal olarak açıklanmaktadır. Solunum yolu ve burun salgıları enfeksiyonun epidemiyolojisi açısından önemlidir (Akan ve ark., 2014).

Sığırların solunum sistemi hastalıklarında ateş, nazal akıntı, solunum güçlüğü, şiddetli öksürük gibi klinik belirtiler ile birlikte verim kaybı dikkati çekmektedir (Stipkovits ve ark. 2000; İssi ve ark., 2015).

Virüslerin ve mikoplazma türlerinin birlikte enfeksiyona dahil olmalarının, immun sistemi baskılayarak akciğer enfeksiyonunu daha şiddetli hale getirdiği bildirilmiştir (Stipkovits ve ark., 2000; Nicholas ve ark., 2008; Wawegama ve ark., 2012). Sığırlardaki pnömonilerin etiyolojisinde yer alan viral ve bakteriyel etkenlerin miks olması durumlarında antibiyotik tedavisine yeterli yanıt alınamayabilir (Güneş, 2018). Mikoplazmozis özellikle gençlerde (6-12 aylık buzağlarda) ve sığırlarda sıklıkla görülebilmektedir. (McGavin ve ark., 2007; Maunsell ve ark., 2009; Aebi ve ark., 2012; Giovannini ve ark., 2013)

Sığır pnömonilerinin yaygınlığının tespitinde, pnömoni oranının %3.6 ile %65.83 arasında değiştiği bildirilmiştir (Walker 1999; Whithear ve Browning 2004; Nicholas ve ark., 2008; Özen ve ark., 2009; Yılmaz ve ark., 2009). Pnömonilere neden olan etiyolojik faktörleri içerisinde mikoplazmaların neden olduğu akciğer enfeksiyonları, sığırların en fazla ekonomik kayıba sebep olan ve en önemli hastalıkları arasında olduğu bildirilmiştir (Nicholas ve ark., 2008; Adamu ve ark., 2013; Giovannini ve ark., 2013). Özellikle de *M. bovis* solunum sistemi hastalıklarında en önemli etken olarak gösterilmektedir (Kuiluka ve ark., 2000; Nicholas ve ark., 2002; Aebi ve ark., 2012; Arcangioli ve ark., 2012).

Hastalık belirtisi göstermeyen hayvanların etkeni ağız, burun, konjuktiva, ve genital kanal mukozasında taşıyabildikleri bildirilmiştir (Whithear ve Browning, 2004; Brown ve ark., 2007; Yılmaz, 2009; Hermeyer ve ark., 2012). *M. bovis* enfeksiyonuna hayvanlar kontamine olmuş ortamda bulunmakla veya enfekte hayvanlarla doğrudan temas sonrası yakalanırlar (Walker, 1999; Whithear ve Browning, 2004; Brown ve ark., 2007).

Solunum sisteminde *M. bovis* bronkoalveolar bölgeye yerleşir ve damlacık enfeksiyonuyla çevreye yayılır (Walker, 1999, Caswell ve Willams, 2007; Yılmaz, 2009). Hasta hayvanlar solunum sisteminde enfeksiyonu takiban 24 saat içerisinde burun akıntılarıyla etkeni hızla çevreye yaymaya başlarlar (Pfützer, 1990; Gyles ve ark., 2001; Nicholas ve ark., 2008). Klinik bir belirti göstermeyen inekler etkeni sütleriyle yayarken süt emen buzağılar enfeksiyona yakalanabilirler (Lee ve ark. 2008). Akut döneminde hastalıktan ölen hayvanların akciğerleri ile birlikte kırmızı ve gri sahaları, nekroz alanlarının birlikte olduğu ve tipik alacalı mermer görünümündedir. Mermer görünümü, interlobüler septum ve damarlar ile hava yollarının çevresindeki interstisyumun genişlemesi ve fibrinli eksudatın çevresindeki kalın fibröz bandın belirgin hale gelir. *M. bovis*, akciğerlerde fibrinli-purulent bronkopnömoniye, seröz-fibrinli, veya intersitisyel pnömoniye neden olmaktadır (Walker, 1999; Maeda ve ark, 2003; McGavin ve ark, 2007; Nicholas ve ark., 2008). *M. bovis*'e bağlı irinli-nekrotik pnömoni olguları yapılan araştırmalarda bildirilmiştir. Lezyonlu akciğer dokusundan, plöra sıvısından, lenf yumrularından etken izole edilir (Thomas ve ark., 2002). İrinli-nekrotik bronkopnömoni olarak değerlendirilen akciğerler, normalden daha sert kıvamda ve lezyonlu bölgelerin kesit yüzeylerinde de irinli bir eksudat görülür (Altun, 2015).

2.2.4. Patogenez

Etkenin enfekte hayvanların süt, kolostrum, burun akıntısıyla yayıldığı bildirilmiş olmasına rağmen patogenezisi tam açıklanamamıştır (Walker ve ark,1999; Caswell ve Willams, 2007; Nicholas ve ark., 2008). *M. bovis* enfeksiyonlarında görülen kronik pnömoni ve poliartritis sendromunun hayvanların besiyeye alınmasından sonra görülmesi, etkilenen hayvanların antibiyotik tedavilerine cevap vermemesi, hayvanların

durgun, iştahsız olmasının yanında yüksek ateş, öksürük, burun akıntısı ve kilo kaybı gibi semptomlar gözlenmiştir (İssi ve ark. 2015).

Hastalığın akut öneminde ölen hayvanların akciğerleri normal lobuluslar ile birlikte kırmızı ve gri sahaları ile nekroz alanlarının birbirine karıştığı tipik mermer görünümündedir Akciğerlerde *M. bovis*, fibrinli-purulent, seröz-fibrinli bronkopnömoniye veya intersitisyel pnömoniye sebep olmaktadır. (Maedave ark., 2003; McGavin ve Zachery, 2007; Nicholas ve ark., 2008). *M. bovis*'e bağlı irinli-nekrotik pnömoni olguları da yapılan araştırmalarda bildirilmiştir (Caswell ve Willams, 2007; Yılmaz, 2009; Kleinschmidt ve ark, 2013). Schott ve ark.'nın (2013) immunohistokimyasal yöntemlerle oksidatif stres ve nitrativ stres markerleri kullanarak *M. bovis*'in dokularda H₂O₂ (Hidrojen peroksit) üretimini arttırarak bu stres faktörlerinin hücrelerde nekroza yol açtığını, irinli - nekrotik bronkopnömoniye sebep olduğu bildirilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda *M. bovis* etkenlerinin fagositik hücrelerin sitoplazmalarına yerleştiği burada uzun süre kalıp, makrofajların yüzeyine tutunabildiği ve çoğalabildiği ortaya konulmuştur (Caswell ve Willams, 2007). Böylece etkenlerin immun sistemden kaçmayı başardığının tespit edildiği çalışmada fagositik hücrelerin *M. bovis* ile enfekte olan akciğer dokusunda bu etkenleri elemine edecek kapasiteye sahip olmadığı da bildirilmiştir. Membran proteinlerindeki genomik uyumluluğun bu etkenlerin kronik enfeksiyonlara sebep olabilmesinin altında yatan en önemli nedenler arasında olduğu bildirilmiştir. *M. bovis*'in normal genital kanal florasında da bulunduğu, ayrıca bu etkenlerin deneysel ya da doğal enfeksiyon yoluyla oluşan ve abortlara endometritis, infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (Maeda ve ark., 2003; Caswell ve Willams, 2007).

Genel olarak kötü bakım besleme ve hijyenik olmayan ahır şartlarında bulunan büyük sürülerde ve etkenin meme başından girmesi sonrasında *M. bovis*'e bağlı mastitislerin meydana geldiği ifade edilmiştir (Gyles ve ark., 2001; Nicholas ve ark., 2008; Yılmaz, 2009).

