

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARS YÖRESİNDE PNÖMONİLİ KOYUN  
AKCİĞERLERİNDEN *MYCOPLASMA* ETKENLERİNİN  
KÜLTÜREL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Vet. Hek. Olcay ÖZTÜRKLER**

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman**

**Prof. Dr. Salih OTLU**

**2019- KARS**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDE PNÖMONİLİ KOYUN**  
**AKCİĞERLERİNDEN *MYCOPLASMA* ETKENLERİNİN**  
**KÜLTÜREL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Vet. Hek. Olcay ÖZTÜRKLER**

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman**

**Prof. Dr. Salih OTLU**

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje**

**No: 2015- TS- 71**

**2019- KARS**

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Veteriner Hekim Olcay ÖZTÜRKLER tarafından hazırlanmış olan “**Kars Yöresinde Pnömonili Koyun Akciğerlerinden Mycoplasma Etkenlerinin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **ay bütüğü** ile  **Kabul** edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/06/2019

**Adı Soyadı:**

Başkan: Prof.Dr. Fuat AYDIN

Üye: Prof.Dr. Salih OTLU

Üye: Doç.Dr. Özgür ÇELEBİ

Üye: Doç.Dr. Fatih BÜYÜK

Üye: Doç.Dr. H. Kaan MÜŞTAK

**İmza:**



Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **27/06/19** gün ve **16/290** sayılı kararıyla onaylanmıştır.

## ÖNSÖZ

Solunum sistemi hastalıkları, ülkemiz dahil dünyanın birçok ülkesinde küçük ve büyük baş hayvanlarda yaygın görülmekte ve hayvanlarda ani ölüm, persiste enfeksiyonlara bağlı verim kayıpları, ıskartaya çıkma ve takiben kesime sevk, artan işçilik ve işletme maliyetleri ve koruma-kontrol giderleri gibi birçok ekonomik kayıba yol açmaktadır.

Küçük ruminantlarda solunum sistemi hastalıkları birçok bakteriyel, viral ve paraziter etkenin yer aldığı bir hastalık kompleksi olup, Mikoplazmalar bu etkenler içerisinde önemli yer tutmaktadır. Koyun pnömonilerinde daha yaygın saptanan *Mycoplasma ovipneumoniae* hem primer etken olarak enfeksiyona yol açabilmekte hem de diğer bakteriyel ve viral enfeksiyonlara predispozisyon oluşturmaktadır. Küçük ruminantlarda solunum sistemi hastalık tablolarına *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* ve *Mycoplasma agalactiae* adlı türlerin de dâhil olduğu bilinmektedir.

Mikoplazma kaynaklı solunum sistemi enfeksiyonları kontagiyöz özelliği ile kısa sürede tüm sürüye yayılmakta, klinik belirtiler değişiklik göstermekte ve hastalık nadiren ölümcül olduğu için tanı konulmadan kendiliğinden sonlanabilmektedir. Ülkemizde koyunlarda Mikoplazma kaynaklı birçok solunum sistemi enfeksiyonu bildirilmiştir. Fakat Kars yöresinde koyunlarda pnömoni ve diğer solunum sistemi hastalıklarının etiyolojisinde Mikoplazmaların yaygınlığı hakkında veriler sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada, Kars yöresindeki koyun pnömoni vakalarında Mikoplazma etkenlerinin rolleri hakkında daha fazla bilgi edinilmesi ve Mikoplazma pnömonilerine özel bir vurgu yapılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, elde edilen verilerin özellikle Türkiye ve diğer Orta Doğu ülkelerinde olduğu gibi karma yetiştiriciliğin yapıldığı hayvan sürülerinde Mikoplazma enfeksiyonlarının yeniden değerlendirilmesine imkân tanıyacağı umulmaktadır.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, bu tez çalışmasında yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Salih OTLU'ya, ayrıca öneri ve katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Mitat ŞAHİN'e, laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Fatih BÜYÜK, Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ, Dr. Öğr. Üyesi Aliye GÜLMEZ SAĞLAM, Dr. Öğr. Üyesi Elif ÇELİK, Arş. Gör. Mustafa Reha COŞKUN ve Arş. Gör. Eray BÜYÜK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca desteklerinden dolayı hocalarım sayın Prof. Dr. Fuat AYDIN ve sayın Doç. Dr. Kaan MÜŞTAK'a teşekkür ederim. Hayatım boyunca benden her türlü desteğini esirgemeyen, eğitimim sırasında moral ve motivasyonumu artıran ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Prof. Dr. Yavuz ÖZTÜRKLER'e ve tezimi hazırlamam sırasında yeterince vakit ayıramadığım durumlarda anlayış gösteren kızlarım Sıla ÖZTÜRKLER ve Ela ÖZTÜRKLER'e teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>I</b>
<b>TABLOLAR LİSTESİ</b>	<b>III</b>
<b>RESİMLER LİSTESİ</b>	<b>IV</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	<b>V</b>
<b>ÖZET</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>1. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
1.1. Giriş	3
1.2. Taksonomi	4
1.3. <i>Mycoplasma</i> Türleri	6
1.3.1. <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	7
1.3.2. <i>Mycoplasma arginini</i>	9
1.3.3. <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	9
1.3.4. <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	9
1.3.5. Diğer <i>Mycoplasma</i> Türleri	10
1.4. Mikoplazmaların Biyokimyasal, Metabolik ve Kültürel Özellikleri	10
1.4.1. Biyokimyasal ve Metabolik Özellikleri	10
1.4.2. Üreme Gereksinimleri ve Kültürel Özellikleri	11
1.5. Mikoplazmaların Virülans Faktörleri ve Patogenezi	13
1.5.1. Mikoplazmaların Konak Hücreye Tutunması	14
1.5.2. Mikoplazmaların Konak Hücre Membranına Etkisi	14
1.5.3. Mikoplazmalarda Kapsül Varlığı	14
1.5.4. Mikoplazmaların Klastojenik ve Onkojenik Özellikleri	14
1.5.5. Mikoplazmaların Toksin Üretimi	14
1.5.6. Mikoplazmaların Ekstrasellüler Enzimleri	15
1.6. Mikoplazma Enfeksiyonlarının Epidemiyoloji	15
1.7. Mikoplazma Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular	16
1.7.1. Kontagiyöz Agalaksia	16
1.7.2. Kontagiyöz Keçi Plöyrapnömonisi (CCPP)	17
1.8. Mikoplazma Enfeksiyonlarının Patolojik Bulguları	17

1.9. Mikoplazma Enfeksiyonlarının Teşhis Metotları	18
1.9.1. Örneklerin Alınması	19
1.9.2. Örneklerin Taşınması	21
1.9.3. <i>Mycoplasma</i> Türlerinin İzolasyonu	21
1.9.3.1. Mikoplazma Subkültürleri	22
1.9.4. Mikoplazma Türlerinin İdentifikasyonu	23
1.9.4.1. Fenotipik İdentifikasyon	23
1.9.4.1.1. Biyokimyasal İdentifikasyon	23
1.9.4.1.2. Serolojik İdentifikasyon	24
1.9.4.2. Kültür Dışı Yöntemler	25
1.9.4.3. Moleküler İdentifikasyon	26
1.9.4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	26
1.9.4.3.1.1. Gerçek Zamanlı PCR (Real- Time PCR)	27
1.9.4.3.1.2. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism PCR)	28
1.9.4.3.1.3. Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA- PCR (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD- PCR)	29
1.9.4.3.2. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)	29
1.9.4.3.3. Diğer Tiplendirme Metotları	29
1.10. Tedavi ve Kontrol	30
<b>2. MATERYAL ve METOT</b>	<b>32</b>
2.1. Çalışma Alanı	32
2.2. Hayvan Kaynağı ve Çalışma Planı	32
2.3. Örnekleme Stratejisi ve Örnek Miktarı	32
2.3.1. Örnekleme	33
2.4. İzolasyon İçin Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar	33
2.4.1. <i>Mycoplasma</i> Agar Base' in İçeriği	33
2.4.2. <i>Mycoplasma</i> Broth Base' in İçeriği	33
2.4.1.1. Maya Ekstraktının Hazırlanması	34
2.4.1.2. At Serumunun Hazırlanması	34
2.4.1.3. Talyum Asetatın Hazırlanması	34
2.4.1.4. Penisilinin Hazırlanması	34



2.4.3. Mycoplasma Agar Base' in Hazırlanması	35
2.4.4. Mycoplasma Broth Base' in Hazırlanması	35
2.5. Mikoplazma Etkenlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu	35
2.5.1. Mikoplazma Etkenlerinin İzolasyonu	35
2.5.2. Mikoplazma Etkenlerinin İdentifikasyonu	37
2.6. Moleküler Analiz	37
2.6.1. Materyal	37
2.6.1.1. Moleküler Tanı İçin Kullanılan Araç, Gereç ve Veri Programları	37
2.6.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Reaktifleri	38
2.6.1.3. Elektroforez Aşamasında Kullanılan Kimyasallar	38
2.6.2. Metot	38
2.6.2.1. DNA Ekstraksiyonu	39
2.6.2.1.1. İzole Edilen <i>Mycoplasma</i> Suşlarından DNA Ekstraksiyonu	39
2.6.2.2. PCR Analizleri	39
2.6.2.2.1. Cins Spesifik PCR Analizi	39
2.6.2.2.2. Tür Spesifik PCR Analizi	40
2.6.2.2.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR Analizi	41
2.6.2.2.4. 16S rRNA Gen Bölgesinin Dizi Analizi	41
2.6.2.3. Elektroforez ve Görüntüleme	42
2.7. İstatistiksel Değerlendirme	42
<b>3. BULGULAR</b>	<b>43</b>
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	43
3.2. İzolatların PCR ile İdentifikasyon Bulguları	44
3.2.1. Cins Spesifik PCR Bulguları	44
3.2.2. Tür Spesifik PCR Bulguları	44
3.2.3. 16S rRNA Gen Bölgesi PCR Bulguları	46
3.2.4. 16S rRNA Gen Bölgesinin Sekans Bulguları	46
3.2.4.1. 16S rRNA Gen Bölgesinin Sekansı Temelli Filogenetik Analiz Bulguları	47
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>50</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>67</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>80</b>

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b><u>Simge- Kısaltma</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
<b>AFLP</b>	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm (Amplified Fragment Length Polymorphism)
<b>AGPT</b>	Agar Jel Presipitasyon Test (Agar Gel Precipitation Test)
<b>ATCC</b>	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
<b>BLAST</b>	Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
<b>CCPP</b>	Bulaşıcı Keçi Plörapnömonisi (Contagious Caprine Pleuropneumonia)
<b>DAPI</b>	4', 6- Diamidino- 2- Fenilindol (4', 6- Diamidino- 2- Phenylindole)
<b>GIT</b>	Üreme İnhibisyon Testi (Growth Inhibition Test)
<b>ICSP</b>	Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi (International Committee on Systematic Bacteriology)
<b>IHA</b>	İndirekt Hemaglutinasyon Testi (Indirect Hemagglutination Assay)
<b>IS</b>	İnsersiyon Sekans (Insertion Sequence)
<b>KFT</b>	Komplement Fikzasyon Test
<b>MLSA</b>	Çoklu Bölge Dizilim Analizi (Multi- Locus Sequence Analysis)
<b>NCBI</b>	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
<b>NCTC</b>	Ulusal Tıp Kültürleri Koleksiyonu (National Collection of Type Cultures)
<b>PPLO</b>	Plöyrapnömoni Benzeri Organizma (Pleuropneumonia-Like Organisms)
<b>spp.</b>	Türler
<b>subsp.</b>	Alt tür

<b>VNTR</b>	Değişken Sayıda Ardışık Tekrar (Variable Number Tandem Repeat)
<b>PFGE</b>	Darbeli Alan Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
<b>SDS PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)



## TABLOLAR LİSTESİ

<b>Tablo No</b>	<b>Adı</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1</b>	<i>Mollicutes</i> ' lerin sınıflandırılması	5
<b>Tablo 2</b>	Mikoplazmaları Öbakterilerden ayıran özellikler	6
<b>Tablo 3</b>	Küçük ruminantlarda başlıca <i>Mycoplasma</i> türleri ve hastalık tabloları	9
<b>Tablo 4</b>	<i>Mycoplasma</i> türlerinin izolasyonunda kullanılan besiyerleri	12
<b>Tablo 5</b>	Ruminantlarda <i>Mycoplasma</i> türlerinin izolasyonu için örnekleme teknikleri	20
<b>Tablo 6</b>	<i>Mycoplasma</i> cinsinin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler	23
<b>Tablo 7</b>	Mikoplazmaların tanımlanmasında kullanılan moleküler teknikler	27
<b>Tablo 8</b>	<i>Mycoplasma</i> türlerinin teşhisinde kullanılan PCR yöntemleri ve hedef gen bölgeleri	28
<b>Tablo 9</b>	Cins spesifik PCR analizi için kullanılan primerler ve özellikleri	39
<b>Tablo 10</b>	Cins spesifik PCR analizi için reaksiyon bileşenleri	40
<b>Tablo 11</b>	Tür spesifik PCR analizi için kullanılan primerler ve özellikleri	40
<b>Tablo 12</b>	Tür spesifik PCR analizi için reaksiyon bileşenleri	40
<b>Tablo 13</b>	16S rRNA gen bölgesinin PCR analizi için kullanılan primerler ve özellikleri	41
<b>Tablo 14</b>	16S rRNA gen bölgesinin PCR analizi için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve hacmi	41
<b>Tablo 15</b>	Kültür pozitif örneklerin PCR analizlerine göre <i>Mycoplasma</i> tür dağılımı	45
<b>Tablo 16</b>	16S rRNA gen bölgesinin sekansı temelli Mikoplazma identifikasyon sonuçları	47

**RESİMLER LİSTESİ**

<b>Resim No</b>	<b>Adı</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Resim 1</b>	Pnömonik koyun akciğerlerinden kültürel işlemlerde kullanılmak üzere homojenat hazırlanması	36
<b>Resim 2</b>	Kültürel işlem sonrası <i>Mycoplasma</i> türlerine ait koloni varyasyonları	43
<b>Resim 3</b>	Cins spesifik PCR' ye ait amplifiye ürünlerin jel elektroforez görüntüsü	44
<b>Resim 4</b>	Tür spesifik PCR' ye ait amplifiye ürünlerin jel elektroforez görüntüsü	45
<b>Resim 5</b>	16S rRNA gen bölgesinin PCR' sine ait amplifiye ürünlerin jel elektroforez görüntüsü	46

**ŞEKİLLER LİSTESİ**

<b>Şekil No</b>	<b>Adı</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1</b>	Mikoplazmaların “sahanda yumurta” görünümlü tipik kolonisi	22
<b>Şekil 2</b>	16S rRNA dizilerine göre analiz edilen 22 Mycoplasma izolatı için komşu birleştirme yöntemi ile oluşturulan dendogram ve evrimsel ilişkileri	48



## ÖZET

**Kars Yöresinde Pnömonili Koyun Akciğerlerinden *Mycoplasma* Etkenlerinin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması**

Bu çalışmada, 2017-2018 yılları arasında Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerinden temin edilen pnömonili 250 koyun akciğeri ile sağlıklı görünümlü 30 koyun akciğer örneğinde Mikoplazma etkenlerinin kültürel ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Kültürel analizi Mycoplasma Agar ve Mycoplasma Broth besiyerlerinde yapılan pnömonili 250 koyun akciğerlerinin 26' sından (%10.4) etken izolasyonu gerçekleştirilirken bunların tümü cins spesifik PCR ile *Mycoplasma* spp. olarak tanımlandı. Sağlıklı görünümlü koyun akciğerlerinden etken izole edilemedi. 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonunu hedef alan primerlerin kullanıldığı tür spesifik PCR analizi ile örneklerin 12' si (%46.15) *Mycoplasma ovipneumoniae* ve 4' ü (%15.38) *Mycoplasma arginini* olarak tanımlandı. Örneklerin 2' sinde (%7.69) *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* eş zamanlı olarak belirlendi. *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan 8 (%30.76) izolat ise araştırılan türler (*M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*) yönünden negatif saptandı. Tanımlanan izolatlardan 22' sinin (%84.61) 16S rRNA geninin kısmi dizi analizi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi ve sekans sonrası izolatların 11' i *M. ovipneumoniae*, 4' ü *M. arginini* olarak tanımlandı. Tür spesifik PCR ile *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*' nin eş zamanlı belirlendiği 2 örnek ise sekansı sonrası *M. arginini* olarak tanımlandı. Cins spesifik PCR ile *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan 5 izolat ise sekans analizi sonucu *Mycoplasma bovis* olarak tanımlandı. Sonuç olarak, 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi sonrası 22 izolatın 11' i (%50) *M. ovipneumoniae*, 6' sısı (%27.27) *M. arginini* ve 5' i (%22.72) *M. bovis* olarak tanımlandı ve sekansı yapılan izolatların herbiri kendilerine özgü erişim numaraları ile NCBI veri bankasına kaydedildi. Tür spesifik PCR yöntemiyle tanımlanan *Mycoplasma* türleri ile 16S rRNA gen bölgesinin sekansı sonrası elde edilen türler büyük uyum içerisinde saptandı. 16S rRNA sekans analizine göre 22 *Mycoplasma* izolatı için komşu birleştirme yöntemi ile oluşturulan dendrogram ve evrimsel ilişki sonucu izolatların tamamının Hominis filogenetik grubu içerisinde yer aldığı ve *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* ve *M. bovis* olmak üzere üç temel kümede toplandığı görüldü. Bu kümelere bakıldığında *M. arginini* ve *M. bovis* izolatları iki ayrı filogenetik pozisyon almalarına rağmen birbirlerine olan yakınlıkları, *M. ovipneumoniae* izolatlarına olan filogenetik yakınlıklarından daha fazladır. Sonuç olarak, Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerinden temin edilen pnömonili koyun akciğerlerinde Mikoplazma prevalansı %10.4 olarak saptandı. Mikoplazma kaynaklı solunum sistemi hastalıklarının koyun yetiştiriciliği temelli ekonominin uygulanabilirlik ve sürdürülebilirliği üzerine olumsuz etkileri düşünüldüğünde bu çalışmada elde edilen Mikoplazma pozitifliği önemli ölçüdedir. Çalışmada, *M. ovipneumoniae* predominant tür olarak saptandı ve bunu *M. arginini* ve *M. bovis* izledi. Bu veriler koyun pnömonilerinde *M. bovis* ile ilgili ilk ulusal ve uluslararası

bildirimdir. Koyunlara ait çeşitli enfeksiyöz vakalardan *M. bovis genitalium*' un artan bildirimleri bu etkenin konak spektrumuna koyunların da eklenmesi gerekliliğini ortaya çıkardı. İzolasyon ve moleküler identifikasyon testlerinin beraber yürütüldüğü bu çalışmada bulgular mikrobiyoloji alanında modern teknolojinin son ürünü olan sekans analizi sonuçları ile büyük uyum gösterdi. Kolay ve ucuz erişim imkanı ve ergonomik oluşu ile dizi analizi yönteminin Mikoplazma etkenlerinin teşhisi ve filogenetik analiz çalışmalarında fayda sağlayacağı ve bu yöntemlerin konvansiyonel yöntemlere kolaylıkla entegre edilebileceği öngörülebilir.

**Anahtar Sözcükler:** Koyun, kültür, Mycoplasma, 16S rRNA sekans, PCR, pnömoni





**ABSTRACT****Investigation of *Mycoplasma* species in pneumonic sheep lungs by cultural and molecular methods in Kars, Turkey**

In this study, it was aimed to investigate *Mycoplasma* species by cultural and molecular methods in 250 pneumonic and 30 healthy appeared sheep lungs obtained from slaughterhouse and butcheries in Kars region between 2017 and 2018. *Mycoplasma* isolation was achieved in 26 (10.4%) of 250 sheep lungs with pneumonia in Mycoplasma Agar and Mycoplasma Broth media and all isolates were identified as *Mycoplasma* spp. by genus specific PCR. *Mycoplasma* spp. could not be isolated from the lungs of healthy-looking sheep. Species-specific PCR analysis using primers targeting the amplification of the 16S rRNA gene region identified 12 (%46.15) of the isolates as *Mycoplasma ovipneumoniae* and 4 (%15.38) as *Mycoplasma arginini*. *M. ovipneumoniae* and *M. arginini* were determined simultaneously in 2 (7.69%) of the samples. Eight isolates (30.76%) identified as *Mycoplasma* spp. were found to be negative for the investigated species (*M. ovipneumoniae* and *M. arginini*). The partial sequence analysis of the 16S rRNA gene of 22 (84.61%) of the identified isolates was performed successfully and 11 of the isolates were identified as *M. ovipneumoniae* and 4 as *M. arginini*. Two samples simultaneously identified as *M. ovipneumoniae* and *M. arginini* by species-specific PCR were further identified as *M. arginini* after the sequence analysis. Five isolates, identified as *Mycoplasma* spp. by genus-specific PCR, were identified as *Mycoplasma bovis genitalium* as the result of sequence analysis. As a result, after the sequence analysis of the 16S rRNA gene region, 11 (50%) of the 22 isolates were identified as *M. ovipneumoniae*, 6 (27.27%) as *M. arginini* and 5 (22.72%) as *M. bovis genitalium*. Each of the isolates was recorded in the NCBI database with their unique accession numbers. The species obtained after the sequence of the 16S rRNA gene region with *Mycoplasma* species identified by species-specific PCR are in great agreement. As a result of the dendrogram and evolutionary relationship generated by the neighboring joining method for the 22 *Mycoplasma* isolates by 16S rRNA sequence analysis, all of the isolates were found in the Hominis phylogenetic group and were collected in three main clusters as *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* and *M. bovis genitalium*. In these clusters, *M. arginini* and *M. bovis genitalium* isolates have two distinct phylogenetic positions, but their proximity to each other is higher than those for *M. ovipneumoniae* isolates. As a result, the prevalence of *Mycoplasma* in the pneumonic lungs obtained from slaughterhouse and butcheries in Kars region was found as 10.4%. When considering the material adverse effect of *Mycoplasma*-induced respiratory system diseases on the feasibility and sustainability of sheep breeding-based economy, the *Mycoplasma* positivity obtained in this study is not to be underestimated. *M. ovipneumoniae* was determined as predominant species and followed by *M. arginini* and *M. bovis genitalium*. These data are the first national and international reports on *M. bovis genitalium* in sheep pneumonia. The increased notifications of *M. bovis genitalium* from various infectious cases of sheep revealed

the necessity of adding sheep to the host spectrum of this species. In this study, where isolation and molecular identification tests were carried out together, the findings showed great agreement with the results of sequence analysis which is the final product of modern technology in microbiology. With its ergonomic features and easy and inexpensive accessibility, it can be predicted that the sequence method will be useful in the diagnosis and phylogenetic analysis of *Mycoplasma* agents and it can be predicted that this method can be easily integrated into conventional techniques.

**Key words:** culture, *Mycoplasma*, 16S rRNA sequence, PCR, pneumoniae, sheep



## GİRİŞ ve AMAÇ

Küçük ruminantlarda solunum sistemi hastalıkları dünyanın birçok ülkesinde yaygındır ve büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu kayıplar arasında ani hayvan ölümleri ilk sırada yer alır. ABD’ de 2009 yılındaki koyun ölümlerinin %4.8’ inin ve kuzu ölümlerinin %12.6’ sının pnömoni ve seyahat ateşi gibi solunum sistemi enfeksiyonlarından kaynaklandığı bildirilmiştir. Ani ölümlerin yanı sıra hayvanlarda persiste enfeksiyonlara bağlı verim kayıpları, hayvanların ıskartaya çıkarılması ve takiben kesime sevk edilmesi, artan işçilik ve işletme yönetim maliyetleri, koruma ve kontrol giderleri diğer önemli ekonomik kayıplar arasında sayılabilir (USDA 2010).