2.2.5. Tanı

M. bovis enfeksiyonunun tanısında; göz, burun, genital kanal svap, bronkoalveoler lavaj sıvısı taze süt, sinoviyal sıvı, örnek olarak alınarak etkenin

izolasyonu yapılabilir. Mikoplazmaların koloni yapısı besiyerlerinde ‘sahanda yumurta’ şeklindedir. Ayrıca tanısında mikrobiyolojik yünden alınan akciğer örneklerinde aseptik koşullarda hem genel amaçlı hem de mikoplazma yönünden modifiye Hayfick besi yerelerine ekim yapılarak etken izolasyonu yapılmaktadır (İssi ve ark., 2015).

Akciğer dokusundaki lezyonlardan, plöra sıvısından, lenf yumrularından etkeni izole edilir.. Etkenin varlığı Western Blot ELISA, SDS-PAGE, kültür, PCR ve immunohistokimya gibi yöntemlerle de ortaya konulduğu bildirilmiştir (Erdağ ve ark., 1995; Thomas ve ark., 2002; Radelli ve ark., 2008; Giovannini ve ark., 2013). *Pasteurella* spp. ve diğer şüpheli hastalık etkenleri yönünden 18-24 saatlik kültürleri yönünden de incelenmek üzere izolasyon besiyerleri olan Kanlı agar ve Mac Conkey agara ekimler yapılmaktadır. Nekrotik akciğer lezyonlarında çok sayıda *M. bovis*’in canlı kalmasına karşın ortamda yine çok sayıda nötrofil ve makrofajlar da bulunabilmektedir. Bu bulgular fagositlerin *M. bovis*’in akciğerlerden nekrotik ve iltihaplı akciğer dokusundan elimine edilememesi ve ajanın kalıcılığının muhtemelen fagositlerden kaçınma kapasitesi nedeniyle olduğunu göstermektedir (Kleinschmidt ve ark., 2013).

2.2.5.1. Klinik teşhis

M. bovis enfeksiyonlarında semptomlar spesifik olmamakla birlikte; yüksek ateş, iştahsızlık, hızlı kilo kaybı, halsizlik, güç solunum, kondüsyon kaybı, burun akıntısı, akut ve kronik olgularda ağırlı yaş veya kuru öksürük gibi önemli semptomlar görülebilmektedir. (Radostitis ve ark., 1995).

M. bovis için klinik bulgular spesifik olmadığından izolasyon ve identifikasyon için laboratuvar teşhisi gereklidir (Nicholas ve Ayling, 2003).

2.2.5.2. Nekropsi bulguları

Nekropside, akut ve kronik formlarda; akciğerler genişlemiş, sert ve mermer görünümündedir (Nicholas, 2008). Hastalığın erken döneminde ölümlerde akciğerlerde çok fazla miktarda sıvı birikmiştir (Brice ve ark., 2000) ve normal ödem sıvısına göre daha yapışkandır. Pleura solgun ve kalınlaşmış görünümündedir. Erken vakalarda akciğerlerin tamamı homojen olarak etkilenmiş olup ve olgularda akciğerlerde şiddetli

ödem ve amfizem vardır. Akut olgularda yaygın olarak akciğerler mermer görünümündedir. Olgularda köpüklü eksudat mevcuttur, bronş ve trahea irin içermektedir ve bu alanlar hiperemiktir (Önat, 2011).

Histolojik bulguda yangı yoktur. Fakat sekonder bakteriyel enfeksiyon varlığında yangı oluşmaktadır (Ter Laak ve ark., 1992). Proteince zengin sıvı eozinofil içeren alveollerde pıhtılaşmış ve daha sonra hiyalin membran içine geçer. Bu durum akut olgularda daha görünürdür. Hayvan yaşarsa alveollerin duvarlarında epitelizasyon belirlenir. Buna interstisyel pnömoni hastalığı adı verilir (Önat, 2011). Hastalığın uzun süre devam ettiği kronik durumlarda fibrozis ile aşırı epitelizasyon görülür. Küçük pulmoner arterlerin duvarında oluşan hiyalin dejenerasyonu hastalığın yaygın tipik histolojik bulgusudur (Ter Laak ve ark., 1992; Önat, 2011).

Alt solunum yolu patojenleri ile birlikte *M. bovis*' in de içinde bulunduğu enfeksiyonlarda tespiti için canlı hayvandan örnek alımında svab kullanılacaksa tahta saplı svabların inhibitör etkileri olabileceğinden, Dacron, kalsiyum alginate ya da polyester svablar tercih edilmelidir (Murray ve Baron, 2003). Svablar daha sonra Stuart ya da Eaton's gibi transport besiyerlerine konulmalıdır (Murray ve Baron, 2003; Önat, 2011).

2.2.5.3. Bakteriyoskopi

Çoğunlukla akciğerlerin bakteriyolojik muayenesi negatiftir, ancak uzun süren olgularda sekonder bakteriyel pnömoni de olguya iştirak ettiğinde *Mannheimia haemolytica* ve *Pasteurella multocida*, *E.coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus* spp., and *Corynebacterium pyogenes* vb. belirlenebilir (Önat, 2011).

2.2.5.4. Kültür

M. bovis etkeninin intranasal ya da intra tracheal olarak alınmasını takiben, enfeksiyondan 9 gün sonrasına kadar kan kültüründen izole edilebilir (Thomas ve ark., 1986). Mycoplasma kolonilerinin agara gömülü olarak üreyen merkezleri daha yoğun olarak koyu mavi, çevreleri ise az yoğun olarak açık mavi boyanır (Francoz ve ark., 2004). Cansız ortamlar dışında Mycoplasmaları embriyolu yumurta ve hücre kültürlerinde üretmek mümkündür (Nicholas, 2008).

2.2.5.5. Serolojik yöntemler

M. bovis spesifik monoklonal antikoları ile klinik örnekte *M. bovis* antijenini tespit eden bir Sandwich (Capture) ELISA geliştirmişlerdir; testin duralılığı konvansiyonel kültür yöntemi ile birlikte kullanılabilir. Araştırmacılar testin duyarlılığının kısa bir zenginleştirme basamağı ile artırılabilirliğini belirtmiştir (Ball ve Findlay, 1998; Önat, 2011). Test Akciğer homojenatlarından ve çeşitli klinik örneklerden *M. bovis* antijeninin tespiti için kullanılmaktadır. *M. bovis* genellikle hastalıklı örneklerde düşük miktarlarda bulunduğu için, örnekler Hayflick medium besiyerinde zenginleştirilir. Kit mikropleytinde 3 gün 37°'de inkübe edildikten sonra kültürler *M. bovis* varlığı yönünden test edilir (Ball ve Findlay, 1998). *M. bovis* antikoları birkaç ay kanda bulunur ve çeşitli yöntemlerle tespit edilebilir.

Serolojik testler genellikle etken izolasyonunun güç olduğu kronik infeksiyonlar ve yüksek dozda antibiyotik tedavisi yapıldığı durumlarda yararlıdır (Nicholas ve Ayling, 2003). Fakat *M. bovis*, *M. bovirhinis* gibi fırsatçı mycoplasmalar tarafından kolaylıkla baskılanabilir ve bazen suşların antijenik varyasyonu serolojik testlerin güvenilirliğini azaltır (Ayling ve ark., 1997).

2.2.5.6. İmmunohistokimyasal yöntemler

M. bovis identifikasyonunda, spesifik antikolar kullanılarak İmmunflorasan ya da İmmunohistokimya yöntemleriyle in situ olarak etkenin tespiti yapılabilmektedir. İmmunohistokimya yöntemi ile antijen ve spesifik lezyonlar birlikte tespit edilebilir (Yılmaz, 2009).