Küçük ruminantlarda solunum sistemi hastalıklarının etiyojisi çok faktörlü olup oldukça karmaşıktır. Bu hastalıklar arasında pnömonik pastörellozis olarak adlandırılan *Mannheimia haemolytica* enfeksiyonları özellikle yeni doğanlarda ve besi koyunlarında önemli yer tutmaktadır. *Pasteurella* spp., *Actinomyces* spp., *Haemophilus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve *Mycoplasma* spp. diğer enfeksiyöz bakteriyel etkenler arasında yer alırlar (Baysal ve Güler 1992, Tabatabayi ve ark. 1992, Otlu 1996). Mikoplazmalar içerisinde özellikle de *Mycoplasma ovipneumoniae*’ nin rolü çoğu zaman göz ardı edilmiş olmasına rağmen bu bakteri türü hem primer etken olurken hem de diğer bakteriyel ve viral enfeksiyonlara predispozisyon oluşturmaktadır. Atipik pnömoni veya enzootik pnömoni olarak adlandırılan *M. ovipneumoniae* enfeksiyonları yavaş ilerler ve kronik bir hastalık tablosu oluşturur. Bu hastalık tablosuna *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* ve *Mycoplasma agalactiae* adlı türlerin de dâhil olduğu bilinmektedir (Lefevre ve ark. 1987, Ayling ve ark. 2004).

Mikoplazma enfeksiyonlarında klinik belirtiler eşlik eden diğer çevresel ve biyolojik faktörlerin etkisiyle hafiften şiddetli solunum sistemi enfeksiyonlarına kadar değişebilir. Etkilenen koyunlarda yaygın gözükten klinik belirtiler kronik, inatçı ve yumuşak bir öksürük, göz ve burun akıntısı tablolarıdır. Enfeksiyonu takiben birkaç hafta sonra sürünün tamamı etkilenebilir ve hastalık nadiren ölümcül olduğu için tanı konulmadan sonlanır (Ayling ve ark. 2004).

Tür duyarlılığı açısından keçilere oranla daha dirençli olan koyunlarda Mikoplazma kaynaklı birçok solunum sistemi enfeksiyonu bildirilmiş ve özellikle de Türkiye ve diğer Orta Doğu ülkelerinde olduğu gibi karma yetiştiriciliğin yapıldığı hayvan sürülerinde Mikoplazma enfeksiyonlarının yeniden değerlendirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Kars yöresinde koyunlarda atipik pnömoninin etiyolojisi ve Mikoplazma enfeksiyonlarının yaygınlığı hakkında veriler olmasına rağmen sınırlı sayıdadır. Bu nedenle yapılan bu araştırmada, koyunlarda pnömoni vakalarında Mikoplazma etkenlerinin rolleri hakkında daha fazla bilgi edinmek ve Mikoplazma pnömonilerine özel bir vurgu yapmak amaçlanmıştır.

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Mikoplazmalar, Yunanca “mykes = mantar” ve “plasma = yapı” kelimelerinden köken alan ve bazı türlerinin filamentöz (mantar benzeri) doğasını ve pleomorfizme neden olan dış yapılarının esnekliğini ifade eden ve insanlar da dâhil olmak üzere birçok hayvan türünde hastalığa sebep olan, *Mollicutes* (Latince “mollis = yumuşak” ve “cutis = deri”) sınıfına ait en küçük prokaryot mikroorganizmalardır (Carter ve Chengappa 1991). Mikoplazmalar, hücre duvarı sentezleyen genlerden yoksundur ve bu nedenle hücre duvarı olmayan bakteriler olarak bilinirler. Mikoplazmalar, doğada insan ve hayvanların yanı sıra bitkiler, artropodlar, sürüngenler ve balıklar üzerinde parazit olarak yaygın bir şekilde bulunurlar. Bu bakteriler mukoz membranlara affinitesi olan hücre dışı parazitik etkenlerdir (Razin 1992, Razin ve ark. 1998).

Pleomorfizmin fazla olduğu *Mycoplasma* türlerinin pek çoğu insan, hayvan, insekt ve bitkilerde saptanmıştır. Hayvanlarda bulunan yaklaşık 200 kadar *Mollicute* arasından çoğunlukla *Mycoplasma* türleri patojendir. Ancak bu türlerin hastalıkların oluşumu ve şiddeti üzerine etkileri tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. Bunun başlıca nedeni *Mycoplasma* türlerinin kültür edilmesindeki zorluklar ve taksonomideki belirsizliklerdir. Bunlara ilaveten, bazı *Mycoplasma* türlerinin bir takım hastalıklarda sürekli olarak izole edilmeleri bu mikroorganizmaların bu hastalıklardaki gerçek önemini belirsiz kılmaktadır (Özen ve ark. 2009).

Koyun ve keçilerde *Mycoplasma* türleri birçok hastalık yapmaktadır. Etken ve konak arasındaki etkileşime bağlı olarak parazitizm ve kommensalizm şeklinde sonuçlanabilen Mikoplazma enfeksiyonlarının klinik seyri latent ve açık enfeksiyon şeklindedir. Eğer konağın genel veya lokal direnç durumu düşükse, konak ve Mikoplazma arasında kurulmuş olan kommensal ilişki tam bir parazitizme dönüşebilir. Örneğin subklinik bir Mikoplazmozis klinik bir Mikoplazmozise dönüşebilir veya tersi de olabilir (Erno 1987, Razin 1992, Razin ve ark. 1998).

Mikoplazma enfeksiyonları genellikle yetersiz havalandırma, bakım ve beslemenin yapıldığı kalabalık işletmelerde ortaya çıkar. Mikoplazmalar özellikle viral ajanlarla olmak üzere diğer parazitler ve klamidial etkenle ortak enfeksiyonlar şeklinde ortaya çıkarlar (Martin 1983, 1996).

Mikoplazma enfeksiyonları küçük ruminantlarda yaygın görülür ve özellikle keçilerde bu tür enfeksiyonlara sıklıkla rastlanır. Bazı *Mycoplasma* türleri bu hayvanlarda büyük ekonomik kayıplara yol açan şiddetli ve bulaşıcı hastalıklar oluşturur. *Mycoplasma* türlerinin yaptığı hastalıklar arasında kontagiyöz agalaksia, mastitis, arthritis, keratokojunktivitis ve pnömoni gibi hastalık tabloları sayılabilir. Kontagiyöz agalaksia yüksek mortaliteye sahip olmamasına rağmen morbiditesi %30-60 arasında değişebilmektedir (Madanat ve ark. 2001). Keçilerde pulmoner Mikoplazma enfeksiyonları sürü bazında çok yaygın ölümlere yol açmaktadır (Lefevre ve ark. 1987). Bu tür vakaların ağır seyretmesi ve tedavi imkânlarının yetersizliği veya güçlüğü nedeniyle fibrinli pnömoniler ve bu tür pnömonilere neden olan Mikoplazmalar ayrı bir öneme sahiptir. Öte yandan süt endüstrisinde mastitislerin önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu bilinen bir gerçektir.

Koyun ve keçilerde Mikoplazma enfeksiyonları Afrika, Yunanistan, Fransa, Hindistan, İsrail, Portekiz, İspanya ve ABD' de bildirilmiş ve bu etkenler morbidite ve mortalitesi %100' e varan olgulara yol açmıştır. Ülkemizde Mikoplazma enfeksiyonlarının araştırılmasına yönelik çalışmalar daha çok pnömoni vakalarından etken izolasyonu ve tanımlanması şeklinde yürütülmüştür (Baysal ve Güler 1992, Güler 1993, Hazıroğlu ve ark. 1996, Otlu 1996, Erken 2004, Kılıç ve ark. 2013).

## 1.2. Taksonomi

Mikroorganizmaların taksonomisi oluşturulurken klasifikasyon, nomenklatur ve identifikasyon esasları dikkate alınır ve temel taksonomik kategoriyi türler oluşturur. Prokaryot organizmaların taksonomisi kimyasal, serolojik ve genetik metotlarla belirlenir. Prokaryot organizmalar bu özellikleri dikkate alınarak, *Gracilicutes* (Şube 1), *Firmicutes* (Şube 2), *Tenericutes* (Şube 3) ve *Mendosicutes* (Şube 4) olarak 4 şubeye ayrılmıştır (Erno 1987).

**Tablo 1.** *Mollicutes* ' lerin sınıflandırılması (Razin ve ark. 1998).

Takım	Aile	Cins*	Ayırıcı özellikler	Konak
<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i> (11)	37 °C' de üreme	İnsan ve hayvanlarda
		<i>Ureaplasma</i> (7)	Üre hidrolizi	İnsan ve hayvanlarda
<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i> (6)	30 °C' de üreme	Böcek ve bitkilerde
		<i>Mesoplasma</i> (12)	37 °C' de üreme, %0.04 Tween gereksinimi	Böcek ve bitkilerde
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i> (45)	30-37 °C' de üreme, hareketli oluşu	Böcek ve bitkilerde
<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i> (14)	30-37 °C' de üreme	Hayvan ve bitkilerde
		<i>Phytoplasma</i> (8)		Böcek ve bitkilerde
<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i> (4)	Anaerob üreme	Rumende
		<i>Asteroplasma</i> (1)	Anaerob üreme	Rumende

\* Parantez içindeki rakamlar tür sayısını ifade etmektedir.

*Mollicutes* sınıfı hücre duvarı olmayan ve peptidoglikan tabakasını sentezleyemeyen *Tenericutes* (Şube 3) şubesi içerisinde yer alır (Erno 1987). Bu sınıf, *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* ve *Anaeroplasmatales* olmak üzere 4 takımdan meydana gelir (Tablo 1).

*Mollicutes* sınıfının bu dört takımı içerisinde evcil hayvanlarda enfeksiyondan sorumlu olanlar *Mycoplasma*, *Ureaplasma* ve *Acholeplasma* cinsleridir. Ruminantlarda enfeksiyondan sorumlu olan 4 farklı *Acholeplasma* türü vardır. Bunlar: *Acholeplasma axanthum*, *A. laidlawii*, *A. modicum* and *A. oculi* olarak adlandırılır. Ureaplasmalar içerisinde ise çiftlik hayvanlarında enfeksiyon oluşturan tek tür *Ureaplasma diversum* ' dur (Erno 1987).

*Mollicutes* sınıfı içerisinde evcil hayvanlarda en çok enfeksiyon oluşturan ve sayısı giderek artan *Mycoplasma* cinsidir. *Mycoplasma* cinsini diğer bakterilerden ayrılan birçok özelliği vardır (Tablo 2). Bu cins içerisinde küçük ruminantlarda enfeksiyon oluşturan farklı türler bulunmaktadır (Tablo 3) (Erno, 1987).

**Tablo 2.** Mikoplazmaları Öbakterilerden ayıran özellikler (Razin ve ark. 1998).

Özellik	Mikoplazma	Diğer Öbakteriler
Hücre Duvarı	Yok	Var
Plazma membranı	Çoğu türde kolesterol bulunur	Kolesterol yoktur
Genom Büyüklüğü	580-2.220 kb	1.050-10.000 kb
Genomun GC içeriği	%23-40 mol	%25-75 mol
rRNA operonlarının sayısı	1 veya 21	1-10
5S rRNA uzunluğu	104-113 nükleotid	114 nükleotid
tRNA genlerinin sayısı	30 ( <i>M. capricolum</i> ) 33 ( <i>M. pneumoniae</i> )	84 ( <i>B. subtilis</i> ) 86 ( <i>E. coli</i> )
UGA kodon kullanımı	<i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> , <i>Mesoplasma</i> 'da triptofan kodonu	Dur kodonu
RNA polimeraz	Rifampine dirençli	Rifampine duyarlı

### 1.3. *Mycoplasma* Türleri

Mikoplazmalar zor üreyen, hücre duvarı olmayan küçük bakterilerdir. Bu bakteriler insanlarda ve hayvanlarda çeşitli enfeksiyonlara yol açmaktadır. Koyun ve keçilerde de birçok *Mycoplasma* spp. izole edilmiştir, ancak sadece birkaç tanesi doğrudan hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Tablo 3).

Koyun ve keçilerde başta solunum yolu olmak üzere birçok sistemde enfeksiyona yol açan farklı *Mycoplasma* türleri bildirilmiştir (Tablo 3) (Lefevre ve ark. 1987). Bunlar içerisinde *M. ovipneumoniae* atipik pnömoniye yol açmakta ve hayvanları *Mannheimia* spp. ve Parainfluenza- 3 virüs enfeksiyonları gibi diğer patojenlere karşı predispozisyon yaratmaktadır (Nicholas ve ark. 2008). *M. arginini* koyun ve keçilerde tek başına enfeksiyon için yeterli olmasına rağmen *M. haemolytica* ile koenfeksiyon pnömoninin patolojisini şiddetlendirmektedir (Lin ve ark. 2008, Nicholas ve ark. 2008). Bunların yanı sıra koyun ve kuzularda solunum sistemim mukozası ve akciğerlerde *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *Mycoplasma bovis* ve *Mycoplasma agalactiae* gibi diğer *Mycoplasma* türleri saptanmıştır (Nicholas 2000, Loria ve ark. 2003, Ayling ve ark. 2004, Erken 2004).



### 1.3.1. *Mycoplasma ovipneumoniae*

*Mycoplasma ovipneumoniae*, birçok ülkede koyun ve keçilerde solunum sistemi enfeksiyonuna yol açan yaygın bir etkidir. İlk kez 1974 yılında Yeni Zelanda’ da izole edilen bu etken koyunlarda atipik nonprogresif pnömoni etkenidir. Bu *Mycoplasma* türü hastalıklı hayvanların akciğer, trakea, göz ve burunlarından izole edilirken sağlıklı hayvanların solunum sistemlerinde de saptanmıştır (Clarke ve ark. 1974). *M. ovipneumoniae*’ nın *P. haemolytica* biyotip A serotip ile sinerjik etki oluşturarak kuzularda kronik ve atipik pnömoni tablolarına yol açtığı bildirilmiştir. Mikoplazma pnömonisi bazı ülkelerde artan sıcaklığa paralel olarak yaz pnömonisi olarak da adlandırılır. Bulaşma, aerosollerin yayılması ve enfekte hayvanlarla yakın temas yoluyla gerçekleşir. *M. ovipneumoniae* tipik olarak yetişkin bir hayvanın burun boşluğuna yerleşir ve buradan genç kuzulara kolaylıkla yayılarak genellikle geçici ve hafif solunum sistemi hastalığına neden olur. Subklinik olarak enfekte koyunlar, nakliye, hava koşullarının kötüleşmesi, kötü beslenme veya diğer faktörler nedeniyle stres altına sokulduklarında akut pnömoni tablosu gelişebilir (Nicholas ve ark. 2008). Yalnız başlarına *M. ovipneumoniae* yüksek patojenik değildir. Fakat solunum yollarının normal siliyer aktivitesini etkilediği için ve lenfosit yanıtını baskıladığı için koyunları diğer solunum yolu enfeksiyonlarına meyilli hale getirebilmektedir (Nicholas ve ark. 2008, Shahzad ve ark. 2010). ABD’ de 1998 yılında, *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*’ nin beraber seyrettiği bir enfeksiyonda paroksizmal öksürüğe ilaveten kuzularda rektal prolapsus ve kilo kaybı bulguları gözlemlenmiştir. *M. ovipneumoniae* ve *P. haemolytica*’ nın beraber seyrettiği enfeksiyonlarda ise sıklıkla kronik atipik pnömoni ve düşük mortalite oranları bildirilmiştir (Niang ve ark. 1998).

Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda koyun ve kuzu pnömonilerinden sıklıkla *M. ovipneumoniae* tek başına izole edilirken *M. haemolytica*, PI3 virüs ve *M. arginini* ile beraber koenfeksiyonlarına da rastlanılmıştır (McAuliffe ve ark. 2003a, Parham ve ark. 2006, Sheehan ve ark. 2007, Lin ve ark. 2008, Nicholas ve ark. 2008). *M. ovipneumoniae* enfeksiyonları ABD, Avustralya, Yeni Zelanda ve İngiltere gibi dünyanın birçok ülkesinde endemik problemlere yol açmaktadır (Martin 1996). *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*’ nin sağlıklı koyun ve kuzuların akciğerlerinden de

izole edilmiştir (Alley ve ark. 1999). Türkiye’ de yapılan çalışmalarda koyun ve kuzularda pnömoni vakalarında *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* ve *M. agalactiae* türleri izole edilmiştir (Güler 1993, Erken 2004).

*Mycoplasma ovipneumoniae* kaynaklı enfeksiyonlarda koyun akciğerlerindeki lezyonlar kronik kataral bronşit ve bronşiolitis, alveolitisi ve bronşial obstrüksiyonu takiben atelektazidir (Hazıroğlu ve ark. 1996, Black ve ark. 1988, Sheehan ve ark. 2007). *M. ovipneumoniae* tarafından oluşturulan hastalık ilk kez kronik non-progresif pnömoni (CNP) olarak tanımlanmıştır (Alley 1975). Bunu takiben bu hastalık farklı isimlerle de anılmaktadır. Bunlar; kuzu pnömonisi, yaz pnömonisi, enzootik pnömoni, atipik pnömoni, ploriferatif eksudatif pnömoni, proliferatif interstisyel pnömoni ve koyun pulmonar adenomatozis şeklindedir. Hemen hepsi *M. ovipneumoniae* kaynaklı olan bu pnömoniler sezon dağılımı, hayvan yaş aralığı, coğrafya farklılığı ve olguların etiyolojik ve patolojik kompleksliği nedeniyle bu şekilde adlandırılmaktadır (Ionas 1983).

Non- progresif pnömoni olguları genellikle subklinik ve nadiren ölümcül olmasına rağmen bazı nedenlerden dolayı ekonomik öneme sahiptir. Koyun ve kuzularda plöral adezyon yaparak kalite kaybına, şiddetli olgularda ise et ve karkas ithalatında iptallere yol açmaktadır. Koyun ve kuzularda kilo kaybına dolayısıyla verim düşüklüğüne yol açmaktadır (Ionas 1983).

*Mycoplasma ovipneumoniae*, küçük ruminantlarda *P. multocida* ile birlikte seyreden, %20 oranında mortalite ve yüksek oranda morbidite ile karakterize atipik pnömoni tablolarına yol açmaktadır. Klinik bulgular öksürük, dispne, ateş ve depresyon şeklindedir. Postmortem lezyonlar torasik kavite ile sınırlıdır ve fibrinopurulent plöyrezi, perikardiyal kesede ve toraksta bol miktarda sıvı bulunur. Histopatolojide şiddetli suppuratif plöyrezi, yaygın suppuratif ve nekrozlu alveolitisi ve şiddetli nekrotize bronşiolitis gözlenir (Nicholas ve ark. 2008).

### 1.3.2. *Mycoplasma arginini*

Genellikle apatojen olarak bilinen bu tür koyun ve keçilerde değişik vücut bölgelerinden izole edilmiştir. Keratokonjunktivitis ve septisemi tablolarının yanı sıra pnömoni vakalarından sıklıkla izole edilen etkenler arasındadır. Hatta bazı çalışmalarda *M. ovipneumoniae*' ye oranla koyun pnömoni vakalarında *M. arginini* oranı daha fazla saptanmıştır (Fernandez ve ark. 2016, Di Provvido ve ark. 2017).

### 1.3.3. *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*

Keçilerde enfeksiyon oluşturan bir *Mycoplasma* türü olarak bilinmesine rağmen, koyun, sığır ve dağ keçilerinde de enfeksiyonlarına rastlanılmıştır. Etken alındığında akut veya perakut semptomlara yol açmakta ve septisemi sonrası eklemlerde şiddetli lezyonlar da oluşturabilmektedir (Lefevre ve ark. 1987).

**Tablo 3.** Küçük ruminantlarda başlıca *Mycoplasma* türleri ve hastalık tabloları (Lefevre ve ark. 1987).

Hastalık tablosu	<i>Mycoplasma</i> türleri	Açıklamalar
Bulaşıcı agalaksia	<i>M. agalactiae</i> <i>M. capricolum</i> <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> (LC)	Bu üç <i>Mycoplasma</i> türünün yaptığı semptomlar ve lezyonlar (keratit, konjunktivitis, mastitis) birbirinden ayırt edilemez <i>M. capricolum</i> ve <i>M. mycoides</i> aynı zamanda pnömotropiktir.
Bulaşıcı plöyrapnömoni	<i>Mycoplasma</i> spp. <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i> <i>M. arginini</i>	Keçilerde yaygındır ve kontagiyöz plöyrapnömoni (CCPP) etkenidir.
Değişik pneumopatiler	<i>M. ovipneumoniae</i> <i>Mycoplasma</i> spp. <i>Ureaplasma</i> spp.	Solunum sistemi en yaygın lokalize olduğu yerdir, fakat <i>M. arginini</i> değişik dokularda bulunabilir. Oküler lezyonlarda <i>M. ovipneumoniae</i> ve genital organlarda <i>Ureaplasma</i> türleri lokalize olmaktadır.
Bulaşıcı mastitis	<i>M. putrefaciens</i>	Mastitis, artrit veya keratit ile karakterizedir.
Oküler enfeksiyonlar	<i>M. conjunctivae</i> <i>A. oculi</i>	Keratokonjunktivitis yaparlar, fakat primer etken olup olmadığı bilinmiyor.
Genital organda lokalize olanlar	<i>Mycoplasma</i> spp.	Patojenitesi hakkında çok bilgi yok.
Saprofit olanlar	<i>A. laidlawii</i>	Mukoz membranların florasına lokalize olurlar.

### 1.3.4. *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*

İlk olarak Kenya' da izole edilen bu suş F38 tip Mikoplazmozis olarak adlandırılır. Etken, Keçilerin Kontagiyöz Plöyrapnömonisine (CCPP) neden olur.

CCPP, morbidite (%100) ve mortalitesi (%60-90) oldukça yüksek bir hastalıktır. Lezyonlar finrinöz plöyrapnömoni, akciğer hepatizasyonu ve plöyrezisi şeklindedir (Lefevre ve ark. 1987, Frey 2002).

### 1.3.5. Diğer *Mycoplasma* Türleri

*Mycoplasma agalactiae*, özellikle Akdeniz ülkeleri olmak üzere dünyanın birçok yerinde bildirilen ve koyun ve keçilerde kontagiyöz agalaksia olarak adlandırılan ve genel durum bozukluğu ile başlayıp süt veriminde azalma ve zamanla tamamen kesilmeye varan semptomlarla karakterize hastalığa yol açmaktadır. Bunun yanı sıra *M. agalactiae* enfeksiyonlarında şiddetli keratokonjunktivitis ve poliartritis tabloları da bildirilmiştir (Lefevre ve ark. 1987, Frey 2002).

*Mycoplasma conjunctivae*, koyun ve keçilerde konjunktivitis veya keratokonjunktivitise sebep olmakta ve sıklıkla göz ve nazofarinksten izole edilebilmektedir. Hastalık genellikle ılımlı seyrederek ve 1 hafta içerisinde kendiliğinden iyileşirken, şiddetli olgular bazen 1 ay kadar sürmektedir (Frey 2002, Gülmez Sağlam ve ark. 2018).

*Mycoplasma ovine/caprine* serogroup 11, özellikle koyunlarda vulvovajinitis, servisitisi, endometritis, epididimitisi ve ooforitisi gibi reproduktif bozukluklar yapmaktadır. Bu tür *M. bovis genitalium* ile benzer özelliklere sahip bakteri türü olarak bilinmektedir (Lefevre ve ark. 1987, Frey 2002).

*Mycoplasma putrefaciens*, sıvı besiyerinde üretildiğinde putrifikasyona bağlı ağır bir kokuşmaya neden olan bu tür koyun ve keçilerde artritis ve mastitis vakalarından izole edilmiştir (Peyraud ve ark. 2003).

## 1.4. Mikoplazmaların Biyokimyasal, Metabolik ve Kültürel Özellikleri

### 1.4.1. Biyokimyasal ve Metabolik Özellikleri

Mikoplazmaların taksonomik çalışmalarında sıklıkla kullanılan fenotipik belirleyiciler arasında metabolik özellikleri önemli rol oynarlar. Optimum koşullarda

Mikoplazmaların çoğu zayıf ve yavaş ürerler (Razin 1994). Doğada tanımlanan birçok *Mycoplasma* türünün metabolik çalışmalar ile 130' a yakın enzimatik aktivitesi belirlenmiş ve bir harita biçiminde derlenmiştir (Pollack ve ark. 1997).

Biyokimyasal olarak Mikoplazmaların metabolik olarak aktif olmalarına rağmen bu aktiviteleri zayıftır ve bu nedenle *Mycoplasma* türlerini karakterize etmede bu testlerin çok azı kullanılmaktadır. Glikoz fermantasyonu ve arjinin dekarboksilasyon testleri *Mycoplasma* türlerinin çoğunu ayırmak için kullanılan iki önemli testtir. Bu organizmaların birçoğu bu iki testten farklı şekillerde reaksiyon verebilmektedirler. Mikoplazmalar, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde ve pürinlerin (adenin ile guanin) biyosentezinde yer alan enzim genlerinden yoksundur. Dolayısıyla bu tür mikroorganizmaların aminoasitleri tamamen dışarıdan alması gerekir veya timidin fosforilaz ve timidin kinaz gibi alternatif yollardan temin ederler (Mitchell ve Finch 1977, 1979, Fraser ve ark. 1995, Himmelreich ve ark. 1996). Ayrıca Mikoplazmaların sitokromlarının eksikliği nedeniyle, adenozin trifosfat (ATP) üretilmesi temel olarak substratların fosforilasyonuna bağlıdır. Bu organizmaların pek çoğu ATP' yi glikolizis ile kazanırlar. *M. hominis* gibi türler de arjinin dekarboksilasyon yoluyla ATP elde ederler (Miles 1992).

*Mycoplasma* türleri içerisinde *M. ovipneumoniae* çok geniş ve farklı metabolik aktiviteye sahiptir. Glikoz ve N-asetilglikozamin metabolize edebilmelerine karşın, früktoz ve maltozu metabolizma etme aktivitesi değişkenlik gösterir. Ayrıca izopropanol metabolizması *M. ovipneumoniae* için bir indikatör olarak değerlendirilir (Miles ve Agbanyim 1998). Bu bakteriler için sayılan diğer metabolik aktivite hidrojen peroksit üretimidir ve virülans faktör olarak adlandırılır. Patel ve ark. (2008), tarafından yapılan bir çalışmada, *M. ovipneumoniae*' nin NADH ve/veya a- gliserol fosfat (aGP) gibi substratların oksidatif metabolizmasını takiben yüksek düzeyde hidrojen peroksit ürettiği gösterilmiştir.

#### 1.4.2. Üreme Gereksinimleri ve Kültürel Özellikleri

Mikoplazmalar, üremeleri için gerekli makromolekülleri sentezleme yetenekleri sınırlı olduğundan en iyi besiyerlerinde bile üremeleri oldukça zordur. Bu

nedenle Mikoplazmaların *in vitro* kültüründe sığır kalp infüzyon, pepton, maya ekstraktı ve serum içeren kompleks besiyerlerine ihtiyaç vardır (Razin 1991). Mikoplazmalar, konağın ekzojen yağ asitleri, amino asitleri, nükleik asit, lipit ve vitaminlerine bağımlıdır. Besiyerleri kolesterol, kolestanol ve ergosterol gibi sterol bileşiklerini içermesi gerekir (Rodwell ve Mitchell 1979).

Fermentatif Mikoplazmalarda glikoz temel enerji kaynağıdır. Bu mikroorganizmalar ayrıca maltoz, trehaloz, nişasta ve glikojeni kullanabilirler (Razin ve Freundt 1984). *M. bovis* ve *M. agalactiae* gibi nonfermentatif olanlarda glikozun yerini pürüvat alır (Miles ve ark. 1988). Pepton, besiyerine çeşitli polipeptit, dipeptit ve aminoasit ilavesi sağlar (Miles 1992). %5-20 oranlarında kullanılan hayvan serumları ise besiyerinin esansiyel lipit kaynağıdır. Serum ilavesi besiyerine yağ asitlerinin toksik olmayan formlarını ve Mikoplazmaların plazma membranının sentezi için gerekli kolesterolün sentezini sağlar (Razin ve ark. 1998). Kompleks Mikoplazmaların üretilmesinde besiyeri inorganik mineral tuzlar, nükleotitler ve vitaminlerce desteklenir. Sığır kalp infüzyonu ve maya ekstraktı besiyerine nükleotid, vitamin ve mineral tuzları sağlar. Hücre duvarı olmayan Mikoplazmalar hipo- osmotik ortamlara oldukça duyarlıdır. Dolayısıyla besiyerinde sodyum klorür gibi bileşenlere ihtiyaç duyarlar (Miles ve Agbanyim 1998).

**Tablo 4.** *Mycoplasma* türlerinin izolasyonunda kullanılan besiyerleri.

Bileşen	Hayflick	Friis	L' Ecuyer	SP4
Broth	PPLO	PPLO ve BHI	PPLO	PPLO
Protein	At serumu	At ve domuz serumu	Domuz serumu, mide musini, laktalbumin	Kazein, jelatin, fetal sığır serumu, maya ekstraktı, yeastolate
Sterol	Maya ekstraktı	Maya ekstraktı	Maya ekstraktı	
Karbonhidrat		DEAE dekstran	Penisilin, talyum asetat	
Antibiyotik		Basitrasin		Polimiksin B, amfoterisin B, penisilin
Diğer				CMRL 1066

PPLO; plöyrapnömoni benzeri organizma besiyeri, BHI; beyin- kalp infüzyon agar, Yeastolate; otolize mayanın suda eriyen kısmı, DEAE; dietilaminoetanol, CMRL 1066; aminoasit, nükleik asit ve vitamin içeren besiyeri.

Mikoplazmalar, 7-14 atm' lik ozmotik basınç altında ürerler ve optimal pH aralıkları pH 7-8' dir. Mikoplazmaların üremesinde oksijen önemli rol oynar. Oksijen miktarının artması üremeyi artırırken, mikroaerobik ve anaerobik üreyen *Mycoplasma* türleri de mevcuttur. *Mycoplasma* türleri farklı ısılarda (25-47 °C) gelişim gösterirler (Razin ve ark. 1998).

*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* ve *M. dispar* hariç patojenik *Mycoplasma* türlerinin birçoğu yapay besiyerinde kolaylıkla kültüre edilebilmektedir. *Mycoplasma* türlerinin izolasyonu için kullanılan besiyerleri genellikle sığır kalp infüzyonu, pepton, maya ekstraktı ve serum katkılı besiyerleridir (Razin 1991). Bu amaçla Eaton, modifiye Friis, Chanock ve Hayflick gibi farklı formülasyonlu birçok besiyerleri kullanılabilir. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* küçük koloni (SC) üretilmesinde ise PRM adlı besiyeri kullanılmaktadır. Kültüre edilecek örneklerde bakteriyel kontaminasyon olması, antibiyotik kalıntısının varlığı ve Akeloplasma gibi hızlı üreyen kontaminantların bulunması patojen türlerin izolasyonunda bazı stratejileri gün yüzüne çıkarmıştır. Bunlar arasında besiyerine talyum asetat ilavesi ilk başta gelir (Abu- Amero ve ark. 1996). Ayrıca Mikoplazmaların dirençli olduğu nisin gibi selektif inhibitörlerin besiyerine ilavesi de fayda sağlamaktadır (Tablo 4).

### 1.5. Mikoplazmaların Virülans Faktörleri ve Patogenezi

Mikoplazma enfeksiyonlarının patogeneğinde birçok virülans faktör rol oynar. Bunlar, karbonhidrat yapılı kapsül varlığı, hidrojen peroksit üretimi, T- hücre mitojen özelliği ve konak hücrelerden arjinini temizleme yeteneğidir (Bredt 1976).

Mikoplazmalar patojenik etkilere sahiptir, ancak patojeniteleri ve virülans faktörleri hakkında çok az bilgi vardır (McAuliffe ve ark. 2006). Mikoplazmalar bazı hayvan türlerine özellikle bazı organ ve dokular için spesifite gösterebilirler. Örneğin *M. arthritidis* fare ve kemiricilerde sinoviyal keselere affinite gösterir. Hayvan ve insanlarda görülen enfeksiyonlarda klinik tablo Mikoplazmalar hücre bileşenlerinin doğrudan toksik etkilerinden ziyade konakta yangısal ve bağışıklık yanıtına bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (Razin ve ark. 1998).

### **1.5.1. Mikoplazmaların Konak Hücreye Tutunması**

Mikoplazmalar yüzey parazitleri olarak kabul edilirler. kolonize olmaları ve takiben enfeksiyon için konak hücreye tutunmaları zorunludur. Mikoplazmalar genellikle ürogenital sistem ve solunum sisteminin epiteline kuvvetli bir şekilde yapışırlar (Razin ve ark. 1998). Çoğu *Mycoplasma* türü hücre dışındadır. Fakat *M. genitalium* maymunlarda böbrek hücrelerine tutunabilir (Jensen ve ark. 1994).

### **1.5.2. Mikoplazmaların Konak Hücre Membranına Etkisi**

Birçok prokaryot hücrenin aksine, Mikoplazmalar toksin üretimi yoktur. Mikoplazmaların metabolizması esnasında üretilen toksik etkili hidrojen peroksit ve superoksit serbest radikallerinin üretiminin konak hücre membranlarına oksidatif zarar verdiği saptanmıştır. *M. capricolum* türlerinin doku hasarının nedeninin toksik oksidan birikimi ve hidrolitik enzimler olduğu bildirilmiştir (Darzi ve ark. 1998).

### **1.5.3. Mikoplazmalarda Kapsül Varlığı**

Mikoplazmalarda kapsülün bulunması negatif yüklü yüzeylere bakterilerin geri dönüşümsüz bağlanmasını sağlayan bir faktör olarak kabul edilir. Bu özellik Mikoplazmaların patojenitesini artırır. Ayrıca kapsül, fagositoz ve toksik etkilere direnci artırarak bakterilerin patojenitesine katkı sağlar (Marshall ve ark. 1995).

### **1.5.4. Mikoplazmaların Klastojenik ve Onkojenik Özellikleri**

Süperoksit radikaller ile kombine Mikoplazmaların güçlü nükleazlarının klastojenik etkiler meydana getirdiği ortaya konulmuştur (Stewart ve ark. 1994). Ayrıca onkogeneziste Mikoplazmaların rolünün olabileceğine dair birçok çalışma mevcuttur (Wang ve ark. 1993, Tsai ve ark. 1995).

### **1.5.5. Mikoplazmaların Toksin Üretimi**

*Mycoplasma neurolyticum* ve *M. gallisepticum'* un nörotropik toksinler ürettiği bildirilmiştir. Bunun haricinde hücre duvarı olan klasik bakterilerden farklı



olarak, Mikoplazmaların patojenik türlerinin özel konak hücreleri etkileyen toksinlerinin nadiren bulunduğu bildirilmiştir (Tully 1983, Razin ve ark. 1998).

### 1.5.6. Mikoplazmaların Ekstrasellüler Enzimleri

Farklı aktivitelere sahip hücre dışı enzimlerin varlığı *Mollicutes*' lerde bildirilmiştir. Örneğin proteazlar, Mikoplazmaların konaktaki artritisi olgularının çoğundan sorumlu tutulmaktadır (Cole ve ark. 1985).

### 1.6. Mikoplazma Enfeksiyonlarının Epidemiyoloji

Mikoplazma kökenli pnömonilerde direkt temas sonrası etkenin bulaşması söz konusudur. Etken solunum ya da sindirim yoluyla vücuda alınır. Özellikle kalabalık yetiştirilen işletmelerde *Mycoplasma* türlerinin de yer aldığı diğer bakteriyel ve viral etkenleri içeren ortak enfeksiyonlar söz konusudur.

*Mycoplasma ovipneumoniae*, genellikle hayvanların birbiriyle yakın ve sürekli temas sonucu solunum yoluyla bulaşır. Sağlıklı ergin koyunların üst solunum yollarında sıklıkla bulunan Mikoplazmalar kuzularda enfeksiyonun temel kaynağını oluştururlar. Kuzular doğumu takiben birkaç gün içerisinde enfekte olurlar. Fakat enfeksiyon yavaş seyirli olduğu için genellikle sekonder bakteriyel enfeksiyonları takiben klinik belirtiler 5-10. haftalarda ortaya çıkar. *M. ovipneumoniae* enfeksiyonlarının morbiditesi değişken, mortalitesi daha düşüktür. Koyunlardaki pnömoni vakaları multifaktöriyel olup Mikoplazma kaynaklı enfeksiyonlar kronik veya akut enfeksiyonlar şeklinde gözlenebilir. Bazı hayvanlarda birkaç hafta içerisinde kendiliğinden iyileşme gözlenirken, bazılarında daha uzun süre devam edebilmektedir. Farklı kaynaklardan gelen koyunların bir arada yetiştirilmesi, enfekte olmayan hayvanların enfekte olanlarla karıştırılması veya farklı *M. ovipneumoniae* suşlarının bir araya gelmesinin etkisinin bir sonucu olarak bazen Mikoplazma enfeksiyonları salgınlar şeklinde gözlenebilmektedir (Ionas ve ark. 1991).

Morbiditesi %60-100 olan Bulaşıcı Keçi Plöyrapnömonisi (CCPP) hastalığında etken kontagiyöz olup bulaşma enfekte ajanları taşıyan damlacıkların solunum yoluyla alınması ile gerçekleşir (Thiaucourt ve Bölske 1996). Bulaşıcı

agalaksiada ise etken burun akıntısı, süt, dışkı, idrar vb. sekretlerle yayılmaktadır. Bulaşma etken ile direkt temas sonrası gerçekleşir. Buzağlarda kontamine sütün tüketilmesi ile sindirim yoluyla bulaşma söz konusudur. Hastalığın bulaşmasında asemptomatik taşıyıcı hayvanlar önemli rol oynar (Madanat ve ark. 2001).

### 1.7. Mikoplazma Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular

*Mycoplasma ovipneumoniae* enfeksiyonlarında klinik belirtiler ergin koyunlarda hafif olmasına rağmen kuzularda daha şiddetlidir. Bazı durumlarda ölümler son bulan enfeksiyonlarda akut fibrinöz pnömoni, konsolide lezyonlar, pulmonar apse ve plöyrizi gibi lezyonlar gözlenebilmektedir. Hayvanlarda ilk semptomlar öksürük, yüksek ateş, iştah azalması ve süt veriminde azalma şeklindedir. Yaklaşık bir haftalık periyotta sürüdeki tüm hayvanlar etkilenebilir. Hayvanların büyüme hızı ve karkas ağırlığı azalır. Esas klinik belirtiler kronik seyirli olup persiste ve düzensiz öksürük ve mukopurulent burun akıntısı şeklindedir. Diğer bakteriyel etkenlerin varlığı enfeksiyonu prognozunu ve klinik bulguları şiddetlendirir. Ayrıca *M. ovipneumoniae* bazı mastitis vakalarında ve keratokonjunktivitis olgularında da bildirilmiştir (Ayling ve ark. 2004).

#### 1.7.1. Kontagiyöz Agalaksia

Kontagiyöz agalaksia koyun ve keçilerde yaklaşık iki yüzyıldan beri bilinen bir hastalıktır. Mastitis, artrit, keratokonjunktivitis ve pnömoni ile karakterize olan bu hastalık *M. agalactiae* tarafından oluşturulur (Nicholas ve ark. 1998). İlk izolasyonu 1923 yılında Bridge ve Donatien tarafından yapılan bu etken aynı zamanda koyun ve keçilerde bildirilen ilk *Mycoplasma* türüdür (Bridre ve Donatien 1923). *M. agalactiae* hariç bulaşıcı agalaksiaya neden olan diğer üç *Mycoplasma* türü daha bildirilmiştir. Bunlar; *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (Mmm LC), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc) and *M. putrefaciens* (Mp) adlı türlerdir. Bulaşıcı agalaksia özellikle sütçü koyunlarda ve keçilerde bahar aylarında laktasyonu takiben görülen hastalıktır. Genç hayvanlar emme esnasında direkt enfekte olurken, ergin hayvanlar süt sağım makinaları ve hayvan altlıklarından enfekte olurlar. Enzootik seyreden hastalıkta, laktasyondaki hayvanlarda mastitis yaygınken,

erkeklerde, genç hayvanlarda ve laktasyonda olmayan hayvanlarda artrit, keratokonjunktivitis ve solunum problemleri görülmektedir (Madanat ve ark. 2001).

### 1.7.2. Kontagiyöz Keçi Plöyrapnömonisi (CCPP)

*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (eski ismi *Mycoplasma* F38) tarafından oluşturulan kontagiyöz keçi plöyrapnömonisi (contagious caprine pleuropneumonia, CCPP) keçilerde büyük ekonomik kayıplara yol açan bir hastalıktır. *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC ve *M. mycoides* subsp. *capri* türleri de CCPP' ye benzer plöyrapnömoni oluştururlar. *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* kaynaklı klasik CCPP kontagiyöz yapısı ve histopatolojisi ile diğer Mikoplazma enfeksiyonlarından ayırt edilebilmektedir. *M. m. mycoides* LC ve *M. m. capri* enfeksiyonlarında rastlanan interlobüler kalınlaşma yerine *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* enfeksiyonlarında akciğerlerde interstisyel intralobuler ödem görülmektedir. Naif sürülerde ilk enfeksiyon olgularında %80 mortalite ve %100 morbidite bildirilmiştir (Nicholas ve ark. 2008).

### 1.8. Mikoplazma Enfeksiyonlarının Patolojik Bulguları

*Mycoplasma ovipneumoniae* enfeksiyonlarında patolojik lezyonlar akciğerlerde tipik donuk kırmızı ventral alanlar ile başlar ve hava yollarında bronşiyolit tablosu eşlik eder. Lezyonlar kırmızı- gri alanlar şeklinde yaklaşık 2-3 hafta sürer ve plevral yapışmalar vardır (Alley ve ark. 1999). Histolojik olarak, lenf nodülleri ve bronşiyol epitelinin hiperplazisi ve alveolar septumda mononükleer hücre infiltrasyonu olmak üzere yaygın akciğer lezyonları görülür. Bronşiyoller ve damarların çevresinde lenfositik manşetler, çökmüş alveoller ve mononükleer hücreleri içeren eksudat vardır. Lenfoid hiperplazisi, hava yollarının etrafında geniş çaplı manşetlere yol açarak geçitlerin sıkışmasıyla sonuçlanabilir (Ruffin 2001).

*Mycoplasma ovipneumoniae*' nın kuzuların solunum yollarında silialara tutunduğu ve koyunların üst solunum yollarında kolonize olduğu bildirilmiştir (Niang ve ark. 1998). Mezbaha materyallerinden alınan akciğer örneklerinin oluşturduğu bir çalışmada kültürel ve immunohistokimyasal yöntemlerle %90' ında *M. ovipneumoniae*, %30' undan *M. haemolytica* ve Parainfluenza Virüs Tip 3 ve %2'

sinde *M. arginini* saptanmıştır. *M. ovipneumoniae* saptanan olguların büyük kısmında lenfoid manşetler rastlanmış olup bu bulgular Mikoplazma enfeksiyonları için patognomik sayılabilir niteliktedir (Sheehan ve ark. 2007). St. George ve ark. (1971), Mikoplazmozis şüpheli koyun akciğerlerinde septal hücrelerde proliferasyon, alveolar septumda lökositik infiltrasyon ve konsolide akciğerde nötrofil odakları bildirmiştir. Ayrıca Mikoplazma kaynaklı koyun akciğerlerinde alveol ve bronş epitellerinde hiperplazi, peribronşial foliküllerde hiperplazi, alveolar epitel hücrelerinde deskuamasyon ve proliferatif interstisyel pnömoni sıklıkla bildirilmiştir (Stipkovits ve ark.1973, Bolske ve ark. 1982).

### 1.9. Mikoplazma Enfeksiyonlarının Teşhis Metotları

Mikoplazma enfeksiyonlarında klinik bulgular diğer bakteriyel ve viral enfeksiyonlar ile karıştığı için ve akciğerlere ait patolojik bulgular patognomik olmadığı için sadece bu bulgulara bakılarak teşhisinin yapılması imkânsızdır. Bu nedenle kesin teşhis usulüne uygun olarak alınan ve transferi yapılan örneklerden etken veya spesifik antikorların aranmasına yönelik laboratuvar tekniklerine bağlıdır (Razin 1994, Nicholas 2000, Nicholas ve ark. 2008).

Deneysel olarak enfekte kuzularda serolojik yanıtlar tespit edilmiş olmasına rağmen saha titreleri çok daha düşüktür ve klinik önemi yoktur. Yaygın prevalansa sahip bölgelerde aynı hayvana ait ve belirli aralıklarla alınan çift serum örneklerinde artan antikor titresi aktif bir *M. ovipneumoniae* enfeksiyonunu göstermektedir (Razin 1994, Nicholas ve ark. 2008).

*Mycoplasma ovipneumoniae*' nın izolasyonu veya identifikasyonu hastalığın teşhisinde daha güvenilirdir. Fakat sağlıklı koyunlar da düşük seviyelerde *M. ovipneumoniae* varlığı göz ardı edilmemelidir. Bununla birlikte akciğerlerdeki Mikoplazma etken konsantrasyonunun ölçülmesi teşhis için yararlı olabilmektedir. (Nicholas 2000, Nicholas ve ark. 2008).

Çoğu *Mycoplasma* türünün aksine *M. ovipneumoniae* besiyerinde küçük merkezsiz koloniler oluşturur. Ancak teşhisin üreme inhibisyonu testi gibi serolojik

veya PCR gibi moleküler tekniklerle doğrulanması gerekir. PCR (McAuliffe ve ark. 2003b), 16S rDNA- PCR ve denatüre gradyan jel elektroforezi (McAuliffe ve ark. 2003a, 2005) gibi moleküler yöntemler çoklu Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde hızlı ve güvenilir imkânlar sunmaktadır. Ayrıca, TSB- 1 olarak adlandırılan ve ruminant peptonundan yoksun üretilen yeni bir besiyerinin varlığından da bahsedilmektedir. Bu besiyerinin Mikoplazmaların dokudan izole edilmesinde avantaj sağladığı ve antijen veya aşı üretiminde Mikoplazma kültürlerinde verimliliği artırdığı bildirilmiştir (Patel ve ark. 2008).

### 1.9.1. Örneklerin Alınması

Klasik bakteriyolojik yöntemler, Mikoplazma etkenlerinin izolasyonunda kullanılmak üzere örnek alınması esnasında uygulanabilmektedir (Tablo 5). Teşhis için canlı hayvanlardan alınabilecek uygun örnekler arasında serum, burun svabı, kulak svabı veya bronkoalveolar lavaj sayılabilir (Nicholas ve Baker 1998). Sheehan ve ark. (2005) tarafından *M. ovipneumoniae* ve *M. haemolytica*'nın başarılı bir şekilde izolasyonunu sağlayan yeni bir transtrakeal bronkoalveolar lavaj tekniği de tarif edilmiştir. Fakat bu yöntemin uygulanış zorluğu kullanım alanını kısıtlamaktadır. Süt ve sinovial sıvı değerlendirilecekse örneklerin taze olarak alındığından emin olmak gereklidir. Kulak ve burun örneklerinin alınmasında svap kulak veya burun kanalına derince sokularak, göz örneklerinin alınmasında ise svap konjunktivanın yüzeyine hafifçe sürülerek alınabilir. Akciğer lavajı teknikleri alt solunum yollarında Mikoplazmaların yerleşip yerleşmediğinden emin olmak için uygulanır. Alternatif bir yaklaşım olarak uygulanan bu yöntemde akciğer yıkantısı kullanılır. Ölü hayvanlardan ise sağlıklı ve hastalıklı dokuyu bir arada barındıran akciğer ve plevral sıvının örneklenmesi arzu edilir (Thomas ve ark. 2002).