2.2.5.7. Moleküler yöntemler

Kültür ve serolojik yöntemler Mycoplasma infeksiyonlarının teşhisinde önemli olmasına rağmen, kültür yönteminin zorluğu ve serolojik tekniklerdeki kros reaksiyonları DNA bazlı tekniklerin gelişmesine neden olur. Moleküler yöntemler bu tekniklere olan gereksinimi ortadan kaldıramaz fakat bu tekniklerde, örneklerin hızlı işlenmesi, diğer patojenlerle birlikte test edilebilmesi, maliyeti, spesifite ve sensitivitenin artırılma potansiyeli gibi avantajlar vardır (Caswell ve Archambault, 2008). Moleküler teknikler özellikle, antibiyotik kullanılan hayvanlardan ya da doku

artıkları içeren ve otolizli kronik lezyonlardan alınan örnekler ile bu örneklerin çeşitli koruyucularla karıştırılması, bakterilerle kontamine olması, antikorlar içermesi, gibi mycoplasmanın izolasyonunun zor olduğu durumlarda yararlı olmaktadır (Cai ve ark., 2005).

M. bovis'in PCR ile identifikasyonu konvansiyonel kültür metotlarıyla karşılaştırıldığında daha kısa zamanda olmaktadır. PCR testlerinde spesifik ve konservatif gen sekansları amaçlanmaktadır. Akciğer dokusundan *M. bovis*'i tanımlama için hibridizasyon problemleri kullanılarak ya da ürünün erime sıcaklığının analizi ile 16 S rRNA gen fragmentinin amplifikasyonu için adapte edilmiş moleküler tespitinde Real Time PCR yöntemi ile daha kısa sürede, maliyeti daha az olması, tür düzeyinde tespit edilmesi ve önlem alınmasında büyük ölçüde katkı sağlamaktadır (Önat, 2011; Akan ve ark., 2014).

PCR ile ortaya konulduğu çalışmalar incelendiğinde *M. bovis*'in özellikle irinli-nekrotik bronkopnömonilerde daha yüksek pozitifliği olduğu görülmektedir (Maeda ve ark., 2003; Özen ve ark., 2009; Yılmaz, 2009). Ayrıca multiplex PCR yöntemi *M. agalactiae* ve *M. bovis*'in doğru tanımlanması bakımından hızlı ve güvenilir bir araçtır (Radelli ve ark., 2008).

PCR, ELISA, SDS-PAGE, kültür, nükleik asit hibridizasyon gibi tanı yöntemleri karşılaştırıldığında PCR tekniğinin diğer bütün tekniklerden daha hassas ve spesifik bir yöntem olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Butler ve ark., 2001; Cai ve ark., 2005; Özen ve ark., 2009; Karahan ve ark., 2010; Rosetti ve ark., 2010; Giovannini ve ark., 2013). Ayrıca *M. bovis*'in sahada karşılaşılan suşları ile referans suşları PCR ile arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur (Salam ve ark., 2013). Mikoplazma enfeksiyonlarının serolojik teşhisi için spesifik ve hassas ticari kitler olmadığı durumlarda erken tanının konulmaması ve bu nedenle kontrol altına alınmaması sözkonusu olup büyük ekonomik kayıpların önüne geçilemediği belirtilmektedir. Ayrıca serolojik yöntemlerin kros reaksiyonlardan dolayı bazen yanılgılara yol açtığı düşünüldüğü için son yıllarda PCR gibi moleküler yöntemler başarıyla uygulanmaktadır (Radostitis ve ark., 1995; Woolums ve ark., 2009).

Bu alışmada Adana bölgesindeki sığırlarda Real-Time PCR yöntemi ile *M. bovis*'in pnömonili sığır akciğer nekropsi örneklerinde varlığı ve yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır.



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışma materyali olarak 2017 ve 2018 yıllarında pneumoniden şüpheli sığırlardan usulüne uygun alınan Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne getirilen ve makroskopik olarak pneumoni teşhisi konulan 100 adet akciğer doku örneği kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Makroskopik incelemeler

Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Bakteriyoloji Laboratuvarına getirilen akciğer doku örnekleri öncelikle makroskopik olarak incelendi. Yapılan değerlendirmede, pnömoni teşhisi konulan örneklerden usulüne göre iki seri olarak alınan doku örneklerinin bir serisi *M. bovis* varlığının Real Time PCR yöntemiyle ile teşhisi için inceleninceye kadar -80°C'de saklanırken diğer serisi ise *M. bovis* dışındaki diğer patojen etkenlerin varlığını araştırmak üzere kültür yöntemi ile incelenmeye alındı.

3.2.2. Kültürel incelemeler

Bu amaçla örneklerden *M. bovis* dışında diğer solunum yolunun patojenlerinin izolasyonu için kanlı agar ve Mac Conkey Agar'a ekimler yapılarak 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda tespit edilen koloniler Gram boyama, hemoliz ve Mac Conkey Agarda üreme özellikleri de baz alınarak VITEK® 2 Compact (BIOMÉRIEUX) cihaz ile ID panel kullanılarak idendifiye edildi.

3.2.3. Moleküler incelemeler

3.2.3.1. DNA izolasyonu

İncelenecek akciğer doku örneklerinden 25'er mg alınarak parçalamak ve homojenize etmek amacıyla MagNA Lyser Green Beads geen beads tüplerine alınıp üzerine 800 µl %0.9'luk Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) eklendi. Sonra MagNA Lyser

(Roche) cihazında 6000 rpm’de 60 saniye süreyle homojenize edildi ve ardından soğuk blokta 3-5 dakika bekletildi. Örnekler daha sonra 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı testlerde kullanılmak üzere eppendorf tüplerine alındı.

Bu şekilde hazırlanan örneklerin DNA izolasyonları QIAcube (Qiagen, Almanya) tam otomatik nükleik asit izolasyon cihazında yapıldı. Bunun için ticari DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit) firmanın önerdiği protokole göre cihaz tarafından otomatik olarak kullanıldı. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi (Hains ve ark., 2001; Adamu ve ark., 2013).

3.2.3.2. Primerler

Çalışmada incelenecek örneklerde Real Time PCR ile *M. bovis* spesifik gen bölgesinin amplifikasyonu için Foddai ve ark. (2005)’nin daha önce bildirdiği *M. bovis* spesifik primerler kullanıldı (Tablo 1). Tercih edilen primerler 447 bp’lik bir gen bölgesini amplifiye etmektedir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan oligo dizisi

Oligo Adı	Oligo nükleotid dizisi	Amplikon Uzunluğu
mb-mbl	F: 5’-TAT TGG ATC AAC TGC TGG AT-3’	447 bp
	R: 5’-AGA TGC TCC ACT TAT CTT AG-3’	

3.2.3.3. Real Time PCR yöntemi

DNA örneklerinde *M. bovis*’in Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi için ticari Standard Real Time PCR Detection Kit for *Mycoplasma bovis* (Primer Design - GENESIG) kullanıldı. Protokol, firmanın önerdiği şekilde uygulandı.

Kit içeriği

- *M. bovis* spesifik Primer/prob
- *M. bovis* pozitif kontrol standart
- DNase/RNase free su
- Master miks

Reaksiyon Karışımı Hazırlığı ve Amplifikasyon

- Primer/prob miksinin olduğu tüpe hazır kit içerisindeki DNase/RNase free sudan 165 µl ilave edildi ve kısa bir süre vorteks ile karıştırıldı.
- Her bir örnek için aşağıda (Tablo 2) belirtildiği şekilde (kit içinde bulunan pozitif ve negatif kontroller dikkate alınarak) 0.2 ml'lik tüplerde reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan mastermiks

Karışım materyali	Miktar
qPCR master miks	10 µl
Primer/probe	1 µl
DNase/RNase free su	4 µl
Toplam hacim	15 µl

- İncelenecek örnek sayısı kadar 0.2 ml'lik tüplerde ayrı ayrı hazırlanan reaksiyon karışımı üzerine 5 µl incelenecek örnek DNA'sı ilave edildi
- Pozitif kontrol için 1 adet reaksiyon karışımı tüpü üzerine 5 µl *M. bovis* pozitif kontrol standart ilave edildi.
- Negatif kontrol için 1 adet reaksiyon karışımı tüpü üzerine 5 µl DNase/RNase free su ilave edildi.
- Bu şekilde hazırlanan örnekler Real Time PCR cihazına (Rotor-Gene Q-Qiagen) yerleştirildikten sonra aşağıdaki protokole (Tablo 3) göre amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Real Time PCR cihazında örneklere ait elde edilen sonuçlar pozitif (logaritmik eğri) ve negatif kontrolle (düz çizgi) karşılaştırılarak değerlendirildi. Pozitif örneklerde yükselen logaritmik bir eğri gözlenirken, negatif kontrol ve negatif örneklerde düz bir çizgi görüldü. Bir örneğin pozitif / negatifliği ct değeri ile belirlendi. Buna göre ct değeri <30 ise pozitif, ct değeri 30-35 arasında ve logaritmik bir eğri var ise zayıf pozitif, ct değeri >35 olup amplifikasyon eğrisi linear bir yapıda ise negatif olarak kabul edildi.

Tablo 3. Amplifikasyon protokolü

Sıra	İşlem / Aşama	Isı	Süre	Siklus
1.	Enzim Aktivasyonu	95 °C	2 dk	1
2.	Denaturasyon	95 °C	10 sn	50
3.	Bağlanma	60 °C	60 sn	
4.	Uzama	72 °C	60 sn	
5.	Final Uzama	72 °C	2 dk	1



4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

İncelenen akciğerler, makroskopik olarak önce dış sonra iç bakı teknikleriyle bronş ve bronşiyol lümenleri açılarak detaylı bir şekilde incelendi. Loplara dış ve kesit yüzeylerinde çoğunlukla tipik alacalı mermer manzarası görünümünde olduğu, ayrıca gri-krem renge kayan, kısmen sert kıvamlı ve nodüler karakterde yaygın nekroz alanları gözlemlendi. Lezyonlu akciğer dokularının normal akciğer dokusuna göre daha sert kıvamda olduğu, nekrozun özellikle bronş ve bronşiyoller etrafındaki akciğer bölgelerini etkilediği tespit edildi. Lezyonlu bazı bölgelerin kesit yüzeylerinde ise bağ dokudan kapsül ile çevrelenmiş yer yer nekrotik-irinli bir eksudatın varlığı ve kimi örneklerde de koagülasyon nekrozlarının varlığı gözlemlendi (Şekil 1). Bazı örneklerde de akciğerlerin lobar düzeyde etkilendiği, bu bölgelerin kıvamlı ve volumünöz olduğu görüldü (Şekil 2).



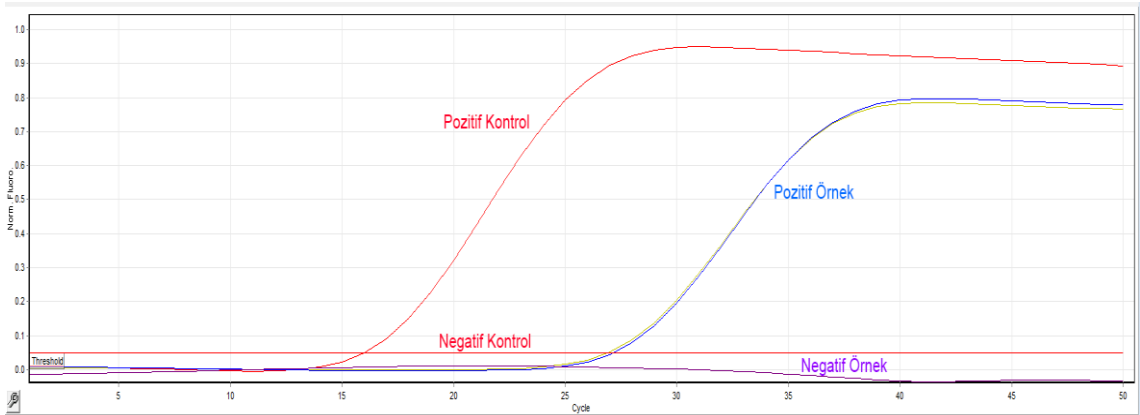
Şekil 1. Lezyonlu akciğer dokusu: İrinli-nekrotik bronkopnömoni



Şekil 2. Fibrinli nekrotik bronkopnömonili akciğer dokusu mermer görünümü

4.2. Real Time PCR Test Sonuçları

Real Time PCR yöntemiyle yapılan incelemede 100 örneğin 52 tanesi Real Time PCR ile *M. bovis* yönünden pozitif bulundu (Tablo 4, Şekil 3). Pozitif örneklerin 46'sı yetişkin sığırlardan, 2'si dana ve 4 tanesi de buzağıdan elde edildi.



Şekil 3. Real Time PCR test sonuçları

Tablo 4. Real Time PCR test sonuçları

<i>Mycoplasma bovis</i> RT-PCR analizi	Sığır	Dana	Buzağı	Toplam
<i>Mycoplasma bovis</i> RT-PCR pozitif	46	2	4	52
<i>Mycoplasma bovis</i> RT-PCR negatif	45	0	3	48
Toplam	91	2	7	100

İncelenen örneklerin 48'i Real Time PCR ile *M. bovis* yönünden negatif bulundu. Bu örneklerin 45'i yetişkin sığır iken 3'ü buzağıdan temin edildi (Tablo 4).

4.3. Bakteriyolojik Kültür Analizi Sonuçları

Çalışmada incelenen 100 Akciğer örneğinin 50'sinden bakteri izolasyonu yapıldı. Kültür pozitif örneklerin 9'u birden fazla bakteri içerirken 41 tanesinden tek bir etken izole edildi.

Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden pozitif bulunan 52 örneğin 29'unda kültür yöntemi ile başka bakteriyel etken izole edilemedi. Örneklerin 23'ünde ise farklı tür ve sayılarda bakteriler ürerken bunların 3'ünde 2 farklı bakteri tespit edildi. Diğer 20 tanesinde tek bir bakteri izole ve identifiye edildi

Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden pozitif ve kültür yöntemi ile pozitif bulunan 23 örneğin 8'inden *E. coli*, 5'inden *Pasteurella multocida*, 3'den *Mannheimia haemolytica*, 3'ünden *Klebsiella pneumonia*, 3'ünden *Sphingomonas paucimobilis* ve 1'inden de *Staphylococcus* spp. izole ve identifiye edildi. Bu örnekler arasında 2 *Klebsiella pneumonia* ve 1 *Sphingomonas paucimobilis* pozitif örnekte ayrıca *E. coli* izole ve identifiye edildi (Tablo 5).

Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden negatif bulunan 48 akciğer örneğinin 27'sinden kültür yöntemiyle bakteriyel etken izolasyonu yapılırken 21'inden herhangi bir bakteriyel etken izole edilemedi. Kültür yönünden pozitif bulunan örneklerin 21 tanesinde tek bir etken izole edilirken 6 tanesinde birden fazla etken izolasyonu yapıldı.

Tablo 5. Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden pozitif bulunan örneklerde diğer bakteri türlerinin dağılımı

Kültür yöntemi ile izole ve identifiye edilen bakteriler	<i>M. bovis</i> RT-PCR pozitif			Toplam (%)
	Sığır	Dana	Buzağı	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	3	0	0	3 (5.77)
<i>Pasteurella multocida</i>	5	0	0	5 (9.62)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1	0	0	1 (1.92)
<i>Klebsiella pneumonia</i> ve <i>E. coli</i>	2	0	0	2 (3.85)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	0	0	2 (3.85)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ve <i>E. coli</i>	1	0	0	1 (1.92)
<i>Staphylococcus</i> spp.	1	0	0	1 (1.92)
<i>E. coli</i>	7	0	1	8 (15.38)
Kültür negatif	24	2	3	29 (55.77)
Toplam	46	2	4	52 (100)

Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden negatif ve kültür yöntemi ile pozitif bulunan 27 örneğin 10'undan *E. coli*, 6'ından *Pasteurella multocida*, 6'ından *Klebsiella pneumonia*, 3'ünden *Sphingomonas paucimobilis*, 1'inden *Mannheimia haemolytica* ve 1'den de *Staphylococcus epidermidis* izole ve identifiye edildi (Tablo 6).