**Tablo 5.** Ruminantlarda *Mycoplasma* türlerinin izolasyonu için örnekleme teknikleri (Thomas ve ark. 2002).

Türler	Üreme	Konak	Canlı hayvandan alınan örnekler	Ölü hayvanlardan alınan örnekler
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	İyi	Sığır	Burun sıvabı, bronkoalveoler yıkantı, plöyra sıvısı	Akciğer lezyonları, plöyra sıvısı, bronkopulmonar lenf nodülleri
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	Zor	Keçi	Burun ve kulak svapları	Akciğer lezyonları, plöyra sıvısı, mediastinal lenf nodülleri
<i>M. agalactiae</i>	İyi	Koyun, keçi	Süt, eklem sıvısı, göz, burun ve kulak svapları	Meme ve beraberindeki lenf nodülleri, eklem sıvısı, akciğer lezyonları, beyin
<i>M. bovis</i>	İyi	Sığır	Burun ve göz svapları, eklem sıvısı, süt, bronkoalveoler yıkan	Akciğer lezyonları, eklem sıvısı, meme ve beyin
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> LC	İyi	Keçi	Süt, eklem sıvısı, göz ve burun svapları	Meme ve beraberindeki lenf nodülleri, eklem sıvısı, akciğer lezyonları
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	İyi	Keçi, koyun	Süt, eklem sıvısı, göz ve burun svapları	Meme ve ekli lenf nodülleri, eklem sıvısı, akciğer lezyonları
<i>M. dispar</i>	Zor	Sığır	Burun svabı, bronkoalveolar yıkantılar, plöyra sıvısı	Akciğer lezyonları
<i>M. bovigentialium</i>	İyi	Sığır, koyun	Vulvovajinal svaplar, reproduktif kanal akıntıları, süt, sperma	Endometriyum ve diğer
<i>M. conjunctivae</i>	Zor	Koyun, keçi	Göz svabı	Göz svabı
<i>M. putrefaciens</i>	İyi	Keçi	Süt	Meme ve lenf lenf nodülleri
<i>M. ovipneumoniae</i>	Değişik	Koyun, keçi	Burun svabı, bronkoalveolar yıkantılar, plöyra sıvısı	Akciğer lezyonları, plöyra sıvısı, bronkopulmonar lenf nodülleri
<i>M. canis</i>	İyi	Sığır	Burun svabı, bronkoalveolar yıkantılar, plöyra sıvısı	Akciğer lezyonları, plöyra sıvısı, bronkopulmonar lenf nodülleri

### 1.9.2. Örneklerin Taşınması

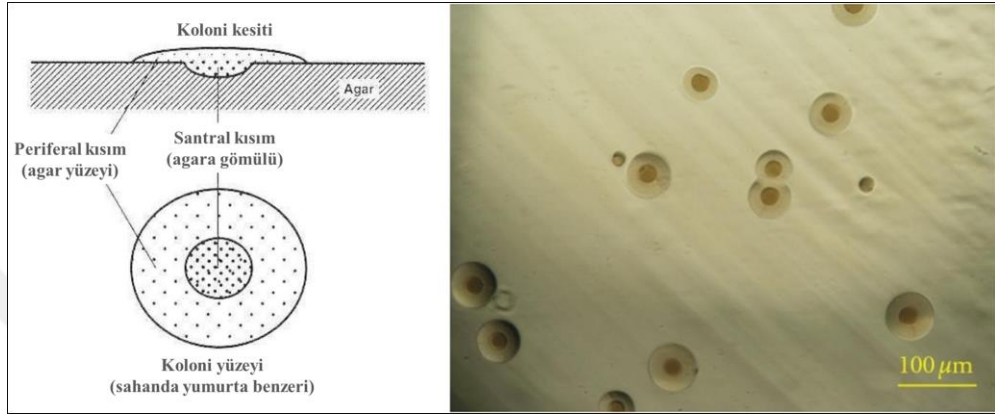
Örnekler alındıktan sonra laboratuvara 4 °C' de soğuk zincire dikkat edilerek kısa sürede taşınmalıdır. Kültürel işlemler hemen yapılmayacaksa, örneklerin tamamı veya bir kısmı derin dondurucuda saklanmalıdır. Bu durumda Mikoplazmalar birkaç ay canlı kalırlar. Uluslararası taşınmada derin dondurucuda taşımak mümkün olamayacağından örnekler liyofize edilmelidir (Nicholas ve ark. 2008).

### 1.9.3. *Mycoplasma* Türlerinin İzolasyonu

Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde PCR ve benzeri modern yöntemler faydalı bilgiler sunmasına rağmen etken izolasyonu, identifikasyonu ve kültürü halen altın standardını korumaktadır. Mikoplazmaların izolasyonunda uygun numunelerin seçiminin yanı sıra izolasyonda kullanılan besiyerleri, numunelerin işlenmesi ve kültür prosedürü oldukça önemli ve kritik aşamadır.

Mikoplazmaların izolasyonu amacıyla kullanılacak sıvı numunelerin (plöyra sıvısı, burun eksudatı ve sinovial sıvı vb.) on katlı alt dilüsyonları hazırlandıktan sonra uygun besiyerlerine ekimleri yapılır. Sıvı örneklerin yanı sıra kompakt doku örnekleri makasla küçük parçalara ayrıldıktan sonra homojenizatörle iyice parçalanır ve steril tampon solüsyonlar içerisinde sulandırılan (%10 oranında) homojenatlar kullanılır. Tüm bu örneklerinin on katlı dilüsyonları hazırlanarak besiyerlerine ekimler yapılır. Besiyerine ekim işlemi katı besiyerine her bir örnekten birkaç damla damlatılıp yayılarak ve sıvı besiyerine %10 oranında katılarak gerçekleştirilir. Ayrıca akciğer veya lenf nodülünün kesit yüzeyi direkt katı besiyerine sürülerek de ekim yapılabilir. Göz, kulak ve burundan alınan svap örnekleri katı besiyerine direkt sürülerek ekim yapılabilir. Ekimi takiben sıvı ve katı besiyerleri 37 °C' de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılır. Sıvı besiyerlerinin günlük üreme ve pH kontrolleri yapılır. İnkübasyonu takiben sıvı besiyerinde 24 saat içerisinde oluşan yoğun bulanıklık kontaminasyon olarak değerlendirilir. Mikoplazmaların sıvı besiyerinde üremeleri inkübasyonun 3 ile 5. günlerinde çok ince bir tabakası ve opalesans olarak adlandırılan bir üreme alanı şeklinde belirginleşir. Katı besiyerlerinde kültüre edilen Mikoplazmalar ise 35-100' lük objektiflerde

inkübasyonu takiben 2-3 gün aralıklarla tipik “sahanda yumurta” morfolojili kolonilerin varlığı yönünden incelenir (Şekil 1). *M. mycoides* kümesinin tüm üyeleri yaklaşık 3 gün içerisinde ürerler ve yaklaşık 1-3 mm çaplı koloniler oluştururlar. Fakat koloni morfolojisi ve boyutları besiyerinin türüne ve inkübasyon süresine göre değişiklik gösterebilmektedir (Razin 1994, Otlu 1996, Nicholas ve ark. 2008).



**Şekil 1:** Mikoplazmaların “sahanda yumurta” görünümlü tipik kolonisi. Sol: Şematik görünüm (Anonim 1); Sağ: Katı besiyerinde Mikoplazma kolonisinin gerçek görünümü (Anonim 2).

### 1.9.3.1. Mikoplazma Subkültürleri

İzole edilen bakterilerin identifikasyon testlerinin yapılabilmesi ve bakterilerin canlılıklarını sürdürebilmesi için bakterilere ait kolonilerin saflaştırılması ve dolayısıyla subkültürlerinin yapılması gereklidir. Sıvı besiyerinde hazırlanan kültürler yaklaşık 3 haftalık inkübasyondan sonra pasajlanması gerekir. Katı besiyerlerindeki kültürler ise bir haftadan fazla inkübe edilmemelidir. Sıvı besiyerinden tekrar sıvı besiyerine pasaj yapılırken kültür içeriğinin yaklaşık %10’ u taze besiyerine inoküle edilirken sıvı besiyerinden katı besiyerine pasajda ise bir damla (25 µl) kültür damlatılarak besiyerine yayılır. Katı besiyerinden sıvı besiyerine pasaj yapılırken koloninin bulunduğu besiyeri kısmı steril bisturi ile kesilerek besiyerine aktarılır. Bireysel kolonilerin Pastör pipeti veya pipet ucu ile alınıp aktarılması da mümkündür. Katı besiyerinden tekrar katı besiyerine pasajda ise koloniye içeren besiyeri kesilir ve üst yüzü yeni besiyerine sürülerek ekim yapılır (Razin 1994, Otlu 1996, Nicholas 2000, Nicholas ve ark. 2008).



Mikoplazmalara ait olduğu düşünölen koloniler elde edildikten sonra konvansiyonel, biyokimyasal, immünolojik testler ve moleküler tekniklerle identifikasyon gerçekleştirilir (Poveda ve Nicholas 1998).

#### 1.9.4. *Mycoplasma* Türlerinin İdentifikasyonu

##### 1.9.4.1. Fenotipik İdentifikasyon

*Mycoplasma* türlerinin fenotipik identifikasyonunda çeşitli biyokimyasal ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Serolojik tekniklerde tür spesifik antiserumlar ile teşhis yapılırken, birçok biyokimyasal aktivitenin değerlendirildiği biyokimyasal identifikasyon nispeten daha verimli bilgiler sunmaktadır. Biyokimyasal testlerin dezavantajı ise tanımlanmasının zaman alıcı olması ve yorumlanmasının zorluğudur. Son zamanlarda bu iki yöntemle kıyaslandığında kısa zamanda ve güvenilir sonuçlar veren PCR metodu geliştirilmiştir (Lefevre ve ark. 1987, Amores ve ark. 2010).

##### 1.9.4.1.1. Biyokimyasal İdentifikasyon

*Mycoplasma* türlerinin biyokimyasal identifikasyonuna başlamadan önce izolatların mutlak suretle subkültürlerle saflaştırılması oldukça önem taşımaktadır.

**Tablo 6.** *Mycoplasma* cinsinin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler (Erno 1987).

<i>Mycoplasma</i> türü	GFT	AHT	FA	F/S	KS	TA (O <sub>2</sub> )	RA (CO <sub>2</sub> )
<i>M. c. capripneumoniae</i>	+/-	-	-	-	+	Değişken	Zayıf +
<i>M. m. mycoides</i> LC	+	-	-	-	+	+	+
<i>M. m. capri</i>	+	-	-	-	+	+	+
<i>M. capricolum</i>	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. ovipneumoniae</i>	+	-	-	-	-	Değişken	+
<i>M. conjunctivae</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. agalactiae</i>	-	-	+	+	-	+	+
<i>M. putrefaciens</i>	+	-	+	+	-	Değişken	+
<i>M. arginini</i>	-	+	-	-	-	-	+

GFT: Glikoz fermentasyon testi, AHT: Arjinin hidroliz testi, FA: Fosfataz aktivitesi, F/S: Film ve spor oluşumu, KS: Kazein sindirimi, TA: Tetrazolium aktivitesi, RA: Redüksiyon aktivitesi

Akholeplazmaların aksine Mikoplazmalarda dijitonin duyarlılık testinin yapılması zorunludur. Glikoz fermentasyonu, arjinin ve üre hidrolizi, tetrazolyum klorid redüksiyonu, kazein sindirimi, fosfataz aktivitesi ve film ve spot oluşturması gibi biyokimyasal testler genellikle *Mycoplasma* türlerinin tanımlanmasında faydalanılan tekniklerdir (Tablo 6) (Poveda ve Nicholas 1998).

#### 1.9.4.1.2. Serolojik İdentifikasyon

Serolojik teknikler, Mikoplazmaya karşı oluşan antikorların ya da Mikoplazma antijenlerinin saptanmasını sağlar. Ancak bu testler yapılırken farklı *Mycoplasma* türlerine karşı oluşan çapraz reaksiyonları minimize edilmelidir. Direkt ve İndirekt İmmüno Floresan Testler *Mycoplasma* türlerinin tanımlanmasında oldukça başarılıdır (Razin ve ark. 1998). Mikoplazmaların identifikasyonunda kullanılan diğer serolojik testlere Üreme İnhibisyon Testi (GIT), Agar Jel Presipitasyon Testi (AGPT), İndirekt Hemaglutinasyon Testi (IHA), ELISA (cELISA, iELISA), Floresan Antikor Testi (FAT), Lateks Aglutinasyon Testi (LAT) ve Komplement Fiksasyon Testi (KFT) örnek olarak verilebilir (Carmichael ve ark. 1972, El Mahi ve Nayil 1978, Sikdar 1979).

Carmichael ve ark. (1972), Komplement Fiksasyon Testi, Üreme İnhibisyon Testi, Metabolik İnhibisyon Testi ve Glikoz Fermentasyon Testi, Arjinin Hidroliz Testi ve Tetrazolium Hidroklorid Testi gibi biyokimyasal testleri Mikoplazmaların identifikasyonu ve karakterizasyonunda kullanmışlardır.

Sudan' da El Mahi ve Nayil (1978), pnömonik koyun akciğerlerinden Mikoplazma etkenlerinin identifikasyonu amacıyla Üreme İnhibisyon Testi ve Metabolik İnhibisyon Testlerini kullanmışlar ve biri hariç tüm suşlar *M. mycoides* var *capri* ve *M. mycoides* var *mycoides* antiserumu ile reaksiyon vermezken, *M. arginini* antiserumu ile kuvvetli reaksiyon vermiştir.

Sikdar (1979), farklı *Mycoplasma* izolatlarının saptanması amacıyla Disk Üreme İnhibisyon, IHA, KFT, Karşı İmmünoelektroforez (CIE) ve Epi-immünofloresansın testlerini kullanmışlar ve Disk Üreme İnhibisyon Testini en basit

ve sensitif test olarak bulmuştur. CIE ile hızlı sonuç elde edilirken, Epi-immüno Floresansın izolatların hızlı tanımlanması için oldukça spesifik bulunmuştur.

#### 1.9.4.2. Kültür Dışı Yöntemler

Kültürü zor ve zahmetli olan Mikoplazmaların tespiti ve tür ayrımı için hücre kültür sistemleri, çeşitli immunofloresan boyama yöntemleri ve elektron mikroskopisi kullanılmaktadır. Bu tekniklerle hücelere tutunan veya serbest haldeki Mikoplazma etkenleri tespit edilebilmektedir. *Mycoplasma* türlerinin identifikasyonunda indikatör hücre kültür teknikleri ve bu amaçla Vero ya da NIH 3T3 gibi hücre kültür dizileri kullanılmaktadır. Mikoplazmaların varlığı tutunduğu hücrelerde tipik sitopatik etkinin tespit edilmesiyle, nonspesifik DNA boylarıyla veya immunofloresan gibi spesifik boylarla hücre membranına tutunan Mikoplazmaların gösterilmesiyle ortaya konmaktadır. Mikoplazma ile kontamine olan hücre kültürlerinin gösterilmesi için bisbenzimidazole DNA boyama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem hücreye tutunma özelliğinde olan Mikoplazmaların gösterilmesinde en etkili, basit ve ucuz nonspesifik bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Diğer DNA boyama yöntemleri, 4-6 Diamidinofenilindol (DAPI) boyası, olivomisin floresan boyası, konjuge benzoksazin kanamisin floresan boyasıdır. Klasik histolojik boylardan Hematoksilin- Eozin, Giemsa, May-Grünvald- Giemsa, hipotonik orsein ve akridin turuncusu floresan boyları enfekte hücre kültürlerinde Mikoplazmaları tespit etmek için kullanılmaktadır. Boyalı preparatlarda Mikoplazmalar küçük, mikroskopik beneklenmeler şeklinde hücre membranında birikmiş olarak tespit edilirler. Bu boylar yalnızca hücelere tutunan Mikoplazmaların gösterilmesinde etkili olmaktadır. İmmunofloresan boyama, türe özgül antikorun floresan boya ile konjuge edilerek hücre kültürlerinde kontaminasyonunun hızlı bir şekilde ortaya konulmasını sağlayan bir yöntemdir. Spesifik immunofloresan boyama, primer olarak Mikoplazmaların tür ayrımında kullanılmaktadır. Elektron mikroskobu özellikle Mikoplazma- hücre etkileşimini incelemek için faydalandır. *M. pulmonis* gibi bazı Mikoplazmaların hücre membranına tutunmalarıyla oluşan başlangıç enfeksiyonuna ait en erken belirtiler elektron mikroskobuyla saptanabilmektedir (Karaarslan ve Özsan 1998).

### 1.9.4.3. Moleküler İdentifikasyon

Mikoplazmaların identifikasyonunda kullanılan morfolojik, biyokimyasal ve serolojik teknikler faydalı bilgiler sunmasına rağmen, besiyerlerine seçicilik kazandırmada birtakım zenginleştirme adımlarını içermesi, kültürünün zor ve zahmetli olması, serolojik testlerin çapraz reaksiyon vermesi ve genetik benzerliği çok yakın olan suşların ayırt edilememesi gibi bu tekniklerin birçok dezavantajı bildirilmiştir. Ayrıca, bu klasik tekniklerde genellikle emek yoğun olup kullanışlı ve yararlı hale getirilmesinde çaba harcamak gerekmektedir (Razin ve ark. 1998).

Mikrobiyoloji alanında kullanılan gelişmiş moleküler teknikler, biyolojik popülasyonların genetik dönüşümlerini saptamak, suşları karakterize ederek tanımlamak ve sınıflandırmak, türleri teşhis ve identifiye etmek için oldukça etkili ve zengin olanaklar sunmaktadırlar. Geleneksel yöntemlerle doğru teşhis ve identifikasyon için kompleks besiyerine ihtiyaç duyulması, yavaş üreyen ve tanımlanması uzun zaman alan *Mycoplasma* tür ve alt türlerinin sayısının sürekli artması klasik tiplendirme yöntemlerinin ayırma gücünü ve etkinliğini sınırlamaktadır. Dolayısıyla birçok moleküler yöntem Mikoplazmaların teşhisinde ve genetik karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Tablo 7) (Razin ve ark. 1998).

#### 1.9.4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İlk olarak 1983 yılında ABD’ de geliştirilen yöntem, nükleik asitlerin *in vitro* koşullar altında çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR reaksiyonu, DNA’ nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sırasıyla sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA’ ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA’ ların sentezi) ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır. PCR tekniğinin otomasyonu, her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılım programları doğrultusunda gerçekleştiren gradient ısı cihazı adı verilen PCR cihazları yardımıyla sağlanmaktadır (Kahya ve ark. 2013). Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde de farklı hedef gen bölgelerinin kullanıldığı çok sayıda PCR tekniği bildirilmiştir (Tablo 9).

### 1.9.4.3.1.1. Gerçek Zamanlı PCR (Real- Time PCR)

Nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş; LightCyler (Roche), TaqMan (PE Biosystem), iCycler (BIO- RAD) gibi birçok farklı cihaz sistemi bulunmaktadır. Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde başta 16S rRNA ve ilgili gen bölgelerinin analiz edildiği real- time PCR teknikleri bildirilmiştir (Tablo 8) (Nicholas ve ark. 2008).

**Tablo 7.** Mikoplazmaların tanımlanmasında kullanılan moleküler teknikler (Nicholas ve ark. 2008).

<i>Mycoplasma</i> türü	Tiplendirme metodu	Kaynak
<i>M. mycoides</i> SC	VNTR	McAuliffe ve ark. 2007
	MLSA	Lorenzon ve ark. 2003
	AFLP/PFGE	Kusiluka ve ark. 2001
	SDS PAGE	Goncalves ve ark. 1998
	İmmunblotting	Poumarat ve Solsona 1995
	IS 1296 analizi	Cheng ve ark. 1995
	IS analizi	Westberg ve ark. 2002
<i>M. mycoides</i> LC	Bgl REA	Vilei ve Frey 2004
	LppA REA	Monnerat ve ark. 1999
<i>M. sp. bovine</i> grup 7	Genomik DNA'nın REA analizi	Djordjevic ve ark. 2001
<i>M. c. capripneumoniae</i>	16S rDNA sekanslama	Pettersson ve ark. 1998
	H2 sekanslama	Lorenzon ve ark. 2003
	AFLP/PFGE	Kusiluka ve ark. 2001
	PFGE/SDS PAGE	Tola ve ark. 1996
<i>M. agalactiae</i>	RAPD/VNTR	McAuliffe ve ark. 2008
	IS analizi	Pilo ve ark. 2003
	P40 adezin analizi	Fleury ve ark. 2002
	16S rDNA sekanslama	Konigsson 2002
	AFLP/RAPD/PFGE	McAuliffe ve ark. 2004
<i>M. bovis</i>	IS analizi	Parham ve ark. 2006
	16S rDNA sekanslama	Konigsson 2002
<i>M. ovipneumoniae</i>	Vsp analizi	Beier ve ark. 1998
	RAPD/PFGE	Parham ve ark. 2006
<i>M. gallisepticum</i>	RAPD/PFGE	Ley ve ark. 1997
	Gen sekanslama	Ferguson ve ark. 2005
	PvpA'nın REA analizi	Liu ve ark. 2001
<i>M. synoviae</i>	AFLP	Hong ve ark. 2005
	PFGE/RAPD	Marois ve ark. 2001
	AFLP	Feberwee ve ark. 2005
	vlhA'nın sekanslanması	Hong ve ark. 2004
<i>M. hyopneumoniae</i>	AFLP/RAPD	Stakenborg ve ark. 2006
	PFGE	Stakenborg ve ark. 2005
	P146'nın sekanslanması	Mayor ve ark. 2008
	Adezin genlerinin VNTR analizi	De Castro ve ark. 2006
<i>M. conjunctivae</i>	LppS sekanslama	Belloy ve ark. 2003
<i>M. cynos</i>	RAPD/PFGE	Mannering ve ark. 2009

### 1.9.4.3.1.2. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm- PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism- PCR)

Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm- PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)- PCR) olarak da adlandırılan bu yöntemde genomik DNA' dan restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen parçacıkların PCR ile amplifikasyonu yapılır. Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA' lar (adaptör) eklenir. Eklenen sentetik DNA' ların nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA' lar yani primerlerin kullanımıyla nispeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Üretilen parçacıklar bir baz uzunluğu farklarını dahi ayırt edebilen poliakrilamid jel üzerinde hareket ettirilerek farklı genotiplere ait parçacıklar tespit edilir. Geliştirilen AFLP skorum programları, oluşan DNA fragmentlerinin matematiksel olarak ifade edilmesini sağlamaktadır. Bu şekilde oluşturulan veri bankaları, hem verilerin yorumlanmasını kolaylaştırmakta hem de sonuçların global karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Ayırım gücü oldukça yüksek olan bu teknik çoğu *Mycoplasma* türlerinin identifikasyonunda başarıyla kullanılmıştır (Kusiluka ve ark. 2001, Kokotovic ve ark. 2002, McAuliffe ve ark. 2004, Boettger ve Dohms 2006).

**Tablo 8.** *Mycoplasma* türlerinin teşhisinde kullanılan PCR yöntemleri ve hedef gen bölgeleri (Nicholas ve ark. 2008).

<i>Mycoplasma</i> türü	Hedef gen	Kaynak
<i>M. mycoides</i> SC	IS1296/8.8kb delesyon bölgesi	Miles ve ark. 2006
<i>M. mycoides</i> SC/LC/capri	Cap21	Bashiruddin 1998
<i>Mycoides</i> kümesi	Cap21	Bashiruddin 1998
<i>M. sp. bovine</i> grup 7	Glk	Woubit ve ark. 2007
<i>M. c. capricolum</i>	gts	Frey ve ark. 1998
<i>M. c. capripneumoniae</i>	LppA	Monnerat ve ark. 1999
<i>M. agalactiae</i>	Adi	Woubit ve ark. 2007
<i>M. bovis</i>	urvC	Subramaniam ve ark. 1998
<i>M. ovipneumoniae</i>	urvC	Subramaniam ve ark. 1998
<i>M. bovis genitalium</i>	16S	McAuliffe ve ark. 2003b
<i>M. conjunctivae</i>	16S	Parham ve ark. 2006
<i>M. putrefaciens</i>	16S	Giacometti ve ark. 1999
<i>M. canis</i>	lppS	Belloy ve ark. 2003
<i>M. dispar</i>	16S	Peyraud ve ark. 2003
<i>M. fermentans</i>	16S	McAuliffe ve ark. 2003b
	16S	Miles ve ark. 2004
	IS1550	Afshar ve ark. 2007

#### **1.9.4.3.1.3. Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA- PCR (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD- PCR)**

Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA (RAPD)- PCR olarak bilinen bu yöntemde tek bir primer kullanılır. Bu yönteme benzer ve aynı çalışma prensibine sahip AP- PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) ve DAF (DNA Amplification Fingerprinting) adlı iki PCR yöntemi daha vardır. RAPD- PCR' de genellikle 10-12 bp' lik primerler kullanılır. RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Farklı primerlerin kullanıldığı RAPD- PCR, *Mycoplasma* türlerinin identifikasyonunda başarıyla kullanılmıştır (Geary ve ark. 1994, Vicca ve ark. 2003, McAuliffe ve ark. 2004, Parham ve ark. 2006).

#### **1.9.4.3.2. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)**

Genomik DNA' ların restriksiyon endonükleaz enzimleri ile fragmentlere ayrılması ve bant örneklerinin yorumlanması esasına dayanır. PFGE' de elektrik akımının yönü eşit aralıklarla farklı yönlere doğru değişir ve bu şekilde birkaç kbp' lik küçük DNA ürünler ile 10 Mbp gibi büyük ürünlerin ayrımı yapılabilir. Daha çok izolatların karşılaştırılmasında kullanılır. PFGE, çeşitli *Mycoplasma* türlerinin ayırımında kullanılmıştır (McAuliffe ve ark. 2004, Stakenborg ve ark. 2005, Dufour-Gesbert ve ark. 2006, Parham ve ark. 2006).

#### **1.9.4.3.3. Diğer Tiplendirme Metotları**

Çoklu Lokus Dizilim Tiplendirmesi (Multilocus Sequence Typing- MLST) olarak da adlandırılan bu yöntem, bakterilerin mutasyona uğramayan genlerinde görülen farklı yapıların listelenmesi yaklaşımı olan Çoklu- Lokus Enzim Elektroforezi (Multi- Locus Enzyme Electrophoresis, MLEE) yöntemiyle saptanmıştır (Selander ve ark. 1986). MLST, korunan 7 temel gen (housekeeping

gene) içindeki belirli kısımlar kullanılarak bakteri izolatlarının tanımlandığı güvenilir bir yöntemdir. *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC) (Lorenzon ve ark. 2003), *M. mycoides* grubu (Manso- Silvan ve ark. 2007), *M. c. capricolum*, *M. mycoides* LC ve *M. capri*' nin karşılaştırmalı analizi için kullanılmıştır.

İnsersiyon sekansları (İS element), yaklaşık 750-1500 bp uzunluğunda yer değiştirebilen DNA parçacıklarıdır ve sadece kendilerinin yer değişimini kodlayan iki adet protein kodlarlar. Mikoplazmalar yüksek yoğunlukta İS element içerdikleri düşünülmektedir ve bu tür analizlerin bakteriyi tiplendirmede kullanılabileceği bildirilmiştir. İS element analizi *M. bovis* (Miles ve ark. 2005), *M. agalactiae* (Pilo ve ark. 2003) ve MmmSC (Vilei ve ark. 1999, Westberg ve ark. 2002) gibi *Mycoplasma* türlerin identifikasyonunda uygulanmıştır.

Gen sekanslama, dizisi bilinmeyen bir DNA bölgesinin veya genin nükleotidlerin diziliminin belirlenmesi işlemidir. *M. gallisepticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. synoviae* ve *M. conjunctivae* gibi birçok *Mycoplasma* türünün genotiplendirilmesinde faydalı bir tekniktir. Örneğin, *M. gallisepticum*' un yüzey protein genlerinin analizinde RAPD- PCR' ye oranla daha ayrıntılı bilgiler sunmuştur (Ferguson ve ark. 2005). Bakterileri taksonomik ve filogenetik incelenmesinde 16S rRNA gen dizilerinin analizi bugüne kadar en yaygın kullanılan yöntemdir. Yaklaşık 1500 bp uzunluğunda olan 16S rRNA yapısal geninin tüm bakterilerde bulunması, fonksiyonunun zamanla değişmemesi ve informatik amaçlı yeterince büyük olması bakteri identifikasyonu ve dizi analizlerinde bu gen bölgesini daha avantajlı kılmaktadır (Patel 2001).

### 1.10. Tedavi ve Kontrol

Koyun yetiştiriciliğinde birim alana düşen hayvan yoğunluğunun azaltılması ve ventilasyonun artırılması gibi gelişmiş hayvancılık uygulamaları Mikoplazma enfeksiyonları dâhil solunum yolu hastalıklarının yayılmasını önleme ve azaltılmasında fayda sağlamaktadır. Genç hayvanlarla yaşlıların temas alanları engellenmeli ve bu tür hayvan sürüleri karıştırılmadan önce farklı yerlerde izole edilmelidir. *Mycoplasma* türlerine karşı etkili antimikrobiklerle yapılan tedavi



uygulamaları hayvanlarda hızlı bir iyileşme için yeterli olabilecek gibi gözükse de *M. ovipneumoniae*'nin söz konusu olduğu durumlarda ve sekonder bakterilerin işe karışması durumunda enfeksiyon tekrar edebilir ve ilave tedaviler gerektirebilir. *Mycoplasma* türlerine karşı etkili antimikrobiyaller arasında florokinolonlar, oksitetrasiklin ve makrolitler sayılabilir. Bununla birlikte, İngiltere' de *M. ovipneumoniae* izolatları ile yapılan *in vitro* denemelerde suşların antibiyotiklere direnç geliştirdiği ve makrolitlere karşı duyarlılıklarında değişiklikler olduğunu bildirilmiştir (Ayling ve ark. 2005). Mikoplazma enfeksiyonlarında aşılama ile ilgili çok fazla gelişme yoktur. İngiltere' de, Pasteurella aşılı sürülerdeki solunum sistemi hastalıklarına karşı koruma sağlamak amacıyla bu aşı preparatına *M. ovipneumoniae* suşunun dahil edilmesi önerilmiştir (McAuliffe ve ark. 2003b).

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Çalışma Alanı

Bu çalışma Doğu Anadolu Bölgesi' nin kuzeydoğusunda yer alan Kars il' inde yapılmıştır. Kars ili toprakları yüksek dağlarla kuşatılmış ve genelde batı- doğu doğrultusunda uzanan akarsularla derin biçimde yarılmış geniş bir plato niteliğindedir. Rakımı ortalama 2000 m' yi bulan Kars ili topraklarının büyük bölümü yaylalardan oluşmaktadır. Kars il' inin 8 ilçesi, 10 belediyesi ve 381 köyü bulunmaktadır. İlin yüzölçümü 10.139 km<sup>2</sup>' dir (Anonim 3).

### 2.2. Hayvan Kaynağı ve Çalışma Planı

Modifiye bir kesitsel çalışma şeklinde yürütülen bu çalışmadaki hayvan kaynağını, Kars İli ve ilçelerine ait koyunculuk işletmelerinden 2017-2018 yılları arasında Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerine getirilen koyunlardan elde edilen 250 pnömonili akciğer oluşturdu. Çalışmada ayrıca 30 adet sağlıklı görünümlü koyun akciğer örneği de değerlendirildi.

### 2.3. Örnekleme Stratejisi ve Örnek Miktarı

Bu çalışmada küme örnekleme yöntemi örnekleme amacıyla model olarak kullanıldı. Kars merkez ve ilçelerine bağlı köylerde hedeflenen sayıya ulaşmak için kesimevleri ve mezbahaya getirilen pnömonili tüm koyunlardan küme örnekleme yöntemi ile örnekleme yapıldı. Çalışmada pnömoni vakalarında *Mycoplasma* türlerinin rolü hakkında bilgi toplanmaya çalışılan popülasyon olarak klinik veya makroskopik olarak pnömoni tablosu gösteren koyun popülasyonu, riskteki popülasyon olarak da olası pnömoni vakalarının görülebileceği ergin yaş grubu koyunlar seçildi (Diker 1993). Çalışmanın materyalini, 2017-2018 yılları arasında Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerinden temin edilen pnömonili 250 koyun akciğeri oluşturdu. Çalışmada ayrıca kontrol grubu olarak aynı yöreden getirilen ve aynı yaş grubu koyunlardan elde edilen sağlıklı görünümlü 30 adet akciğer örneği de değerlendirildi. Örnekler, alfanumerik olarak kodlama yapıldı. Numerik kodlar örnekleri temsilen sıralı sayılardan ibaret olup 1 ile 248 (pnömonili akciğer örnekleri için) ve 251 ile 280 arası (sağlıklı görünümlü akciğer örnekleri için) rakamlardan,

alfa kodlar ise ENG1 ve ENG2 (pnömonili akciğer örnekleri için) kodlarından oluşmaktadır.

### **2.3.1. Örnekleme**

Bu çalışma kapsamında hayvanlardan alınacak akciğer örnekleri için gerekli izin Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından 2018 tarihli ve 2018/004 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Mezbaha ve kesimevlerinde, koyun kesimleri esnasında makroskobik inceleme sonucu pnömonik saptanan koyun akciğerlerinden lezyonlu bölgeyi içeren yaklaşık 10x10 cm boyutunda parça alınarak temiz poşetlere konuldu. Örneklerin etiketlenmesi ve örneklenen hayvana ait epidemiyolojik bilgilerin kaydını takiben tüm örnekler soğuk zincirde (2-8 °C) ve kısa sürede Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarlarına ulaştırıldı. *Mycoplasma* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu için kültürel işlemlere hemen başlandı.

### **2.4. İzolasyon İçin Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar**

Pnömonili koyun akciğerlerinden *Mycoplasma* türlerinin izolasyonu amacıyla Mycoplasma Agar Base ve Mycoplasma Broth Base besiyerleri kullanıldı.

#### **2.4.1. Mycoplasma Agar Base' in İçeriği**

Akciğer örneklerinden *Mycoplasma* türlerinin kültürü amacıyla ticari Mycoplasma Agar (Thermo Scientific, CM0401) kullanıldı. Agar içeriği; 10 g/L bakteriyolojik pepton, 10 g/L et ekstraktı, 5 g/L sodyum klorit, 0.5 g/L mineral supplement ve 10 g/L agardan oluşmakta olup, pH 7.8' e ayarlandı. Besiyerine ayrıca zenginleştirici olarak at serumu ve maya ekstraktı ve selektivite kazandıran talyum asetat ve penisilin bileşenlerinden oluşmaktadır.

#### **2.4.2. Mycoplasma Broth Base' in İçeriği**

*Mycoplasma* türlerinin kültürü ve akciğer örneklerden homojenat hazırlanmasında ticari Mycoplasma Broth (Thermo Scientific, CM0403) kullanıldı. Broth içeriği; 10 g/L bakteriyolojik pepton, 10 g/L et ekstraktı, 5 g/L sodyum klorit

ve 0.5 g/L mineral supplementten oluşmakta olup, pH 7.8' e ayarlandı. Besiyeri ayrıca zenginleştirici olarak at serumu ve maya ekstraktı ve selektivite kazandıran talyum asetat ve penisilin bileşenlerinden oluşmaktadır.

#### **2.4.1.1. Maya Ekstraktının Hazırlanması**

Besiyerinde kullanılmak üzere taze maya ekstraktı hazırlandı. Bu amaçla ticari maya ekstraktından (Merck, 1.03753.0500) 25 gr tartılarak 100 ml distile suda çözdürüldü. Takiben 0.20 µm' lik filtrelerden (Millex- GS) süzülerek steril hale getirildi ve besiyerinde kullanılmak üzere 50 ml' lik steril plastik kapaklı tüplerde (FisherScientific, 14-432-22) -20 °C' de saklandı.

#### **2.4.1.2. At Serumunun Hazırlanması**

Besiyerinde kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan at serumu, Kars yöresinde yetiştirilen ve klinik olarak sağlıklı ergin atlardan temin edildi. Bu amaçla at kanları enjektör yardımıyla hayvanların *Vena jugularis*' lerinden 100-150 ml hacimlerinde alındı ve içerisinde herhangi bir katkı maddesi olmayan steril cam şişelere aktarılarak oda ısısında bir gece bekletildi. Takiben serum kısımları 50 ml' lik Falcon tüplerine aktarıldı ve 3000 devirde (rpm) 5 dk santrifüj sonrası kalıntısız serum örnekleri elde edildi. Elde edilen serum, 56 °C' lik su banyosunda 30 dk inkübe edilerek olası antikorlar yönünden inaktivasyon gerçekleştirildi. Daha sonra serum, 0.20 µm' lik filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi. Besiyerinde kullanılmak üzere 50 ml' lik Falcon tüplerine aktarılarak -20 °C' de saklandı.

#### **2.4.1.3. Talyum Asetatın Hazırlanması**

Besiyerinde kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan talyum asetatın ticari preparatı (Sigma- Aldrich, T8266) kullanıldı.

#### **2.4.1.4. Penisilinin Hazırlanması**

Besiyerinde kullanılmak üzere toz halinde ticari penisilin preparatı (Iecilline, İ.E. ULAGAY) kullanıldı.

### **2.4.3. Mycoplasma Agar Base' in Hazırlanması**

*Mycoplasma* türlerinin izolasyonu amacıyla Mycoplasma Agar Base besiyeri kullanıldı. Toz halindeki ticari besiyerinden 35.5 g tartılarak 700 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Besiyeri tozu homojen hale getirilinceye kadar 65 °C' de su banyosunda tutulduktan sonra, 121 °C' de 20 dk otoklavlandı ve steril edildi. Takiben besiyerine asepsi kurallarına dikkat edilerek 200 ml inaktive edilmiş at serumu, 100 ml steril maya ekstraktı, 250 mg talyum asetat ve 200000 IU penisilin G katıldı. Besiyerinin pH' sı 7.6-7.8' e ayarlandı ve 90 mm x 15 mm' lik plastik petri kutularına yaklaşık 16 ml hacimde dökülerek oda ısısında katılaşmaları beklendi. Besiyerleri, Mikoplazmaların kültürel işlemlerinde kullanılmak üzere haftalık taze olarak hazırlandı ve ihtiyaç duyulduğunda kullanılmak üzere +4 °C' de saklandı.

### **2.4.4. Mycoplasma Broth Base' in Hazırlanması**

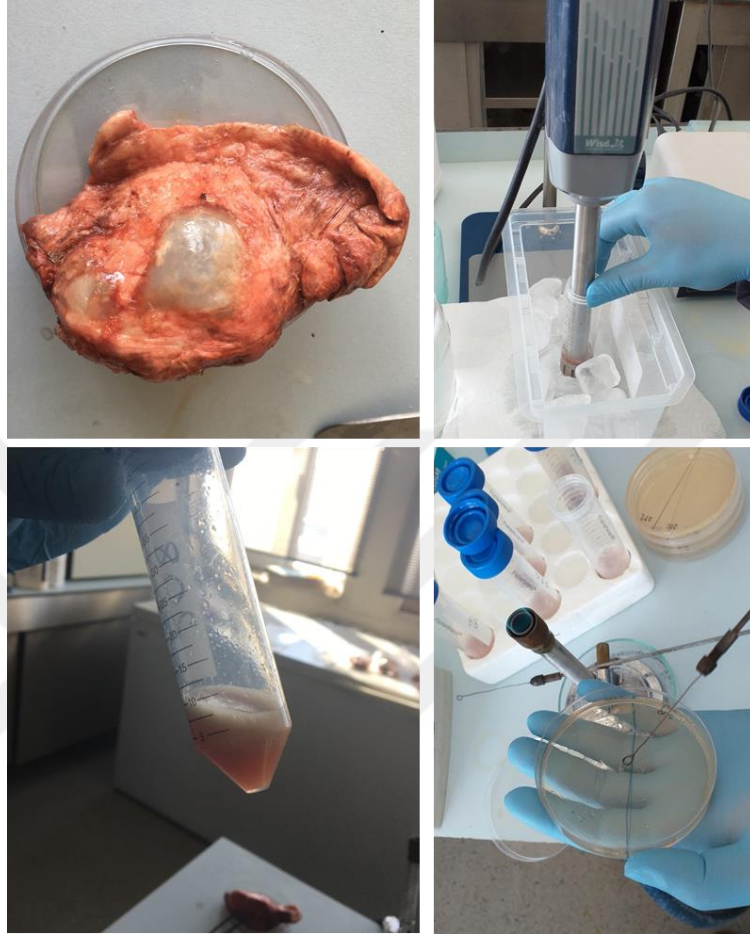
Mikoplazmaların kültürü ve pnömonik akciğer örneklerinden homojenat hazırlamak üzere Mycoplasma Broth Base kullanıldı. Toz halindeki ticari besiyerinden 25.5 g tartıldı ve 700 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Besiyeri tozu homojen hale getirilinceye kadar 65 °C' de su banyosunda tutulduktan sonra, 121 °C' de 20 dk otoklavlandı ve steril edildi. Takiben besiyerine asepsi kurallarına dikkat edilerek 200 ml inaktive edilmiş at serumu, 100 ml steril maya ekstraktı, 250 mg steril talyum asetat ve 200000 IU pensilin G katıldı. Besiyerinin pH' sı 7.6-7.8' e ayarlandı ve vida kapaklı steril cam tüplere 5' er ml bölündü. Besiyerleri, Mikoplazmaların kültürel işlemlerinde kullanılmak üzere haftalık taze olarak hazırlandı ve ihtiyaç duyulduğunda kullanılmak üzere +4 °C' de saklandı.

## **2.5. Mikoplazma Etkenlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu**

### **2.5.1. Mikoplazma Etkenlerinin İzolasyonu**

Mikroorganizma kontaminasyonunu önlemek amacıyla pnömonik koyun akciğerlerinin spatül ile yüzeyleri yakıldı. Daha sonra bisturi ucu ile yakılan kısma yüzeysel bir kesit atılıp iç taraftaki canlı dokudan yaklaşık 3 g parça alındı. Doku parçası, içerisinde 5 ml Mycoplasma Broth bulunan ve buz kalıbına yerleştirilen 50 ml' lik Falkon tüplere homojenize edilmek üzere aktarıldı. Doku parçası,

homojenizatör (Daihan, HG- 15D) ile 30 sn homojenize edildikten sonra 3000 devirde 5 dk santrifüj ile oluşan supernatant kültürel amaçlı kullanıldı (Resim 1).



**Resim 1.** Pnömonik koyun akciğerlerinden kültürel işlemlerde kullanılmak üzere homojenat hazırlanması.

Hazırlanan homojenattan 0.1 ml alınarak Mycoplasma Agar Base ve Mycoplasma Broth Base besiyerlerine ekim yapıldı ve öze ile yayıldı. Ekilen besiyerleri 2.5 L' lik jar içerisine konulduktan sonra mum alevi ile sağlanan %5 CO<sub>2</sub>' lik mikroaerobik ortamda 37 °C' de 5-7 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası katı besiyerindeki olası üremeler stereo mikroskop (Nikon, SMZ- 10A) altında koloni varlığı yönünden incelendi. Sıvı besiyerinde ise bulanıklık olası bakteriyel üremeler olarak değerlendirildi. Üremelerin saflaştırılması amacıyla katı besiyerinden mikroskop altında şüpheli koloniler seçilerek ve sıvı besiyerinden ise 0.1 ml alınarak katı ve sıvı besiyerlerine subkültürleri yapıldı. Her iki besiyerinde de

şekillenen kolonilerin identifikasyonda ve moleküler testlerde kullanılmak üzere nihai kültürü katı besiyerinde yapıldı.

### 2.5.2. Mikoplazma Etkenlerinin İdentifikasyonu

Katı besiyerinde oluşan koloniler stereo mikroskopta, x40 büyütmede incelendi ve sahanda yumurta (fried egg) olarak ifade edilen merkezli veya merkezsiz, muntazam veya düzensiz sonlanan granüler koloniler olası *Mycoplasma* spp. olarak ilk ve basit tanımlanması yapıldı (Otlu 1996). *Mycoplasma* spp. şüpheli kolonilerin mutlak identifikasyonu PCR temelli moleküler tekniklerle yapıldı. PCR temelli ileri identifikasyon tekniklerine kullanılmak üzere *Mycoplasma* spp. şüpheli koloniler steril bisturi ucu ile besiyeriyle birlikte kesilerek %20 gliserinli Brucella Broth (Sigma, B3051) içerisine aktarıldı ve -20 °C' de saklandı.

## 2.6. Moleküler Analiz

### 2.6.1. Materyal

#### 2.6.1.1. Moleküler Tanı İçin Kullanılan Araç, Gereç ve Veri Programları

- Otomatik Pipet Seti (Gilson) (10, 20, 100, 200, 1000 µl' lik)
- Termal cycler (Bio- Rad, MJ Mini Gradient Thermal Cycler, PTC- 1148)
- UV transilluminatör (UVP, 3UVT- Benchtop, LMS- 20E)
- Elektroforezis ünitesi (Bio- Rad, Mini- sub cell gt)
- Pikofüj (Labnet, C1301)
- Soğutmalı eppendorf santrifüjü (Eppendorf, Centrifuge- 5417R)
- Vortex (Heidolph Reax top, 01799- 513320)
- Laminar flow kabin (Nüve, LN120)
- Blok ısıtıcı (Pro- Lab, VWR Digital Heatblock)
- Derin dondurucu (Uğur)
- Sekans cihazı (ABI 3500 Genetic Analyzer)
- Biyoinformatik (CLC Main Workbench 7.7.3 (Qiagen))
- NCBI GenBank

- DNA ekstraksiyon reaktifi: Tek koloni lizis buffer (SCLB) (Tris- EDTA buffer, pH 7.4, 5 mg/ml Proteinaz K)
- Bakteri standart suşları: PCR analizlerinde pozitif kontrol olarak Anabilim Dalımız kültür koleksiyonuna ait ve tanımlanmış *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* suşları ve bunlara ait DNA ekstraktlarından faydalanıldı.