Bu örnekler arasında *Klebsiella pneumonia* pozitif iki örnekten *Pasteurella multocida* ve 2 örnekten de *E. coli* ayrıca izole edilirken *Pasteurella multocida* pozitif bulunan bir örnekte ayrıca *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingomonas paucimobilis* pozitif bir örnekten de ayrıca *E. coli* izole ve identifiye edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden negatif bulunan örneklerde diğer bakteri türlerinin dağılımı

Kültür yöntemi ile izole ve tanımlanan bakteriler	<i>M. bovis</i> RT-PCR negatif			Toplam (%)
	Sığır	Dana	Buzağı	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	0	0	1 (2.08)
<i>Pasteurella multocida</i>	5	0	0	5 (10.42)
<i>Pasteurella multocida</i> ve <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	0	0	1 (2.08)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	2	0	0	2 (4.17)
<i>Klebsiella pneumonia</i> ve <i>E. coli</i>	2	0	0	2 (4.17)
<i>Klebsiella pneumonia</i> ve <i>Pasteurella multocida</i>	2	0	0	2 (4.17)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	0	0	2 (4.17)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ve <i>E. coli</i>	1	0	0	1 (2.08)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	0	1 (2.08)
<i>E. coli</i>	10	0	0	10 (20.83)
Kültür negatif	18	0	3	21 (43.75)
Toplam	45	0	3	48 (100)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pnömoniler, ülkemizde sığır yetiştiriciliğinde görülen önemli problemler arasında yer almaktadır. Mikoplazmalar, pnömoni etkenleri arasında kayda değer bir oranda tespit edilmekte ve bunlar arasında en yaygın olanı da *M. bovis*'tir. Mikoplazmaların neden olduğu pnömoni olguları ülkemizde olduğu gibi dünyanın birçok ülkesinde uzun yıllardan beri bildirilmektedir (Yılmaz, 2009; Önat, 2011; Altun, 2015).

Sağlıklı hayvanların üst solunum yollarında diğer mikoplazmalar ve bazı oportunistik patojenler ile birlikte *M. bovis*'in de kommensal olarak bulunabildiği ve olguların bir kısmında alt solunum yoluna geçerek hastalık oluşturduğu belirtilmiştir (Rosendal ve Martin, 1986; Currin ve ark., 2007).

Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda pnömoni olgularından *M. bovis* izolasyon oranları değişkenlik göstermekle beraber Macaristan'da %11.8, İrlanda'da %13-23, Nijerya'da %23, İtalya'da %25, Fransa'da %30 ve Kanada'da ise %91 oranında izolasyon yapıldığı bildirilmiştir (Brice ve ark., 2000; Byrne ve ark., 2001; Grand ve ark., 2002; Shahriar ve ark., 2002; Tenk ve ark., 2004; Radelli ve ark., 2008).

Ülkemizde farklı yörelerde yapılan çeşitli çalışmalarda ise *M. bovis*'in izolasyon oranı %4 ile %81.3 oranında bildirilmektedir (Erdağ ve ark., 1995; Şahin, 1997; Özdemir ve Türkyılmaz, 2008; Özen ve ark., 2009; Çetinkaya ve ark., 2010; Önat, 2011).

Bu çalışmada, Adana Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü'ne solunum sistemi hastalığı şüphesi ile getirilen 91'i yetişkin sığır, 7'si buzağı ve 2'si de dana olmak üzere toplam 100 adet sığır akciğer örneği kullanıldı. Örnekler öncelikle makroskopik yönden incelendi ve pnömoni tanısı konulan sığır akciğer örnekleri moleküler ve kültürel incelemeler için araştırmada materyal olarak kullanıldı.

İncelenen akciğer doku örneklerinin 52 (%52) tanesi Real Time PCR ile *M. bovis* yönünden pozitif bulundu. Bu örneklerin 46 tanesi yetişkin sığır, 2'si dana ve 4 tanesi de buzağılardan temin edildi.

Pnömoni olgularında etken tespitine yönelik yapılan çalışmalarda örnekleme evreni ve kullanılan yöntemler, tespit edilen oranlarda önemli farklılıklara sebep olabilmektedir. Şöyleki incelenen hayvanların sağlıklı olması, pnömoni bulguları göstermesi, hayvanın yaşı, yetiştirme yönü, bulunduğu yöre, hayvanın canlı oluşu, örneğin türü, alınma zamanı, nekropsi materyali ve materyal transport işlemleri gibi birçok değişken bulunmaktadır. Ayrıca tespit yöntemleri de bu değişkenler arasında değerlendirmesi gereken bir başka faktördür.

İnfeksiyöz hastalıkların etiyolojilerine yönelik yapılan epidemiyolojik çalışmalarda örnekleminin sağlıklı hayvanlardan veya hastalık bulgularının tespit edildiği hayvanlarda yapılması, tespit edilen oranlarda farklılık göstermektedir. Hatta örneğin bir nekropsi materyali oluşu ile canlı hayvandan alınması bile sonuçlarda farklılık oluşturabilmektedir.

Mikoplazmaların klinik örneklerden izolasyonu genelde güç olduğundan ve iyi bir deneyim gerektirdiğinden dolayı yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen bulgular geniş çapta dağılım gösterebilir ve bu nedenle gerçek sonucu veremeyebilir. Dolayısıyla PCR bazlı moleküler yöntemler bu tür çalışmalarda daha avantajlı olabilmekte ve yanlış negatiflik oranları daha da düşmektedir.

Sağlıklı buzağılarda *M. bovis* izolasyonuna yönelik yapılan birçok çalışmada enfeksiyonunun prevalansı %0-7 arasında bulunmuştur (Ter Laak ve ark., 1992; Grand ve ark., 2002; Thomas ve ark., 2002; Hirose ve ark., 2003; Rifatbegovic ve ark., 2007).

Allen ve ark., (1992), sağlıklı buzağılarda yaptıkları bir çalışmada hayvanların besiyeye alınırken pnömoninin prevalansının %40-60 olduğunu, besiyeye alındıktan 12 hafta sonra hastalığın prevalansının neredeyse %100'e kadar arttığını tespit etmişlerdir

Sağlıklı hayvanlardan alınan örnekler ile pnömonili sığırların akciğer örnekleri karşılaştırıldığında *M. bovis* izolasyon oranının pnömonili hayvanlarda daha yüksek olduğu (%20-90) bildirilmiştir (Önat, 2011).

M. bovis enfeksiyonlarında konakçı savunma sistemi zayıfladığı için sekonder olarak vakaya diğer patojenlerin dâhil olması açısından predispoze bir ortam oluşabilmektedir. Miks enfeksiyonların görüldüğü çalışmalarda Arcangioli ve ark.,

(2008) hastalık oluşumunun erken safhasında *M. bovis*'in tespit edildiğini ve sekonder olarak şekillenebilen Bovine Respiratory Disease (BRD) salgınlarının oluşumunda *M. bovis*'in primer ya da predispozan etken olabileceğini ifade etmişlerdir.