### 2.6.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Reaktifleri

- Taq DNA Polymeraz Seti (Sigma, D1806)
- 10xPCR Buffer: 100 mM Tris- HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> ve %0.01 Jelatin (Sigma, D1806)
- dNTP Miks (10 mM) (Sigma, D7295)
- RNase/RNase ari su (Sigma, W1754)
- Mineral yağ (Sigma, M8662)
- Primerler (Mikoplazma cins spesifik PCR primerleri, Mikoplazma tür spesifik PCR primerleri, 16S rRNA primerleri) (Sentegen)
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Sci., 4337455)

### 2.6.1.3. Elektroforez Aşamasında Kullanılan Kimyasallar

- Tris- Borik Asit- EDTA (Sigma, 1061772500)
- Agaroz (Sigma, A9539)
- DNA Ladder (Bioline, Hyperladder, 100 bp, 1 kb)
- Loading Dye Solüsyonu (Bioline)
- Etidyum bromid (Sigma, E1510- 10 ML)

### 2.6.2. Metot

Pnömonik koyun akciğerlerinden *Mycoplasma* türlerinin identifikasyonu moleküler tekniklerle ve sekans analizi ile yapıldı. Bu amaçla etkenlere ait nükleik asit eldesinde katı ve sıvı besiyerlerinde üreyen ve saflaştırılan *Mycoplasma* spp. şüpheli koloniler kullanıldı.



### 2.6.2.1. DNA Ekstraksiyonu

#### 2.6.2.1.1. İzole Edilen *Mycoplasma* Suşlarından DNA Ekstraksiyonu

Mikoplazma kolonilerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla tek koloni lizis buffer solüsyonu (SCLB) aracılığıyla ısıl işlem metodu kullanıldı (Marmur 1961). Katı besiyerinde üreyen kolonilerinden stereo mikroskop altında 0.1 µl' lik plastik öze ile tek bir koloni seçilerek 0.2 ml' lik PCR tüpleri içerisinde taze hazırlanmış 40 µl tek koloni lizis buffer içerisine aktarıldı ve iyice karıştırılarak homojenize edildi. İçerisinde bakteri kolonisi buluna tüpler gradient ısı makinasına yerleştirildi ve bir siklus halinde; 80 °C' de 10 dk, 55 °C' de 10 dk ve +4 °C' de 10 dk tutuldu. Süre sonunda tüplere 80 µl nükleaz ari su katıldı. Tüpler 7000 devirde (rpm) 2.5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant kısımdan yaklaşık 80 µl toplanarak kalıp DNA olarak kullanıldı. Elde edilen DNA ekstraktları PCR ve sekans işlemlerinde kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı.

### 2.6.2.2. PCR Analizleri

#### 2.6.2.2.1. Cins Spesifik PCR Analizi

Mikoplazmaların cins düzeyinde identifikasyonu amacıyla 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonunu sağlayan primer çiftinin kullanıldığı cins spesifik PCR analizi gerçekleştirildi (Botes ve ark. 2005). Bu amaçla Tablo 9' daki primer çifti ve Tablo 10' daki PCR reaksiyon bileşenleri kullanıldı.

**Tablo 9.** Cins spesifik PCR analizi için kullanılan primerler ve özellikleri.

Primer ismi	Primer dizisi	Hedef bölge	Bant boyutu (bp)
GPO3 (F)	5'-TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC-3'	16S rRNA	270
MGSO (R)	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'		

Cins spesifik PCR analizinin gradient ısı makinasındaki termal döngüsü, 94 °C' de 5 dk denatürasyon, 55 °C' de 45 sn primer bağlanması ve 72 °C' de 90 sn zincir uzaması şeklinde 35 siklus ve takiben 72 °C' de 6 dk son uzama şeklinde gerçekleştirildi.

**Tablo 10.** Cins spesifik PCR analizi için reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	Miktar (25 µl toplam hacim için)
10xPCR buffer	2.5 µl
dNTP miks (10 mm)	0.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mm)	3 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl
Primer R (10 pmol)	1 µl
Taq polimeraz	0.4 µl
H <sub>2</sub> O	13.6 µl
DNA	3 µl

### 2.6.2.2.2. Tür Spesifik PCR Analizi

Kültürel yoklamalar sonucu elde edilen *Mycoplasma* izolatların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonunu sağlayan primerlerin kullanıldığı tür spesifik PCR analizi gerçekleştirildi (Kılıc ve ark. 2013) Bu amaçla Tablo 11’ deki primer çifti ve Tablo 12’ deki PCR reaksiyon bileşenleri kullanıldı.

**Tablo 11.** Tür spesifik PCR analizi için kullanılan primerler ve özellikleri.

<i>Mycoplasma</i> türü	Primer ismi	Primer dizisi	Hedef bölge	Boyut (bp)
<i>M. ovipneumoniae</i>	LMF1 (F)	5'-TGAACGGAATATGTTAGCTT-3'	16S rRNA	361
	LMR1 (R)	5'-GACTTCATCCTGCACTCTGT-3'		
<i>M. arginini</i>	MAGF	5'-GCATGGAATCGCATGATTCCT-3'	16S rRNA	545
	GP4R	5'-GGTGTTCCTTCCTTATATCTACGC-3'		

**Tablo 12.** Tür spesifik PCR analizi için reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	Miktar (25 µl toplam hacim için)
10xPCR buffer	2.5 µl
dNTP miks (10 mm)	0.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mm)	3 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl
Primer R (10 pmol)	1 µl
Taq polimeraz	0.4 µl
H <sub>2</sub> O	13.6 µl
DNA	3 µl

Tür düzeyinde identifikasyon amacıyla uygulanan PCR’ de termal şartlar *M. ovipneumoniae* için 94 °C’ de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklustan oluşan 94 °C’ de 30 sn denatürasyon, 55 °C’ de 30 sn primer bağlanması ve 72 °C’ de 30 sn zincir uzaması ve 72 °C’ de 7 dk son uzama şeklinde gerçekleştirildi. *M. arginini* için ise

94 °C’ de 5 dk ilk denatürasyonu takiben, 40 siklustan oluşan 94 °C’ de 30 sn denatürasyon, 55 °C’ de 30 sn primer bağlanması, 72 °C’ de 60 sn zincir uzaması ve 72 °C’ de 5 dk son uzama şeklinde gerçekleştirildi.

### 2.6.2.2.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR Analizi

Kültürel yoklamalar, cins spesifik PCR ve tür spesifik PCR analizleri sonucu elde edilen *Mycoplasma* suşlarının sekansı amacıyla 16S rRNA geninin amplifikasyonunu sağlayan primerlerin kullanıldığı 16S rRNA- PCR tekniği uygulandı. Bu amaçla Tablo 13’ deki primer çifti ve Tablo 14’ deki PCR reaksiyon bileşenleri kullanıldı.

**Tablo 13.** 16S rRNA gen bölgesinin PCR analizi için kullanılan primerler ve özellikleri.

Primer ismi	Primer dizisi	Hedef bölge	Bant boyutu (bp)
27F	5’-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3’	16S rRNA	1465
1492R	5’-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3’		

16S rRNA- PCR analizinin ısı makinasındaki termal döngüsü, 95 °C’ 5 dk ilk denatürasyon sonrası 30 siklustan oluşan 94 °C’ de 15 sn denatürasyon, 59 °C’ de 30 sn primer bağlanması, 72 °C’ de 45 sn zincir uzaması ve 72 °C’ de 5 dk son uzaması şeklinde gerçekleştirildi.

**Tablo 14.** 16S rRNA gen bölgesinin PCR analizi için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve hacmi.

Bileşen	Miktar (25 µl toplam hacim için)
10x PCR buffer	2.5 µl
dNTP miks (10 mm)	0.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mm)	3 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl
Primer R (10 pmol)	1 µl
Taq polimeraz	0.4 µl
H <sub>2</sub> O	13.6 µl
DNA	3 µl

### 2.6.2.2.4. 16S rRNA Gen Bölgesinin Dizi Analizi

Bakteri izolatlarının dizi analizi, Erciyes Üniversitesi Erciyes Teknopark A.Ş.’de (Kayseri, Türkiye) yapıldı. 16S rRNA gen bölgesinin sekansı BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit aracılığı ile ABI 3500 Genetic Analyzer

cihazında gerçekleştirildi. 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi için kullanılan primerler Tablo 14' de verilmiştir. Elde edilen dizilerin analizi CLC Main Workbench 7.7.3 (Qiagen) program eşliğinde gerçekleştirildi ve veriler NCBI GenBank' daki *Mycoplasma* türleri ile karşılaştırıldı. *Mycoplasma* tür adları BLAST ile NCBI GenBank' tan elde edilen benzerlik puanlarına göre verildi (CLSI 2008).

### 2.6.2.3. Elektroforez ve Görüntüleme

Cins spesifik PCR, tür spesifik PCR ve 16S rRNA gen PCR' sine ait amplifiye ürünlerin görüntülenmesi ve analizi amacıyla yatay jel elektroforez tekniği uygulandı. PCR ürünleri, etidyum bromür ile boyanan %1.5 agaroz jel kuyucuklarına konularak 1xTBE buffer solüsyonu içeren elektroforez tankı içerisinde 100 volt ve 400 mili amperde 40 dakika yürütüldü. Oluşan bantlar jelde yürütülen 100 bp plus ve 1kb DNA standartı ile kıyaslandı ve meydana gelen DNA fragmentleri UV transilluminatörde (UVP/LMS- 20E) görüntülendi. Oluşan görüntüler fotoğraflanarak dokümanete edildi. 16S rRNA gen spesifik primer çifti kullanılarak yapılan cins spesifik PCR' de 270 bp boyutunda amplifiye ürünlerin varlığı *Mycoplasma* spp. olarak değerlendirildi. 16S rRNA gen spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan tür spesifik PCR' de 361 bp boyutunda amplifiye ürünlerin varlığı *M. ovipneumoniae* ve 545 bp boyutunda amplifiye ürünlerin varlığı *M. arginini* olarak değerlendirildi. 16S rRNA gen bölgesinin PCR analizinde ise 1465 bp boyutunda amplifiye ürünlerin varlığı arandı.

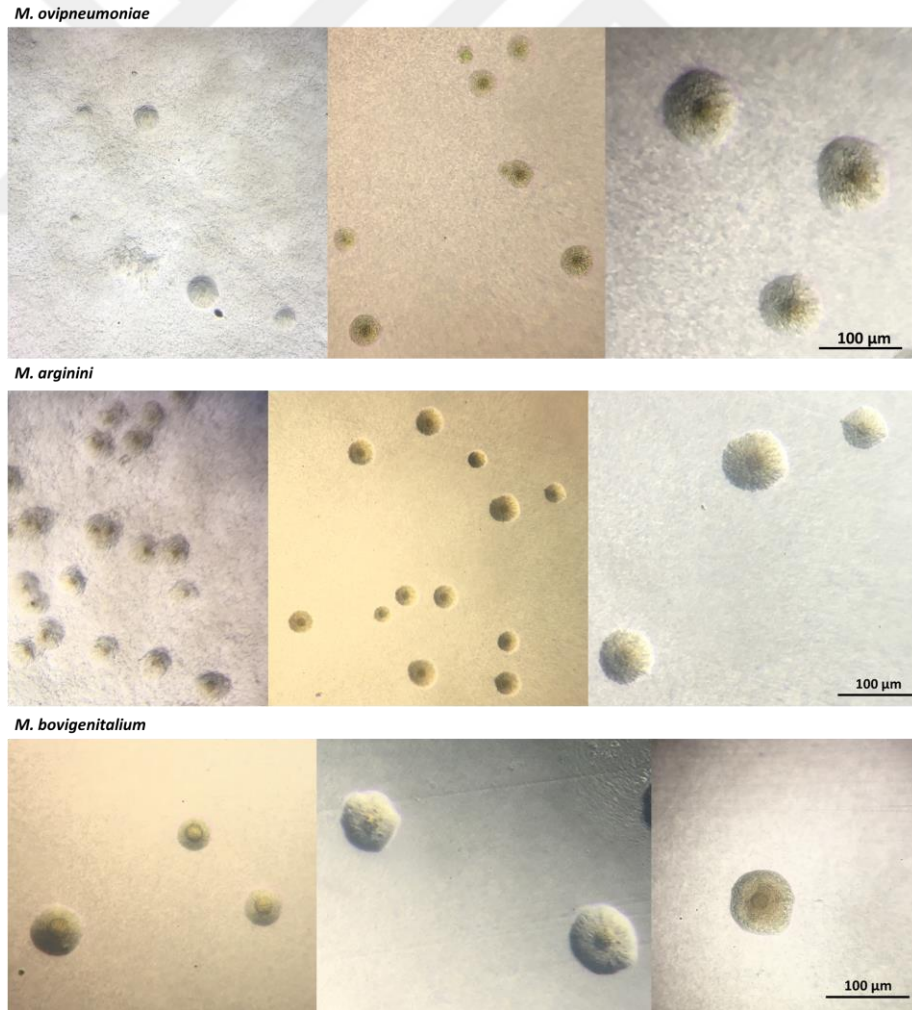
## 2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Pnömonik koyun akciğerlerinden etken izolasyonu, moleküler identifikasyonu ve sekans analizi sonucu elde edilen veriler % oran olarak sunuldu ve yorumlandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada, Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerine getirilen koyunlardan alınan 250 pnömonili akciğer örneğinin kültürel analizi sonucu 26' sından (%10.4) *Mycoplasma* şüpheli etken izolasyonu gerçekleştirildi. Aynı yaş grubu koyunlardan elde edilen sağlıklı görünümlü 30 akciğer örneğinden ise *Mycoplasma* etken izolasyonu yapılamadı. Mikoplazma identifikasyonu koloni morfolojisi temeline dayalı olarak gerçekleştirildi. Bu kapsamda *Mycoplasma* agarda x40 büyütme ışık mikroskopunda *Mycoplasma* spp. şüpheli farklı koloni yapılarına rastlandı. Bunlar arasında tipik sahanda yumurta görünümlü, merkezli, kenarları düzgün kolonilerin yanı sıra, merkezsiz ve kenarları düzensiz koloni türlerine de rastlandı (Resim 2).

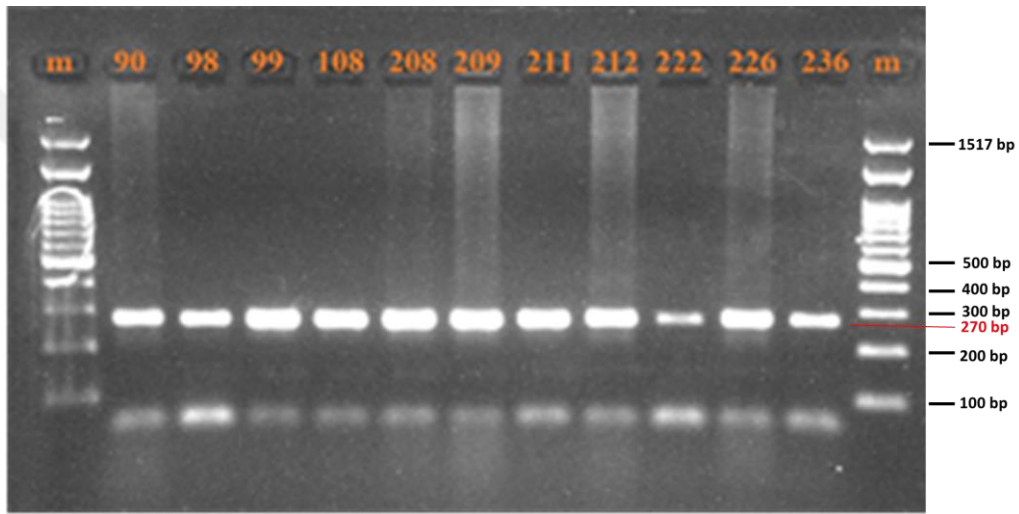


**Resim 2.** Kültürel işlem sonrası *Mycoplasma* türlerine ait koloni varyasyonları.

### 3.2. İzolatların PCR ile İdentifikasyon Bulguları

#### 3.2.1. Cins Spesifik PCR Bulguları

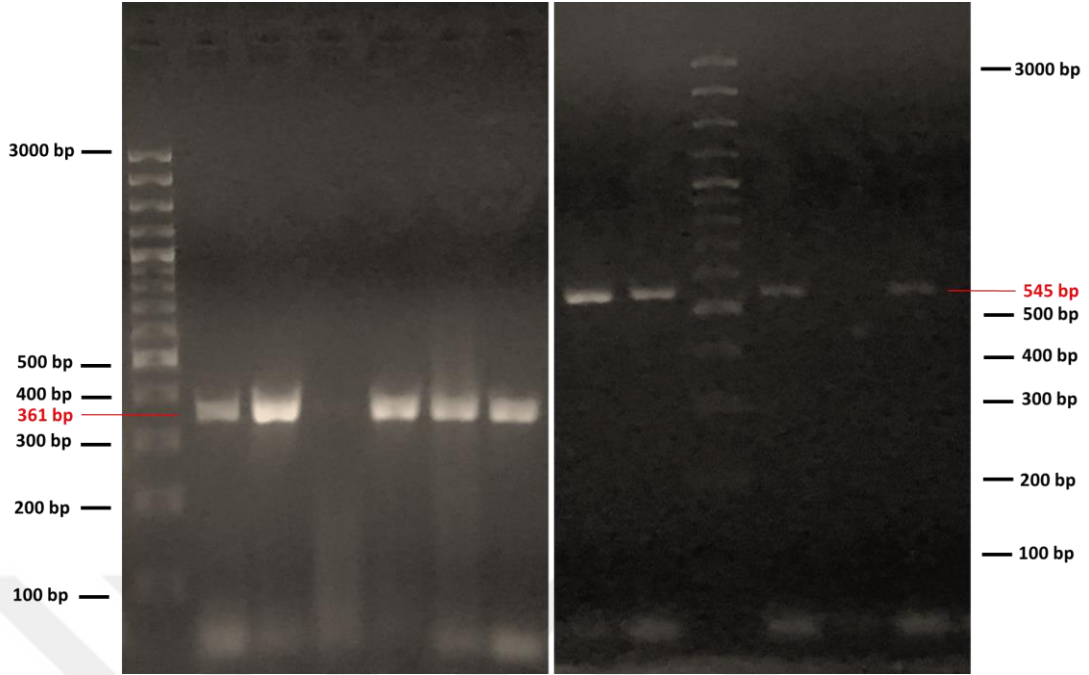
*Mycoplasma* izolatlarının cins düzeyinde identifikasyonu amacıyla 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonunu hedef alan primer çiftinin kullanıldığı PCR reaksiyonundan yararlandı. Cins spesifik PCR sonucu 270 bp uzunluğundan amplifiye ürün varlığı ile 26 izolatın tümü (%100) *Mycoplasma* spp. olarak identifiye edildi (Resim 3, Tablo 15).



**Resim 3.** Cins spesifik PCR' ye ait amplifiye ürünlerin jel elektroforez görüntüsü. *Mycoplasma* spp. örneklere ait 270 bp' lik amplifiye ürünlerin görüntüsü. Marker: 100 bp DNA Ladder (NEB, N3231S).

#### 3.2.2. Tür Spesifik PCR Bulguları

Kültürel analiz ve cins spesifik PCR analiz sonrası *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan 26 izolatın tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*' nin 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonunu hedef alan PCR yöntemleri kullanıldı. Tür spesifik PCR analizi sonucu 361 bp uzunluğunda amplifiye ürün varlığı ile izolatların 12' si (%46.15) *M. ovipneumoniae* ve 545 bp uzunluğunda amplifiye ürün varlığı ile 4' ü (%15.38) *M. arginini* olarak saptandı (Resim 4). İzolatlardan 2' sinde (%7.69) *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* eş zamanlı olarak belirlendi. *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan 26 izolattan 8' i (%30.76) araştırılan *Mycoplasma* türleri (*M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*) yönünden negatif saptandı (Tablo 15).



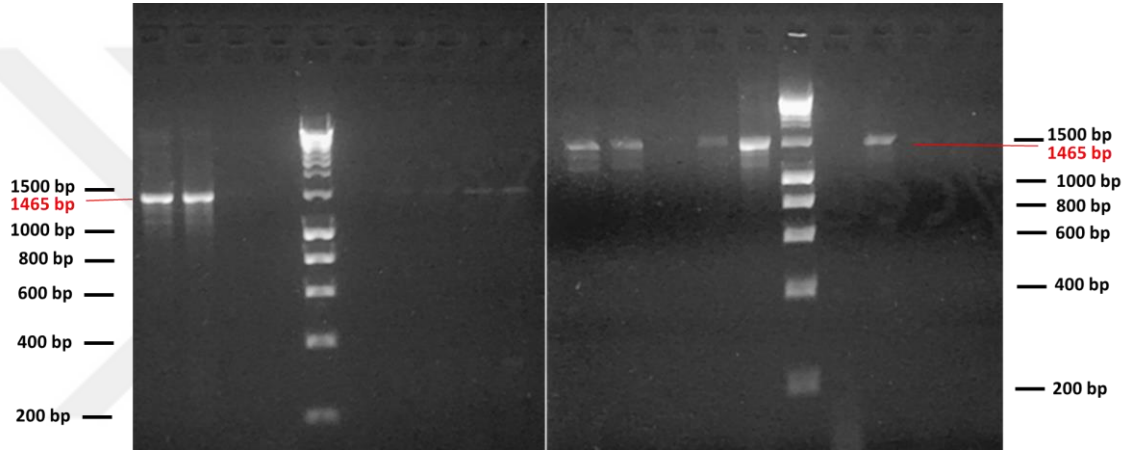
**Resim 4.** Tür spesifik PCR' ye ait amplifiye ürünlerin jel elektroforez görüntüsü. 361 bp' lik amplifiye ürün ile *M. ovipneumoniae* ve 545 bp' lik amplifiye ürün ile *M. arginini* saptanan örnekler. Marker: GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (ThermoFisher Sci., SM0322).

**Tablo 15.** Kültür pozitif örneklerin PCR analizlerine göre *Mycoplasma* tür dağılımı.

Örnek no	Cins PCR	Tür PCR
73	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
75	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. arginini</i>
77	<i>Mycoplasma</i> spp.	Negatif
78	<i>Mycoplasma</i> spp.	Negatif
79	<i>Mycoplasma</i> spp.	Negatif
80	<i>Mycoplasma</i> spp.	Negatif
81	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. arginini</i>
85	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
87	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
88	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
90	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i> + <i>M. arginini</i>
98	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i> + <i>M. arginini</i>
99	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. arginini</i>
108	<i>Mycoplasma</i> spp.	Negatif
208	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
209	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
210	<i>Mycoplasma</i> spp.	Negatif
211	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. arginini</i>
212	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
222	<i>Mycoplasma</i> spp.	Negatif
224	<i>Mycoplasma</i> spp.	Negatif
226	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
234	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
236	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
ENG1	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>
ENG2	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. ovipneumoniae</i>

### 3.2.3. 16S rRNA Gen Bölgesi PCR Bulguları

Kültürel yoklamalar ve PCR analizleri sonucu *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan izolatların sekansı amacıyla 16S rRNA genini hedef alan PCR tekniği uygulandı. PCR analizinde 1465 bp boyutunda amplifiye ürün varlığı ile 26 izolatın 22' sine (%84.61) ait 16S rRNA gen bölgesi başarı ile amplifiye edildi (Resim 5). Cins spesifik PCR ile *Mycoplasma* spp. saptanan 3 örnek ile tür spesifik PCR ile *M. ovipneumoniae* saptanan 1 örnek dahil toplam 4 izolatın 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilemedi.



**Resim 5.** 16S rRNA gen bölgesinin PCR' sine ait 1465 bp' lik amplifiye ürünlerin jel elektroforez görüntüsü. Marker: HyperLadder 1kb (Bioline, BIO- 33053).

### 3.2.4. 16S rRNA Gen Bölgesinin Sekans Bulguları

16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi sonrası izolatların 22' sinin (%84.61) başarılı bir şekilde dizi analizi gerçekleştirildi. Dört örnek DNA konsantrasyonu ve saflığı ve 16S rRNA bölgesinin amplifikasyonu ile ilgili problemlerden dolayı sekanslanamadı. Tür spesifik PCR ile *M. ovipneumoniae* olarak tanımlanan 11 örneğin tümü 16S rRNA bölgesinin sekansı sonucu *M. ovipneumoniae* olarak tanımlandı. Tür spesifik PCR ile *M. arginini* olarak tanımlanan 4 örneğin tümü 16S rRNA bölgesinin sekansı sonucu *M. arginini* olarak tanımlandı. Tür spesifik PCR ile *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*' nin eş zamanlı olarak belirlendiği 2 örnek ise 16S rRNA bölgesinin sekansı sonrası *M. arginini* olarak tanımlandı. Cins spesifik PCR ile *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan 5 izolat ise 16S rRNA bölgesinin sekansı sonucu *M. bovis genitalium* olarak tanımlandı.



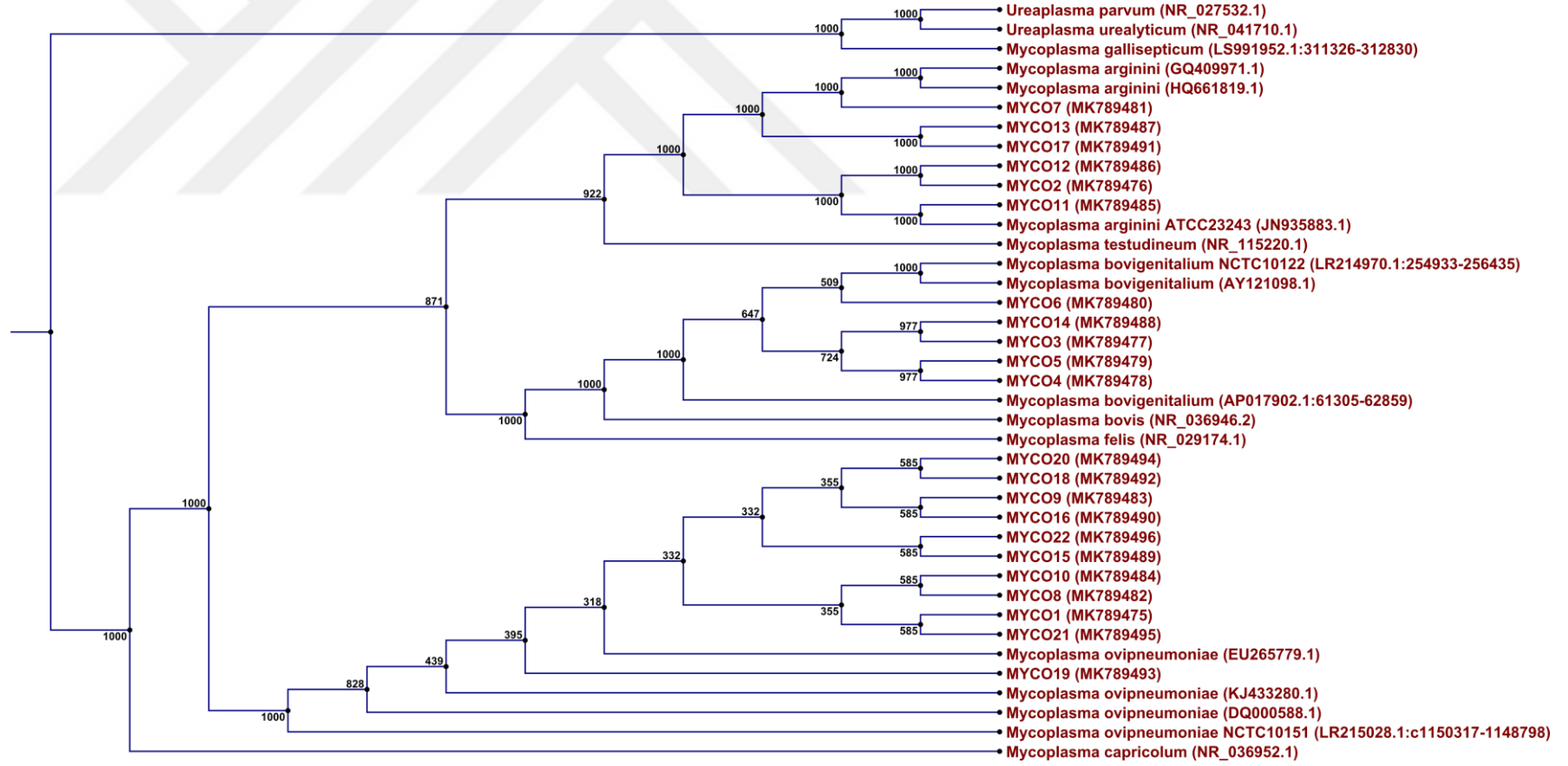
Sonuç olarak, 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi sonrası 22 izolatın 11' i (%50) *M. ovipneumoniae*, 6' s ı (%27.27) *M. arginini* ve 5' i (%22.72) *M. bovisgenitalium* olarak identifiye edildi (Tablo 16).

**Tablo 16.** 16S rRNA gen bölgesinin sekansı temelli Mikoplazma identifikasyon sonuçları.

Suş no	Suş kodu	NCBI erişim no	Tür spesifik PCR sonucu	Sekans sonucu
MYCO1	73	MK789475	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO2	75	MK789476	<i>M. arginini</i>	<i>M. arginini</i>
MYCO3	77	MK789477	Analiz edilemedi	<i>M. bovisgenitalium</i>
MYCO4	78	MK789478	Analiz edilemedi	<i>M. bovisgenitalium</i>
MYCO5	79	MK789479	Analiz edilemedi	<i>M. bovisgenitalium</i>
MYCO6	80	MK789480	Analiz edilemedi	<i>M. bovisgenitalium</i>
MYCO7	81	MK789481	<i>M. arginini</i>	<i>M. arginini</i>
MYCO8	85	MK789482	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO9	87	MK789483	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO10	88	MK789484	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO11	90	MK789485	<i>M. arginini</i> <i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. arginini</i>
MYCO12	98	MK789486	<i>M. arginini</i> <i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. arginini</i>
MYCO13	99	MK789487	<i>M. arginini</i>	<i>M. arginini</i>
MYCO14	108	MK789488	Analiz edilemedi	<i>M. bovisgenitalium</i>
MYCO15	208	MK789489	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO16	209	MK789490	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO17	211	MK789491	<i>M. arginini</i>	<i>M. arginini</i>
MYCO18	212	MK789492	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO19	226	MK789493	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO20	234	MK789494	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO21	ENG1	MK789495	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>
MYCO22	ENG2	MK789496	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>

### 3.2.4.1. 16S rRNA Gen Bölgesinin Sekansı Temelli Filogenetik Analiz Bulguları

16S rRNA gen bölgesinin sekans analizine göre 22 *Mycoplasma* izolatı için komşu birleştirme yöntemi ile oluşturulan dendrogram ve evrimsel ilişki sonucu izolatların, *M. ovipneumoniae*, *M. arginine* ve *M. bovisgenitalium* olmak üzere üç temel kümede toplandığı görülmüştür (Şekil 2).



**Şekil 2.** 16S rRNA gen bölgesinin dizilerine göre analiz edilen 22 *Mycoplasma* izolatı için komşu birleştirme yöntemi ile oluşturulan dendogram ve evrimsel ilişkileri. İzolatlar GenBank erişim numaraları parantez içerisinde belirtilmiştir.

Bu çalışmada, tanımlanan 11 *M. ovipneumoniae* izolatından 10' u (MYCO1, MYCO8, MYCO9, MYCO10, MYCO15, MYCO16, MYCO18, MYCO20, MYCO21, MYCO22) kendi aralarında büyük bir homojenite göstermiş fakat GenBank'tan elde edilen dizilerle ayrı dallanmıştır. Bu 10 izolat, ABD' nin Hells Kanyonu'nda yetiştirilen Amerikan yaban koyunlarına ait 28 günlük pnömonik kuzudan elde edilen *M. ovipneumoniae* (EU265779.1) izolatına (Besser ve ark. 2008) büyük bir benzerlik göstermektedir. Heterojenite gösteren 1 *M. ovipneumoniae* izolatı (MYCO19) ise Norveç' de Misk öküzlerinden izole edilen *M. ovipneumoniae* (KJ433280.1) (Anonim 6) ile aynı branşta yer almıştır (Şekil 2).

Dendogramın diğer bir kümesini oluşturan *M. arginini* izolatları birbirlerine yakınlık bakımından iki gruba ayrılmıştır. Birinci grubu temsil eden MYCO13 ve MYCO17 birbirlerine en yakın iken bu iki izolat, Güney Afrika' da Dorper koyuna ait vajinal svap örneğinden izole edilen *M. arginini* (HQ661819) (Ali 2012) ve İngiltere' den orijini belli olmayan *M. arginini* suşu (GQ409971) (Anonim 4) ile büyük bir benzerlik gösteren MYCO7 kodlu *M. arginini* izolatı ile aynı branşta yer almıştır. İkinci grup ise birbirine çok yakın MYCO2 ve MYCO12 izolatları ile bu izolatlarla aynı branşta yer alan ve pnömonili koyun akciğerlerinden izole edilen ATCC 23243 kodlu *M. arginini* suşuna büyük bir benzerlik gösteren MYCO11 kodlu *M. arginini* izolatından oluşmaktadır (Şekil 2).

Çalışmanın diğer filogenetik grubu ise *M. bovis genitalium* izolatlarından oluşmaktadır. Bu izolatların 4' ü (MYCO3, MYCO4, MYCO5, MYCO14) kendi arasında homojenite gösterirken bu 4 izolat, 1947' de Edward ve Beckenham (Anonim 5) tarafından sığır genital sisteminden izole edilen *M. bovis genitalium* suşu (NCTC 10122) ve *M. bovis genitalium* type strain (AY121098) ile benzerlik gösteren MYCO6 kodlu *M. bovis genitalium* izolatı ile aynı branşta yer almıştır (Şekil 2).

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Koyun yetiştiriciliği, hızlı üreme ve büyüme potansiyeline sahip olan ve et, süt ve yapağı üretimi ile ülke ekonomisine önemli katkılar sağlayan bir hayvancılık modelidir. Dünya genelinde birçok ülkede yaygın bir şekilde yapılmakta ve hayvancılık kaynaklı ülke ekonomisinin temelini oluşturmaktadır. Bu sektörden elde edilecek ürünlerin kalite ve miktarının artırılması koyun yetiştiriciliği temelli ekonomiyi uygulanabilir ve sürdürülebilir kılmaktadır (Koluman 2014).

Koyun yetiştiriciliğinde rastlanılan en önemli problemler, enfeksiyöz etkenler tarafından kaynaklanan perinatal kuzu ölümleri, ishaller ve solunum sistemi hastalıklarıdır. Perinatal kuzu ölümleri; erken embriyonal ölüm, abort, doğum sırası ve sonrasında ölüm şeklinde gerçekleşir. *Brucella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Neospora* gibi etkenler perinatal kuzu ölümlerinin başlıca etkenleri arasında yer alırlar (Dubey ve Lindsay 1990, Akça ve Şahin 2011, Büyük ve ark. 2011). Kuzu ishalleri ise doğum sonrası ilk 6 aylık döneme tekabül eder ve enfeksiyondan *E. coli*, *Salmonella* spp., Rotavirus, Coronavirus, Kriptosporidium ve Koksidiozis etkenleri sorumludur (Gökçe ve ark. 2010, Arslan ve ark. 2016). Tüm küçük ruminant enfeksiyonlarının %5.6' sını oluşturan solunum sistemi enfeksiyonları ise rinitis, laringitis, pnömoni ve plöyrizi gibi birçok alt ve üst solunum sistemi rahatsızlıklarından oluşur. Bunlar arasında pnömoni yaygınlık ve prognoz açısından çok daha önemli yer tutar. Pnömoni, akciğer bronş ve alveollerinin enfeksiyöz ajanlara karşı geliştirdiği inflamatuvar yanıtın sonucu oluşan bir solunum sistemi hastalığıdır. Pnömoni, kuzularda yüksek morbidite, düşük mortalite ve büyümenin gecikmesi ile karakterize iken, koyunlarda genel durum bozukluklarına ilaveten yavaş büyüme ve dişilerde süt veriminde azalma gibi bulgularla ortaya çıkar (Ayling ve Nicholas 2007). Ergin hayvanlarda subklinik seyreden kronik ve mortalitesi düşük bir hastalıktır. Fakat hayvanlarda verim kaybı, tedavi masrafları ve nadirde olsa ölümlere sebep olduğu için koyun yetiştiriciliğinde önemli ekonomik girdiler oluşturmaktadır.

Pnömoni, duyarlı konak, patojen etkenler ve çevresel faktörler arasında bir etkileşim sonucu oluşan bir hastalık kompleksidir. Koyunlar pnömoniyeye her yaş

grubunda duyarlı olmalarına rağmen genç ve yaşlı hayvanlarda daha sık ortaya çıkmaktadır. Kalabalık yetiştiricilik, ventilasyonu iyi olmayan ahırlarda barındırma ve soğuk hava gibi çevresel faktörler koyun pnömonilerine predispozisyon oluşturan temel faktörlerdir. Koyunlarda pnömoninin de dâhil olduğu solunum sistemi hastalıkları multifaktöriyel bir karakter gösterir ve virüs, parazit ve bakteri gibi pnömoniye yol açan birçok etiyolojik etken bulunmaktadır (Ikede 1978, Martin 1983, 1996). Bunların arasında, bakteriyel hastalıklar değişken klinik belirtilere yol açması, ciddi hastalık problemleri oluşturması ve birçok kemoterapötik madde kullanımına bağlı olarak artan antibiyotik direnç sonucu ortaya çıkan persiste enfeksiyon tablolarıyla dikkat çekicidir. Koyun ve kuzularda pnömoniye neden olan bakteriyel etkenler arasında *M. haemolytica*, *P. multocida* ve *M. ovipneumoniae* gibi etkenler başta gelmektedir (Damassa ve ark. 1992, Di Provvido ve ark. 2017). Bu etkenler arasında *Mycoplasma* türleri önemli yer tutmakta ve pnömoni vakalarında gerek primer etken (Al- Aubaidi ve ark. 1972, Thurley ve ark. 1977) gerekse diğer bakteri ve viruslarla beraber sekonder etken (Bakke 1982, Malone ve ark. 1988, Tabatabayi ve ark. 1992) olarak yer almaktadır. Koyun pnömoni vakalarından *Mycoplasma* türleri, çalışılan yöre, hayvan ırkı ve yaşına göre değişmek üzere farklı oranlarda saptanmıştır. St George (1972) tarafından Avustralya’ da yapılan bir çalışmada pnömonik 66 koyun akciğer örneğinin %56’ sında *Mycoplasma* spp., %43.93’ ünde ise diğer etkenler (*Pasteurella* spp. *Neisseria* ve *C. pyogenes*) saptanmıştır. Yugoslavya’ da yapılan bir çalışmada ise pnömonili 77 koyun akciğerinden %66.2 oranında *Mycoplasma* spp. izole edilmiş ve bunların %69’ u *M. ovipneumoniae*, %27’ si *M. arginini* ve %4’ ü *A. laidlawii* olarak tanımlanmıştır (Pasic ve Popovic 1989). Tabatabayi ve ark. (1992), pnömonili 62 koyun akciğerinin 49’ undan (%79.03) ve sağlıklı koyun akciğerlerinin %6.5’ inden *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiştir. Ayrıca araştırmacı, pnömonik akciğerlerden *P. multocida*, *P. haemolytica*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. saptamıştır. Popovic ve Pasic (1986), pnömonik 32 kuzu akciğerinin 26’sından (%81.25) ve 45 koyun akciğerinin 25’ inden (%55.55) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bakke (1982), pnömonili 126 koyun akciğerinden 109’ unda (%86.5) ve sağlıklı 83 akciğerin 5’ inden (%6.02) *M. ovipneumoniae* saptamıştır. Ayrıca araştırmacı, *M. ovipneumoniae*’ nın *P. haemolytica* ile genellikle beraber

izole edildiğini bildirmiştir. Benzer durum Gharozoglou ve ark. (1992) tarafından da bildirilmiş ve pnömonik 88 koyun akciğerinin 56' sında (%63.63) *M. arginini* saptamışlar ve bunların 34' ünü *P. haemolytica* ile beraber identifiye etmişlerdir. Di Provvido ve ark. (2017), İtalya' da inceledikleri pnömonik 380 koyun ve keçi akciğerlerinden %32.36 oranında (129/380) etken izolasyonu gerçekleştirirken, bunların 85' ini *Mycoplasma* spp. ve kalan 44 örneği ise *M. haemolytica* ve *P. multocida* olarak tanımlamışlardır. Abdel Halium ve ark. (2019), Mısır' da yaptıkları bir çalışmada sağlıklı görünümlü ve solunum sistemi rahatsızlığı olan koyun ve keçilerden aldıkları nazal svap, akciğer, trakeal bifurkasyon ve bronşial yıkantı örneklerinden oluşan toplam 335 örnekte Mikoplazma etkenlerinin kültürünü denemişler ve örneklerin 24' ünden (%7.16) *Mycoplasma* etken izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Türkiye' de koyun pnömonilerinden Mikoplazma etken izolasyonuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Baysal ve Güler 1992, Aksoy 1993, Ülgen ve ark. 1997, Erken 2004). Aksoy (1993), pnömonili 118 koyun akciğerinden 26' sından (%22.03) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiş ve bunların 20' sini *M. arginini* olarak identifiye etmiştir. Araştırmacı, Mikoplazma etkenleriyle beraber %21.4 diğer bakteriler, %9.8 viruslar ve %6.25 paraziter etkenleri de saptamıştır. Baysal ve Güler (1992), 1 yaşın altında kuzu ve oğlaklardan alınan 186 örnekte bakteriyolojik analiz sonrası 147' sinden (%79.03) 222 bakteri izole etmişlerdir. Bu bakterilerin %28.82' si *E. coli*, %21.62' si *P. multocida*, %18.46' sı *Mycoplasma* spp., %10.81' i *Streptococcus* spp., %5.4' ü *C. pyogenes*, %3.6' sı *K. pneumoniae*, %3.6' sı *P. aeruginosa* ve %1.35' i *Neisseria* spp. olarak tanımlanmıştır. İzole edilen 41 *Mycoplasma* spp.' nin 11' i tek başına, 30' u diğer etkenlerle beraber bulunmuştur. Ülgen ve ark. (1997), Bursa' da yaptıkları bir çalışmada pnömonili 71 koyun akciğerinin 7' sinden (%9.85) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Erken (2004), Samsun yöresinde yaptığı bir çalışmada pnömonili 200 koyun ve kuzu akciğerinin 11' inde (%5.5) *M. ovipneumoniae*, 11' inde (%5.5) *M. arginini* ve 5' inde (%2.5) *M. agalactiae* olmak üzere toplam 27' sinden (%13.5) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiştir. Kars yöresinde Otlu (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, 1354 koyun akciğeri makroskopik olarak incelenmiş ve pnömoni saptanan 120 akciğer örneği ile Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarına

teşhis amacıyla getirilen pnömonik 127 koyun akciğer örneği olmak üzere toplam 247 örnek incelenmiştir. Bu örneklerden 61' inde (%24.69) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiştir. Araştırmacı, *Mycoplasma* spp. harici, akciğer örneklerinin 56' sında *P. haemolytica*, 11' inde *Staphylococcus* spp., 5' inde *Streptococcus* spp., 5' inde *E. coli* ve 4' ünde *B. anthracis* identifiye etmiştir. Bu çalışmada, Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerinden alınan pnömonili 250 koyun akciğerlerinin kültürel analizi sonucu 26' sından (%10.4) *Mycoplasma* spp. izole edilmiştir. Mikoplazmaların identifikasyonu koloni morfolojisi 16S rRNA gen amplifikasyonunu hedef alan cins spesifik PCR reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir ve 26 izolatın tümü *Mycoplasma* spp. olarak identifiye edilmiştir. İzolasyon oranı, dünyanın çeşitli yerlerinde pnömonik koyun akciğerlerinden yapılan izolasyon çalışma oranlarıyla kıyaslandığında (St George 1972, Popovic ve Pasic 1986, Bakke 1982, Tabatabayi ve ark. 1992, Gharozoglou ve ark. 1992) oldukça düşük kalmıştır. Bunun temel nedeni çalışılan coğrafyaların farklı olması ve buna bağlı olarak *Mycoplasma* türlerinin koyun pnömonilerindeki yaygınlığıdır. Ayrıca izolasyon oranının yüksek olması pnömoni vakalarının çalışılan ülke şartlarında daha yaygın olduğunu düşündürmektedir. Nitekim bu çalışmada, ülkemizde yapılan araştırmalarda (Baysal ve Güler 1992, Aksoy 1993, Ülgen ve ark. 1997, Erken 2004) elde edilen izolasyon oranlarına yakın izolasyon gerçekleştirilmiştir. Kars yöresinde yapılan bir çalışmada %24.69 oranında *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiştir (Otlu 1996). Bu çalışmadaki izolasyon oranı Kars yöresinde yapılan bu çalışmaya benzerlik gösterse de çalışılan zaman diliminin farklı olması ve geçen bu zaman zarfında artan koruma kontrol önlemlerine paralel olarak Mikoplazma pnömonilerinin azalan insidansına bağlı olabileceği şeklinde düşünülmektedir.

Mikoplazma enfeksiyonlarında klinik bulgular diğer bakteriyel ve viral enfeksiyonlar ile karıştığı için ve akciğerlere ait patolojik bulgular patognomik olmadığı için sadece bu bulgulara bakılarak teşhisinin yapılması imkânsızdır. Ayrıca koyunlarda Mikoplazma kaynaklı pnömonilerde kronik nezle, bronşiyolit, alveolit ve atelektazi gibi spesifik olmayan mikroskobik lezyonları oluşmaktadır (Black ve ark. 1988, Hazıroğlu ve ark. 1996, Sheehan ve ark. 2007). Klinik ve morfolojik

bulgular yeterli olmadığı için Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisi laboratuvar analizleri ile gerçekleştirilir. Bu amaçla etken izolasyonu ve identifikasyonu, biyokimyasal ve serolojik testler kullanılmaktadır (Stalheim 1985, Erdağ ve Türkaslan 1989, Giangaspero ve ark. 2012). Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde akciğer dokusunda antijenik yapıların saptanması amacıyla immunohistokimyasal (IH) yöntemlerden de faydalanılmaktadır (Hazıroğlu ve ark. 1996, Sheehan ve ark. 2007). Mikoplazma enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisinde etken izolasyonu ve identifikasyonu altın standart olarak bilinmektedir. Mikoplazmaların kültüründe birçok selektif ve zenginleştirici sıvı ve katı besiyeri kullanılmaktadır. Bu amaçla PPLO besiyeri, Mycoplasma besiyeri, Modifiye Hayflick besiyerinden faydalanılmaktadır. Kılıc ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada pnömonili koyun ve kuzu akciğerlerinden Mikoplazmaların kültürel yöntemlerle izolasyon ve PCR ve immunohistokimyasal yöntemlerle identifikasyonu gerçekleştirilmiş. Araştırmacılar, kültürel yöntemlerle 216 örnekten 80' inde (%37.03) Mikoplazma izolasyonu gerçekleştirirken, örneklerin sıvı kültürü (%44.44) ve direkt akciğer (%16.66) örneklerine yapılan direkt PCR analizlerinde farklı pozitiflik elde etmişlerdir. Kabir ve Bari (2015), tarafından keçilerde yapılan bir çalışmada akciğer eksudatı, trakeal svap, nazal kavite ve akciğer doku örneklerinden kanamisin ilaveli Mikoplazma Agar ve Mikoplazma Broth besiyerleri kullanılarak Mikoplazma etkenlerinin izolasyonu denenmiştir. Araştırmacılar, inceledikleri 100 örnekten 8' inde (%8) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Otlu (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, pnömonili 247 koyun akciğer örneğinden *Mycoplasma* türlerinin izolasyonu amacıyla Mikoplazma Agar besiyeri kullanılmış ve bu örneklerden 61' inde (%24.69) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerinden temin edilen pnömonili 250 koyun akciğerlerinden Mycoplasma Broth ile hazırlanan homojenatından etken izolasyonu amacıyla %20 at serumu ve %10 maya ekstraktı ile zenginleştirilen, 200 IU/ml penisilin ve 250 mg talyum asetat ile selektivite kazandırılan Mycoplasma Agar ve Mycoplasma Broth kullanıldı. Kültürel analizi yapılan pnömonili 250 koyun akciğerlerininin 26' sından (%10.4) *Mycoplasma* spp. izole edildi. İzolasyon oranı, Mikoplazma Agar ve Mikoplazma Broth' un kültürel amaçlı kullanıldığı çalışmalardaki (Otlu 1996, Kılıc ve ark. 2013,



Kabir ve Bari 2015) izolasyon oranlarına yakın niteliktedir. Mikoplazma Agar ve Mikoplazma Broth sadece koyun pnömoni vakalarında değil koyun ve sığırlardan temin edilen eklem sıvısı, göz svabı, burun svabı, süt ve uterus lavajı gibi örneklerden Mikoplazma etkenlerinin izolasyonu amacıyla da kullanılmıştır (Özen ve ark. 2009, Göçmen ve ark. 2015, Sayın ve ark. 2016). Tüm bu çalışmalarda zenginleştirilmiş ve selektivite kazandırılmış Mikoplazma Agar ve Mikoplazma Broth'un *Mycoplasma* türlerinin izolasyonundaki etkinlikleri vurgulanmıştır.