Haines ve ark., (2001) immunohistokimyasal yöntemle tedavilere yanıt vermeyen kronik pnömonili 49 sığırın 35'inin akciğerinde ve 22'sinin de eklemünde *M. bovis* antijeni tespit ettiklerini; pozitif vakaların 19 (%39)'unda BVDV, 5 (%10)'ünde *H. somni*, 10 (%20)'unda *M. haemolytica* ve 6 (%12)'sında da hem BVDV hem *M. haemolytica* antijeni yönünden pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Yapılan araştırmalarda *M. bovis* ile birlikte izole edilen bakteriyel etkenler arasında *M. haemolytica*, *P. multocida*, *A. pyogenes* ve daha az sıklıkta *H. somni*, viral etkenler arasında ise bovine respiratory syncytial virüs, BHV-1 ve BPIV-3 gibi viral etkenleri tespit edildiği bildirilmektedir (Nicholas, 2008).

Brice ve ark., (2000), *M. bovis* yönünden pozitiflik tespit ettikleri 287 hayvanda ayrıca %20.5 oranında *M. haemolytica*, %9.06 oranında *A. pyogenes* ve %8.36 oranında *P. multocida* izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Şahin (1997), incelediği 109 adet pnömonili sığır akciğerinden 12 mikoplazma suşu (6 adet *M. bovis*, 4 adet *M. bovirhinis* ve 2 adet *M. arginini*) izole ettiğini, bunların aynı zamanda 7'sinde *P. multocida*, *M. haemolytica* ve *Staphylococcus* spp. izole edildiğini bildirmiştir.

Byrne ve ark. (2001) İrlanda'da klinik örneklerde tespit ettikleri *M. bovis* pozitif vakaların %66'sından aynı zamanda BHV-1 ve BPIV-3 gibi viral etkenler yanında *P. multocida* ve *M. haemolytica* gibi diğer bakterileri tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada incelenen 100 Akciğer örneğinin 50'sinde kültür yöntemi ile bakteriyel etkenler tespit edildi. Kültür pozitif örneklerin 9'u birden fazla etken içerirken 41 tanesinden tek bir etken izole edildi. Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden pozitif bulunan 52 örneğin 23 tanesinde farklı tür ve sayılarda bakteriler ürerken bunların 3 tanesinde 2 farklı bakteri tespit edildi diğer 20 tanesinde tek bir bakteri izole ve identifiye edildi.

Çalışmada Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden pozitif ve kültür yöntemi ile pozitif bulunan 23 örneğin 8 tanesinden *E. coli*, 5 tanesinden *P. multocida*, 3 tanesinden *M. haemolytica*, 3 tanesinden *K. pneumonia*, 3 tanesinden *S. paucimobilis* ve 1 tanesinden de *Staphylococcus* spp. izole ve identifiye edildi. Bu örnekler arasında 2 *K. pneumonia* ve 1 *S. paucimobilis* pozitif örnekte ayrıca *E. coli* izole ve identifiye edildi.

Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden negatif bulunan 48 akciğer örneğinin 27'sinden de kültür yöntemiyle diğer bakteriyel etkenlerin izolasyonu yapıldı. Kültür yönünden pozitif bulunan örneklerin 21 tanesinde tek bir etken izole edilirken 6 tanesinde birden fazla etken izolasyonu yapıldı.

Araştırmada Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden negatif ve kültür yöntemi ile pozitif bulunan 27 örneğin 10 tanesinden *E. coli*, 6 tanesinden *P. multocida*, 6 tanesinden *K. pneumonia*, 3 tanesinden *S. paucimobilis*, 1 tanesinden *M. haemolytica* ve 1 tanesinden de *S. epidermidis* izole ve identifiye edildi.

Bu örnekler arasında *K. pneumonia* pozitif iki örnekte *P. multocida* ve 2 örnekte de *E. coli* ayrıca izole edilirken *P. multocida* pozitif bulunan bir örnekte ayrıca *S. paucimobilis*, *S. paucimobilis* pozitif bir örnekte de ayrıca *E. coli* izole ve identifiye edildi.

Konu ile ilgili yapılan benzer çalışmalarda *M. bovis* pozitif hayvanlarda izole edilen diğer patojenlerin bu çalışmada izole edilen etkenlerle büyük oranda paralellik gösterdikleri gözlemlendi.

Görüldüğü üzere pnömoni olgularında immun sistemin baskılanması ve dokularda gelişen diğer predispoze faktörler sekonder etkenlerin de dâhil olmasına ortam sağlamaktadır. Bu araştırmada da diğer araştırmalarda gözlenen multifaktöriyel pnömoni olgularının varlığı bir kez daha ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak sığırlarda pnömoni olguları, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de sıklıkla rastlanan ve birçok yörede önemli ekonomik kayıplara yol açtığından üzerinde hassasiyetle durulması gereken bir sorundur.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar *M. bovis*'in Adana ve yöresinde yaygın (%52) bir pnömoni patojeni olduğunu göstermektedir. Real Time PCR yöntemiyle *M. bovis* yönünden pozitif bulunan örneklerin %44.2'sinde farklı tür ve sayılarda bakteriler izole edilirken bunların 3 tanesinde 2 farklı bakteri, diğer 20 tanesinde tek bir bakteri izole ve tanımlanmıştır. Bu tür verileri ile primer etkenin tespiti oldukça güç olmakla birlikte *M. bovis* yönünden pozitif bulunan örneklerde diğer etkenlerin izole edilememesi, *M. bovis*'in primer etken olabilme olasılığını ve oranını yüksek tutmaktadır.

Çalışmada *M. bovis* yönünden pozitiflik oranının yüksek çıkmasının, tanı yöntemleri içerisinde literatürde referans metod olarak gösterilen ve bu çalışmada da kullanılan Real Time PCR metodundan kaynaklandığı kanaatine varılmıştır.

Sürü yönetimi bakımından pek çok eksikliğin görüldüğü ülkemizde etkenin bu kadar yaygın olmasının sebepleri arasında işletme yönetim hatalarının, olumsuz bakım koşullarının ve stres faktörlerinin göz ardı edilmemesi önerilmektedir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda izole edilen *M. bovis* suşlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması ile *M. bovis* infeksiyonlarından korunmada ülkemize özgü yerel suşlardan aşı elde edilmesi yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Adamu JY, Wawegama NK, Browning GF, Markham PF. Membrane proteins of *Mycoplasma bovis* and their role in pathogenesis. *Res Vet Sci.* 2013;95:321-5.
- Aebi M, Bodmer M, Frey J, Pilo P. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Vet Microbiol.* 2012;157:363-8.
- Akan M, Babacan O, Torun E, Müştak HK, Öncel T. Diagnosis of *Mycoplasma bovis* Infection in Cattle by ELISA and PCR. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2014;20(2):249-52.
- Allen JW, Viel L, Bateman KG, Rosendal S. Changes in the bacterial flora of the upper and lower respiratory tracts and bronchoalveolar lavage differential cell counts in feedlot calves treated for respiratory disease. *Canadian J Vet Res.* 1992;56:177-83.
- Altun S. Pnömonili Sığır Akciğerlerinde *Mycoplasma bovis* Enfeksiyonunun Patolojik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması [Doktora tezi]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2015.
- Arcangioli MA, Aslan H, Tardy F, Pourmarat F, Le Grand D. The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in French calf feedlots. *The Vet J.* 2012;192:96-100.
- Arcangioli MA, Duet A, Meyer G, Denburg A, Bezille P, Poumarat F, ve ark. The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots, *The Vet J.* 2008;177:89-93.
- Ayling Rd, Nicholas RJ, Johansson KE. Application of the polymerase chain reaction for the routine identification of *Mycoplasma bovis*. *Vet Rec.* 1997;141:307-8.
- Ball HJ, Findlay D. Diagnostic applications of monoclonal antibody-based sandwich ELISAs. Editörler: Miles, RJ, Nicholas RA. *Mycoplasma Protocols*, Humana press Inc., Totowa, NJ. *Methods in Mol Biol.* 1998;104:127-32.
- Brice N, Finlay D, Bryson DG, Henderson J, Mcconnell W, Ball HJ. Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland, 1995 to 1998. *Vet Rec.* 2000;146(22):643-4.
- Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. Revised minimal standarts for description of new species of the class mollicutes (Division Tenericutes). *International Journal of Systematic and Evol Microbiol.* 2007;57:2703-19.
- Butler JA, Pinnow CC, Thomson JU, Levisohn S, Rosenbusch RF. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to investigate *Mycoplasma bovis* outbreaks. *Vet Microbiol.* 2001;78:175-81.
- Byrne WJ, McCormack R, Brice N, Egan J, Markey B, Ball HJ. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical samples in the Republic of Ireland. *Vet Rec.* 2001;148(11):331-3.
- Cai HY, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott JF. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *J Vet Diagn Invest.* 2005;17:537-45.
- Caswell JL, Willams KJ. Respiratory system in: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. 2007;523-629.

Caswell CL, Archambault M. Mycoplasma bovis pneumonia in cattle. Anim Health Res Rev. 2008;8:161-186.

Currin JF, Currin N, Whittier DW. Mycoplasma in Beef Cattle, Virginia Cooperative extension Publication, 2007;300-4.

Çakar L, Şahin G, Yemen N. Solunum. İçinde: Tıbbi Fizyoloji, Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ, (çeviri editörleri) Textbook of Medical Physiology, Guyton AC, Hall JE. 12. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2013, s. 468-532.

Çetinkaya B, Karahan M, Kalın R, Atıl E. Türkiye'nin doğusundaki ruminant mikoplazmalarının biyoçeşitliliği: Aşı ve kontrol stratejileri için uygulamalar. IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), Kongre özet kitabı, s.4-7, 2010.

Divers TJ, Peek SF. Rebhun's Diseases of Dairy Cattle. 2nd ed. Saunders Elsevier, St. Louis: Missouri; 2008.

Erdağ O, Erdoğan G, Türkaslan J, Gürel A. Buzağı ve dana pneumonilerinde Mycoplasma ve bakteriyel etkenlerin izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılıkları. Animal Information. 1995;112:115-9.

Eurell JA, Frappier BL. Dellman's Text Book of Veterinary Histology. 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA: Blackwell publishing; 2006.

Foddai A, Idini G, Fusco M, Rosa N, de la Fe C, Zinellu S, Corona L, Tola S. Rapid differential diagnosis of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma bovis based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. Mol Cell Probe. 2005;19:207-12.

Francoz D, Fortin M, Fecteau G, Messier S. Determination of Mycoplasma bovis susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. Vet Microbiol. 2004;105:57-64.

Gabinaitiene A, Siugzdarte J, Zilinskas H, Siugzda R, Petkevicius S. Mycoplasma bovis and bacterial pathogens in the bovine respiratory tract. Vet Med. 2011;56(1):28-34.

Giovannini S, Zanoni MG, Salogni C, Cinotti S, Alborali GL. Mycoplasma bovis infection in respiratory disease of dairy calves less than one month age. Res Vet Sci. 2013;95:576-9.

Gourlay RN, Thomas LH and Howard CJ. Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with Mycoplasma agalactiae subsp. bovis. Vet Rec. 1976;98:506-7.

Grand DL, Calavas D, Brank M, Citti C, Rosengarten R, Bé zille P, ve ark. Serological prevalence of Mycoplasma bovis infection in suckling beef cattle in France. Vet Rec. 2002;150:268-73.

Güneş V. Buzağı Solunum Sistemi Hastalıkları. Lalahan Hay Araşt Enst Derg. 2018; 58(3):35-40.

Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4th ed. Blackwell Publishing Professional 2121 State Avenue, Iowa 50014, USA, 2001.

Haines DM, Martin KM, Clark EG, Jim GK, Janzen ED. The immunohistochemical detection of Mycoplasma bovis and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot

- cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can Vet J.* 2001;42:857-60.
- Hale, HH, He Lmboldt CF, Plastridge WN, Stula, EF. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *Cornell Vet.* 1962;52:582-91.
- Hermeyer K, Peters M, Brüggmann M, Jacobsen B, Trautwein MH. Demonstration of *Mycoplasma bovis* by immunohistochemistry and in situ hybridization in an aborted bovine fetus and a neonatal calf. *J Vet Diagn Invest.* 2012;24(2):364-9.
- Hirose K, Kobayashi H, Ito N, Kawasaki Y, Zako M, Kotani K, ve ark. Isolation of mycoplasmas from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates. *J Vet Med B.* 2003;50:347-51.
- İssi M, Eröksüz Y, Öngör H, Gül Y, Kaya M, Çevik A. Enzootik pnömoni semptomları görülen bir besi sığırı işletmesinde *Mycoplasma bovis* enzootik enfeksiyonu. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 2015;10:39-45.
- Karahan M, Kalin R, Atil E, Çetinkaya B. Detection of *Mycoplasma bovis* in cattle with mastitis and respiratory problems in eastern Turkey. *Vet Rec.* 2010;166:827-9.
- Kleinschmidt S, Spargser J, Rosengarten R, Hewicker Trautwein M. Long-term survival of *Mycoplasma bovis* in necrotic lesions and in phagocytic cells as demonstrated by transmission and immunogold electron microscopy in lung tissue from experimentally infected calves. *Vet Microbiol.* 2013;162:949-53.
- Kuiluka LJM, Ojeniyi B, Friis NF. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. *Acta Vet Scand.* 2000;41:139-46.
- Lee KH, Lee JW, Wang SW, Liu LY, Lee MF, Chuang ST, ve ark. Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20:463-71.
- Maeda T, Shibahara T, Kimura K, Wada Y, Sato K, Imada Y, ve ark. *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *J Comp Pathol.* 2003;129:100-10.
- Maunsell FP, Donovan GA, Risco C, Brown MB. Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine.* 2009;27:2781-8.
- McGavin MD, Zachary JF. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4th ed. by Mosby inc. 11830 Westline Industrial Drive St. Louis: Missouri; 2007, p.500-30.
- Murray PR, Baron EJ. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: D.C. American Society for Microbiology; 2003, p.2310.
- Nicholas R, Ayling R, Mc Aulliffe L. Bovine respiratory disease in: *Mycoplasma Disease of Ruminants*, CAB international, Oxfordshire, UK; 2008, p. 132-161.
- Nicholas R. Bovine Respiratory Disease. In: *Mycoplasma Disease of Ruminants: Disease, Diagnosis and Control*, Wallingford, Oxon, GBR: CABI publishing; 2008, p.132-168.
- Nicholas RA, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci.* 2003;74:105-12.

Nicholas RAJ, Ayling RD, Stipkovits LP. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings, *Vaccine*. 2002;20:3569-75.

Önat K. Sığır pnömonilerinde *Mycoplasma bovis* varlığının kültür ve ELISA yöntemleri ile araştırılması [Doktora tezi]. Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2011.

Özdemir Ü, Türkyılmaz MA. Buzağlarda önemli pnömoni etkenlerinden *Mycoplasma bovis*'in izolasyonu ve identifikasyonu, VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi; 2008. Van; s.82.

Özen H, Karaman M, Şahin M, Özcan K. Pnömonili sığırlarda *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* ve *M. mycoides* subsp. *mycoides* (küçük koloni tipi)' in PCR ile belirlenerek patolojik bulgularının incelenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2009;15:125-33.

Pfützner H. Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie Supplement*. 1990;20:394-9.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. *Mycoplasmas*, Editors: Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, *Veterinary microbiology and microbial disease*. Iowa: Blackwell Publishing; 2002, p.189-195.

Radelli E, Luini M, Loria GR, Nicholas RAJ, Scanziani E. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves adult cattle at slaughter. *Res Vet Sci*. 2008;85:282-90.

Radostitis OM, Blood DC, Gay CC. *Veterinary Medicine*. 8th ed. 1995, p.563-627.

Rifatbegovic M, Assuncao P, Poveda JB, Pasic S. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina. *Vet Rec*. 2007;160:484-5.

Rosendal S, Martin SW. The association between serological evidence of mycoplasma infection and respiratory diseases in feedlot calves. *Can J Vet Res*. 1986;50:179.

Rosetti BC, Frey J, Pilo P. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. *Mol Cell Probes*. 2010;24:321-3.

Salam HSH, Hotzel H. Investigation of phenotypic variations amongst *Mycoplasma bovis* field German isolates using SDS-PAGE. *Beni-Seuf Univ J Appl*. 2013;2(2):103-7.

Sayın Z, Sakmanoğlu A, Uçan US, Uslu Ali, Hadimli HH, Aras Z, Özdemir Ö, Erganiş O. *Mycoplasma* infections in dairy cattle farms in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*. 2016;40:569-74.

Schott C, Cai H, Parker L, Bateman KG, Caswell L. Hydrogen peroxide production and free radical mediated cell stress in *Mycoplasma bovis* pneumonia. *J Comp Pathol*. 2013;1-11.

Shahriar FM, Clark EG, Janzen E, West K, Wobeser G. Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Can Vet J*. 2002;43:863-8.

Soehnlen MK, Kunze ME, Karunathilake E, Henwood BH, Karyawasam S, Wolfgang DR, ve ark. In vitro antimicrobial inhibition of *Mycoplasma bovis* isolates submitted to the Pennsylvania Animal Diagnostic Laboratory using flow cytometry and broth microdilution method. *J Vet Diagn Invest*. 2011;23(3):547-51.

Stipkovits L, Ripley P, Varga J, Pálfi V. Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection. Acta Vet Hung. 2000;48(4):387-95.

Şahin M. Kars yöresinde sığır pnömonilerinden Mikoplazmaların izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 1997;9(2):71-89.

Tenk M, Stipkovits L, Hufnagel L. Examination of the role of *Mycoplasma bovis* in bovine pneumonia and a mathematical model for its evaluation. Acta Vet Hung. 2004;52: 445-56.

Ter Laak EA, Noordergraaf JH, Boomsluitter E. The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. J Vet Med B. 1992;39:610-6.

Thomas A, Ball H, Dizier I, Trolin A, Bell C, Mainil J, ve ark. Linden Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. Vet Rec. 2002;472-6.

Thomas LH, Howard CJ, Stott EJ, Parsons KA. *Mycoplasma bovis* infections in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. Vet Pathol. 1986;23:571-8.

Walker RL. Mollicutes. Editors: Hirsh DC, Zee YC, Veterinary Microbiology, 3th ed. Iowa: Blackwell Publishing;1999, p.165-172.

Wawegama NK, Kanci A, Marendra MS, Mansell PD, Browning GF, Markham PF. Histochemical and morphometric characterization of bronchopneumonia in calves caused by infection with *Mycoplasma bovis*. Vet Microbiol. 2012;158:220-4.

Whithear KL, Browning GF. *Mycoplasma*. In: Gyles CL, Prescott JF (eds). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3th ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2004, p.397-411.

Woolums AR, Ames TR, Baker JC. Lower respiratory tract diseases. In: Large Animal Internal Medicine. Ed. BP. Smith, 4th ed. Missouri; Mosby Elsevier, St Louis: 2009.

Yılmaz R. Sığırlarda *Mycoplasma bovis* Pnömonilerinde Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgular [Doktora tezi]. Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2009.

ÖZGEÇMİŞ

Şifa KARAHAN, 1976 yılında Kadirli-Osmaniye’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kadirli-Osmaniye’de tamamladı. 1994 yılında girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi’nden 1999 yılında derece ile mezun oldu. 1999-2001 yılları arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda laborant statüsünde çalıştı. 2005 Yılında Tarım ve Orman Bakanlığı’na bağlı Van Tarım İl Müdürlüğüne atandı. 2016 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2015 yılında çalışmaya başladığı Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü’nde halen görev yapmakta olup evli ve 3 çocuk annesidir.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 25471393.07 - 3847

13 / 11 / 2017

Konu : Etik Kurul Belgesi

Sayın, Şifa KARAHAN
Veteriner Hekim

İlgi: 09.11.2017 tarihli dilekçeniz.

İlgili dilekçenize istinaden; Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde yapmayı düşündüğünüz “Pneumonili Sığır Akciğerlerinde Mycoplasma bovis’in Real Time PCR ile Araştırılması” adlı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili olarak talep ettiğiniz Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü HADYEK kararı ekte gönderilmiştir.

Gereğini rica ederim.


Ömer AKMAZ
Müdür

Eki : HADYEK Raporu - 1 sayfa



T.C.
GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü

**ADANA VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK
KURULU**

Yerel Etik Kurul Kararı

Tarih: 13.11.2017

Sayı :11-3847

Konu :Veteriner Hekim Şifa KARAHAN

Sayın: Veteriner Hekim Şifa KARAHAN

Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 13.11.2017 tarihinde Cemal KURT başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararı almıştır.

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji ABD Yüksek Lisan Öğrencisi Veteriner Hekim Şifa KARAHAN'ın sunduğu "*Pnömonili Siğir Akciğerlerinde Mycoplasma bovis'in Real Time PCR ile Araştırılması Projesi*" Etik Kurulumuzca, Etik kurul iznine gerek olmadığına karar vermiştir.

Bülent MAHANOĞLU

Üye

Dr. Mansur Seymen SEÇMENÖĞLU

Üye

Yrd.Doç.Dr Funda EŞKİ

Üye

Dr. Emin ZÜMRÜTDAL

Üye

Meliha Bacaksız ASLAN

Üye (sivil)
(Katılmadı)

Oktay SÖZER

Üye(Sivil)

Cemal KURT

Başkan

Karar sıra no	Tarih	Nereden Gönderildiği	Gündem
11	13.11.2017	Şifa KARAHAN (Van YY Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)	Veteriner Hekim Şifa KARAHAN'ın yürütücüsü olduğu '' Pnömonili Sığır Akciğerlerinde Mycoplasma bovis'in Real Time PCR ile Araştırılması Projesi''
Toplantı Tarih:13.11.2017 Başkan: Cemal KURT Üyeler: Bülent MAHANOĞLU, Dr Mansur Seymen SEĞMENOĞLU, Yrd Doç Dr Funda EKŞİ, Oktay SÖZER			
<p>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji ABD Yüksek Lisan Öğrencisi Veteriner Hekim Şifa KARAHAN'ın sunduğu ''Pnömonili Sığır Akciğerlerinde Mycoplasma bovis'in Real Time PCR ile Araştırılması Projesi'' başlıklı Etik kurul başvurusu Başkan ve Beş üyenin katılımı ile değerlendirildi.</p> <p>Yapılan değerlendirmede, planlan projenin Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğe uygun olarak hazırlandığı ve öngörülen çalışmanın HADYEK izin kapsamı dışında olduğundan <u>Etik Kurul İzinine Gerek Olmadığına Karar Verilmiştir.</u></p>			
Başkan		Üye	Üye
Cemal KURT 		Bülent MAHANOĞLU 	Dr. Mansur Seymen SEĞMENOĞLU 
Üye		Üye	
Yrd Doç Dr Funda EKŞİ 		Oktay SÖZER 	

Ek 2. Tez Orijinallik Raporu

	<p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p>	
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU		

Tarih: 01 / 07 / 2019

Tez Başlığı / Konusu: Pnömonili Sığır Akciğer Örneklerinde *Mycoplasma bovis*'in Real Time PCR İle Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 33 sayfalık kısmına ilişkin, 30 / 06 / 2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 4 (Dört)'tür.


Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


Şifa KARAHAN

Öğrencinin Adı Soyadı	:	Şifa KARAHAN
Anabilim Dalı	:	Mikrobiyoloji (Veteriner Programı)
Öğrenci No	:	169301026
Programı	:	<input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
DANIŞMAN ONAYI		ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN		 UYGUNDUR