Mikoplazma etkenlerinin ön tanısı, uygun katı besiyerlerinde üretildikten sonra stereo mikroskopta gözlenen tipik “sahanda yumurta” veya “granüllü merkezli” koloniler varlığı ile yapılabilmektedir. Koloni yapısındaki bu farklılıklar *Mycoplasma* türüne göre değişmektedir. Şöyle ki, pnömonik akciğerlerden izole edilen ve *M. ovipneumoniae* türü için katı besiyerinde granüler, merkezli ve kenarları düzensiz koloni yapısı tanımlanırken, *M. arginini* türü için merkezi belirgin olan, kenarları düzgün ve tipik sahanda yumurta benzeri koloni yapıları tanımlanmıştır (Bakke 1982, St George ve Carmicheal 1975). Bu çalışmada, Mikoplazmaların ön tanısı katı besiyerinde ve stereo mikroskop altında gözlenen koloni morfolojisi temeline dayalı olarak gerçekleştirildi. Mycoplasma Agar' da x40 büyütme stereo mikroskobunda *Mycoplasma* spp. şüpheli farklı koloni yapılarına rastlandı. Bunlar arasında tipik sahanda yumurta görünümü, merkezli ve kenarları düzgün kolonilerin yanı sıra, merkezli ve kenarları düzensiz koloni yapıları saptandı. Bu bulgular *Mycoplasma* türlerinde gözlenebilecek koloni varyasyonlarını ifade eden birçok çalışma ile benzer niteliktedir (Bakke 1982, St George ve Carmicheal 1975). Tipik koloni şekilleri, *Mycoplasma* türlerinin morfolojik ve ultrastrüktürel yapılarının değerlendirilmesi ve Mikoplazma enfeksiyonlarının ön tanısı için fikir vermekle beraber, taksonomik ve koloni yapısı bakımından Mikoplazmalara benzer olan *Acholeplasma* ve *Ureaplasma* türlerinin varlığının göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Meloni ve ark. 1980). Bu çalışmada koloni morfolojilerine göre *Mycoplasma* spp. ön tanısı konulan örneklerin PCR aracılığı ile *Mycoplasma* spp. olarak teyidi yapılmış ve benzer özellikler gösteren diğer bakterilerden kaynaklanabilecek riskler ortadan kaldırılmıştır.

Koyun pnömonilerinde izole edilen temel *Mycoplasma* türü *M. ovipneumoniae*' dir (Besser ve ark. 2012). Bu etken aynı zamanda sağlıklı hayvanların solunum sisteminde de bildirilmiştir (Damassa ve ark. 1992). *M. arginini*' nin ise patojen olup olmadığı tartışma konusudur. Bu etkenin, diğer mikroorganizmalardan kaynaklanan pnömoni tablolarını daha da şiddetlendirdiği bildirilmiştir (Lin ve ark. 2008, Nicholas ve ark. 2008). Dominant tür olan *M. ovipneumoniae* tarafından koyunlarda oluşturulan tablo atipik pnömoni olarak adlandırılır. Aynı zamanda bu etken tarafından başlatılan enfeksiyonun, hayvanları *M. haemolytica* ve Parainfluenza- 3 (PI3) virüsüne duyarlı hale getirdiği düşünülmektedir (Nicholas ve ark. 2008). Koyun ve kuzularda solunum sisteminden izole edilen diğer *Mycoplasma* türleri ise *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *M. bovis* ve *M. agalactiae*' dir (Nicholas 2000, Loria ve ark. 2003, Ayling ve ark. 2004, Erken 2004). *M. ovipneumoniae* enfeksiyonu özellikle ABD, Avustralya, Yeni Zelanda ve Birleşik Krallık' ta koyun yetiştiriciliğinde endemik bir sorundur (Martin 1996). Bakke, Norveç' in güneyinde yaptığı bir çalışmada, 126 pnömonili ve 83 sağlıklı toplam 209 koyun akciğer örneğini incelemiş ve pnömonili akciğerlerin %87' si ve sağlıklı akciğerlerin %6' sından *M. ovipneumoniae*' yı primer etken olarak izole etmiştir (Bakke 1982). Pasic ve Popovic (1989), pnömonili 71 koyun akciğerinin 51' inde (%66.2) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiş ve bunların 35' ini (%49.29) *M. ovipneumoniae* ve 14' ünü (%19.71) *M. arginini* olarak tanımlamışlardır. Adehan ve ark. (2006) tarafından Benin' de yapılan bir çalışmada pnömonik koyun ve keçilerden alınan 100 akciğer örneklerinin 44' ünden (%44) toplam 50 *Mycoplasma* spp. izole etmişler ve bunların 18' ini *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, 10' unu *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, 8' ini *M. ovipneumoniae* (sadece koyunlardan) 8' ini *M. arginini* ve 6' sını *M. capricolum* subsp. *capricolum* (sadece keçilerden) olarak tanımlamışlardır. Bir başka çalışmada, Sheehan ve ark. (2007), bronkopnömonili 30 koyun akciğerinden 22' sinde (%73.33) *M. ovipneumoniae* izole ederken bu örneklerin 4' ünde (%13.33) aynı zamanda *M. arginini* saptamışlardır. *M. arginini*' nin dominant etken olduğu çalışmalar da bildirilmiştir (Güler 1993, Otlu 1996, Abdel Halium ve ark. 2019). Güler (1993), kuzu, koyun, oğlak ve keçi akciğerinden oluşan 215 örnekten 91' inde (%42.32) *Mycoplasma* spp. izole etmiş ve

bunların 66' sını (%72.52) *M. arginini*, 23' ünü (%25.27) *M. ovipneumoniae*, 1' ini (%1.09) *M. mycoides* subsp. *capri* ve 1' ini (%1.09) *M. agalactiae* olarak tanımlamıştır. Otlu (1996), koyun pnömonilerinden %70.5 oran ile *M. arginini*' yi predominant tür olarak bildirmiştir. Abdel Halium ve ark. (2019), Mısır' da yaptıkları çalışmada sağlıklı ve solunum sistemi hastalığı olan koyun ve keçilerden aldıkları nazal svap, akciğer, trakeal bifurkasyon ve bronşial yıkantı gibi çeşitli örneklerden %7.16 oranında (24/335) Mikoplazma etken izolasyonu gerçekleştirmişler ve bunların 10' unu *M. arginini*, 4' ünü *M. ovipneumoniae* olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar, kalan 10 örneği ise tür düzeyinde identifiye edememişlerdir. Koyun pnömonilerinde en yaygın *Mycoplasma* türleri olan bu iki etken aynı zamanda nazal svap örneklerinden de saptanmıştır (Alley ve ark. 1975, St George ve Carmichael 1975, Brogden ve ark. 1988). Ayrıca bu etkenlerin varlığı sağlıklı hayvanlarda da bildirilmiştir ve bazı *Mycoplasma* türlerinin üst solunum yolu kommensali olabileceği belirtilmiştir (Bakke 1982, Brogden ve ark. 1988). Türkiye' de koyunlarda Mikoplazma pnömonileri üzerine yapılan çalışmalarda ise izole edilen etkenler arasında *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* ve *M. agalactiae* yer almaktadır (Güler 1993, Erken 2004). Güler (1993) tarafından Konya' da yapılan bir çalışmada pnömonili 115 koyun ve keçi akciğer örneğinin 50' sinde (%43.47) ve kesimevlerinden alınan pnömonili 100 akciğer örneğinin 36' sından (%36) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiştir. Araştırmacı, *M. arginini*' yi en yüksek oranda saptamıştır. Ülgen ve ark. (1997), Bursa' da yaptıkları bir çalışmada pnömonili 71 koyun akciğerinin 7' sinden (%9.85) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Baysal ve Güler (1992), 186 kuzu ve buzağı akciğerinden çeşitli mikroorganizmalar izole etmiş ve bunların 147' sini *Mycoplasma* spp. olarak belirlemişlerdir. Erken (2004) tarafından Samsun' da yapılan bir çalışmada pnömonili 200 koyun ve kuzu akciğerinin 11' inde (%5.5) *M. ovipneumoniae*, 11' inde (%5.5) *M. arginini* ve 5' inde (%2.5) *M. agalactiae* olmak üzere toplam 27' sinde (%13.5) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirmiştir. Kars yöresinde Otlu (1996) tarafından yapılan bir çalışmada 247 koyun akciğer örneğinin 61' inden (%24.69) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bunların 43' ü (%70.5) *M. arginini* ve 18' i (%29.5) *M. ovipneumoniae* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerinden alınan pnömonili 250 koyun

akciğerlerinin kültürel analizi sonucu 26' sından (%10.4) *Mycoplasma* spp. izole edilmiştir. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonunu hedef alan primerlerin kullanıldığı tür spesifik PCR analizi sonrası 12' si (%46.15) *M. ovipneumoniae* ve 4' ü (%15.38) *M. arginini* olarak saptanmıştır. İzolatlardan 2' sinde (%7.69) *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* eş zamanlı olarak belirlenmiştir. *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan 26 izolattan 8' i (%30.76) araştırılan *Mycoplasma* türleri (*M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*) yönünden negatif saptanmıştır. Çalışmada *M. ovipneumoniae* toplamda 14 (%53.84) izolat ile dominant tür olarak belirlenmiş, bunu 6 (%23.07) ile *M. arginini* takip etmiştir. Bu bulgular izolasyon oranları ve izole edilen türler bakımından farklılık gösterse de diğer çalışmalarda (Pasic ve Popovic 1989, Güler 1993, Erken 2004, Adehan ve ark. 2006, Sheehan ve ark. 2007, Azizi ve ark. 2011, Abdel Halium ve ark. 2019) olduğu gibi koyun pnömonilerinde saptanan *Mycoplasma* türlerine benzerlik göstermektedir ve Kars yöresinde pnömonili koyun akciğerlerinde saptanan temel *Mycoplasma* türleri olmuştur. Tamamı pnömonik koyun akciğerlerinden izole edilen *M. arginini*' nin olgulardaki etiyolojik etken olarak rolü ve patojenitesi ile ilgili ilave testlere ihtiyaç duyulabilir. Kültürel işlemler ve cins spesifik PCR analizi ile *Mycoplasma* spp. olarak saptanan 8 izolatin araştırılan *Mycoplasma* türleri yönünden negatif saptanması ise koyunlarda pnömonilere yol açacak diğer *Mycoplasma* türleri yönünden dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir. İki örnekte *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* türlerinin eş zamanlı saptanması bu iki tür tarafından oluşturulması muhtemel olan (Brogden ve ark. 1988, Adehan ve ark. 2006, Sheehan ve ark. 2007) ortak enfeksiyonun varlığını işaret etmektedir.

Uygun katı ve sıvı besiyerinde kültürel işlemler Mikoplazma etkenlerinin teşhisinde altın standart olarak bilinmesine rağmen, inkübasyonun uzun zaman alması ve zahmetli olması araştırmacıları daha hızlı sürede ve yüksek hassasiyetle sonuç veren alternatif yöntemlerin kullanımına teşvik etmiştir. Bu yöntemler içerisinde *in vitro* DNA amplifikasyonunun yapıldığı PCR temelli moleküler yöntemler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla 16S rDNA- PCR, AFLP-PCR, RFLP- PCR, RAPD- PCR gibi yöntemlere başvurulabilmektedir (Parham ve ark. 2006, Harvey ve ark. 2007, Nicholas ve ark. 2008). Timenetsky ve ark. (2006)

tarafından yapılan bir çalışmada 301 hücre kültüründe *Mycoplasma* türleri kültürel ve PCR ile araştırılmış ve kültürel yöntemlerle örneklerin 69' unda (%22.9) ve PCR yöntemi ile 93' ünde (%30.9) pozitiflik saptanmıştır. Araştırmacılar, cins spesifik PCR ile negatif saptanan 5 (%5.4) örnekte kültür pozitifliği elde etmişlerdir. Uphoff ve Drexler (2002), Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde kültür ve PCR kombinasyonunun en çok tavsiye edilen yöntem olduğu bildirilmiştir. Kılıc ve ark. (2013), koyun ve kuzudan alınan pnömonik 216 örneğin PCR ile 96' sında (%44.44) ve kültürel işlemlerle 80' inde (%37.03) Mikoplazma pozitifliği elde etmişlerdir. Araştırmacılar tarafından, cins spesifik PCR pozitif 8 örnekte *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* DNA' sı saptanamamış ve bu örneklerin diğer *Mycoplasma* türleri olarak yorumlanmıştır. PCR pozitif birkaç örneğin kültür negatif sonuçlanması ise araştırmacılar tarafından kontaminantların varlığı veya kesimden önce antibiyotik kullanımı nedeniyle izolasyonun yapılamayışı şeklinde yorumlanmıştır. Bu çalışmada, kültürel işlemlerle izole edilen 26 *Mycoplasma* izolatının moleküler düzeyinde identifikasyonu amacıyla 16S rRNA gen amplifikasyonunu hedef alan primer çiftlerinin kullanıldığı cins spesifik PCR ve tür spesifik PCR reaksiyonlarından yararlanılmıştır. Cins spesifik PCR analizi ile, kültürel işlemler sonrası elde edilen izolatların *Mycoplasma* spp. olarak teyidi ve tür spesifik PCR analizi ile izolatların tür düzeyinde identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Cins spesifik PCR analizi sonucu 26 izolatın tümü *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanırken, tür spesifik PCR analizi sonrası izolatların 12' si (%46.15) *M. ovipneumoniae* ve 4' ü (%15.38) *M. arginini* olarak tanımlanmıştır. İzolatlardan 2' sinde (%7.69) *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* eş zamanlı olarak belirlenirken, *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan 8 (%30.76) izolat araştırılan *Mycoplasma* türleri (*M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*) yönünden negatif saptanmıştır. Çalışmada pnömonik akciğer örneklerinden etken tanımlanmasına yönelik direkt PCR işlemi uygulanmadığı için kültür ve PCR yöntemlerinin Mikoplazma etkenlerinin teşhisinde etkinliği, hassasiyeti ve karşılaştırmalı analizi yapılamamıştır. Ancak *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan izolatların teyidinde kültürel işlemlerle karşılaştırıldığında cins spesifik PCR büyük bir uyum göstermiştir. Benzer bir durum Weiser ve ark. (2012) tarafından 14 Amerikan yaban koyunundan alınan 22 adet orofaringeal svap örneğinden *Mycoplasma* türlerinin kültür ve PCR yöntemleriyle karşılaştırmalı

analizi çalışmasında da bildirilmiştir. Araştırmacılar, Hayflick zenginleştirme brothu ile Mikoplazma cins ve tür spesifik PCR yöntemlerini karşılaştırdıkları bu çalışmada *M. arginini* türünün tanımlanmasında her iki yöntem ile aynı sonucu elde ederken, *M. ovipneumoniae*'nin tanımlanmasında PCR yöntemini daha etkili bulmuşlardır. Kültürel yöntemlerle *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan izolatların teyidinde %100 uyum gösteren cins spesifik PCR yöntemi, incelenen türler yönünden negatif saptanan örneklerde diğer *Mycoplasma* türlerinin tespitine olanak sağlaması bakımından da önemlidir. Zenginleştirilmiş ve selektivite kazandırılmış besiyerlerinin kullanıldığı kültür yöntemiyle etken izolasyonu takiben izolatların Mikoplazma cins ve tür spesifik PCR ile analizleri, koyunlarda Mikoplazma etkenlerinin tanımlanmasında güvenilir bir yol olarak görülmektedir.

Mikoplazma etkenlerinin teşhisinde kültürel yöntemlere alternatif olarak PCR ve DNA dizileme teknikleri de kullanılmaktadır. Dizi analizlerinde ribozomal RNA (rRNA), GroEL şaperon, RNA polimeraz beta alt ünitesi (rpoB), DNA giraz beta alt ünitesi (gyrB) gibi yüksek oranda korunan gen bölgeleri sıklıkla kullanılmakta ve bu bölgeler filogenetik analizlerin temelini oluşturmaktadır. Bakteriyel 16S rRNA gen dizilerinin ulaşılabilir olması ve mevcut veri tabanlarında yer alması bu gen bölgesinin analizini birçok moleküler uygulamada popüler bir hedef haline getirmiştir. Değişken bölgelerin yanı sıra 16S rRNA genlerinin korunmuş bölgeleri de içermesi bu bölgelere bağlanan üniversal primerlerin tasarlanmasına olanak sağlamıştır (Turan ve ark. 2018). Koyun ve keçilerde 16S rRNA gen bölgesinin kullanıldığı Mikoplazma etkenlerinin teşhisi ve filogenetik analizi üzerine birçok çalışma mevcuttur (Azizi ve ark. 2011, Kalshingi ve ark. 2015, Abdel Halium ve ark. 2019). Azizi ve ark. (2011), pnömonik koyun akciğerlerinden *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* türlerinin 16S rRNA temelli PCR tekniği ile tanımlanması amaçlanmış ve olguların %20' sinde *M. ovipneumoniae* ve %2.5' inde *M. arginini* bildirmişlerdir. Kalshingi ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, Güney Afrika' da sağlıklı ve hasta (vulvitis ve balanitis) koyunlardan izole edilen 34 *Mycoplasma* türünün PCR, klonlama ve gen sekans analizi ile karakterize edilmiş ve BLAST analizi sonrası koyunlardan izole edilen dominant *Mycoplasma* türleri, *M. arginini*, *M. bovis genitalium*, *A. laidlawii*, MmmLC, *Mycoplasma* sp. *ovine/caprine* serogroup II

ve *M. canadense* olarak tanımlanmıştır. Abdel Halium ve ark. (2019), koyunlardan izole ettikleri birer adet *M. arginini* ve *M. ovipneumoniae* suşunun 16S rRNA gen bölgesinin kısmı dizi analizini gerçekleştirmişler ve farklı türlerden (koyun, keçi ve yabani üreme maddeleri) ve farklı ülkelerden bildirilen suşlarla yüksek sekans benzerliğine sahip olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada, kültürel yoklamalar ve PCR analizleri sonucu *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan izolatların sekansı amacıyla 16S rRNA geninin amplifikasyonunu hedef alan PCR tekniği uygulanmış ve 26 izolatın 20' sine (%76.92) ait 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi sonrası izolatların 22' sinin (%84.61) başarılı bir şekilde dizi analizi gerçekleştirilirken, cins spesifik PCR ile *Mycoplasma* spp. saptanan 3 örnek ile tür spesifik PCR ile *M. ovipneumoniae* saptanan 1 örnek dahil toplam 4 örneğin DNA konsantrasyonu, DNA saflığı ve 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu ile ilgili problemlerden dolayı sekanslanamamıştır. Tür spesifik PCR ile *M. ovipneumoniae* tanımlanan 11 örneğin tümü 16S rRNA bölgesinin sekansı sonucu *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* tanımlanan 4 örneğin tümü *M. arginini* olarak tanımlanmıştır. Tür spesifik PCR ile *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*' nin eş zamanlı olarak belirlendiği 2 örnek ise 16S rRNA gen bölgesinin sekansı sonrası *M. arginini* olarak tanımlanmıştır. Cins spesifik PCR ile *Mycoplasma* spp. olarak tanımlanan 5 izolat ise 16S rRNA gen bölgesinin sekansı sonucu *M. bovis genitalium* olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak, 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi sonrası 22 izolatın 11' i (%50) *M. ovipneumoniae*, 6' sı (%27.27) *M. arginini* ve 5' i (%22.72) *M. bovis genitalium* olarak tanımlanmıştır. Tür spesifik PCR yöntemiyle tanımlanmış *Mycoplasma* türleri ile 16S rRNA gen bölgesinin sekansı sonrası elde edilen türler %100 uyum içerisindedir. Mikoplazma etkenlerinin fenotipik yöntemlerle tanımlanması zor, zahmetli ve zaman alıcı olup bazen yanlış sonuçlara sebep olabilmektedir. Şöyleki, yaklaşık 23 yıl önce aynı yörede pnömonli koyun akciğerlerinden Mikoplazma etkenlerinin izolasyonu ve tanımlanması amacıyla yapılan bir çalışmada örneklerin 61' inde (%24.69) *Mycoplasma* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bunların 43' ünü (%70.5) *M. arginini* ve 18' ini (%29.5) *M. ovipneumoniae* olarak tanımlanmıştır (Otlu 1996). Oysa yürütülen bu çalışmada

pnömonili koyun akciğerlerinde izole edilen Mikoplazma izolatlarının PCR temelli moleküler analizi sonucu 11' i (%50) *M. ovipneumoniae*, 6' sı (%27.27) *M. arginini* ve 5' i (%22.72) *M. bovisgenitalium* olarak tanımlanmıştır. Bu durum Mikoplazmaların tanısında moleküler yöntemlerin önemini ve değerini ortaya koymaktadır.

Tür spesifik PCR ile *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* ortak enfeksiyonu saptanan iki örnek, 16S rRNA dizi analizi sonrası *M. arginini* olarak saptanmıştır. Bu durum aslında pnömonik akciğerde ortak bir enfeksiyonu gösterirken, dizi analizinde kullanılmak üzere DNA' nın tek bir bakteriyi temsilen saf bir şekilde seçilmediği ve *M. arginini*' ye ait DNA' nın kalite ve konsantrasyon bakımından daha yoğun olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmada ayrıca pnömonik 5 adet koyun akciğerlerinden *M. bovisgenitalium* türü de tanımlanmıştır. Konak spektrumu içerisinde yer almadığı *M. bovisgenitalium* suşlarına koyunların konaklık yapmaları oldukça ilginçtir. Çalışmanın başlangıcında öngörülemediği için PCR analizlerinde değerlendirme dışı kalan bu tür ancak 16S rRNA dizi analizi sonrası *M. bovisgenitalium* olarak tanımlanmıştır. Bu durum son dönemlerde *M. bovisgenitalium*' un koyun ve keçilerde gerek deneysel gerekse doğal genital sistem ve memeden artan izolasyon bildirimleri (Ball 1990, Chima ve ark. 1995, Maksimovic ve ark. 2013, Kalshingi ve ark. 2015) ile uyum içerisinde. Bu çalışmada tanımlanan 5 adet *M. bovisgenitalium* izolatı koyun pnömonileri adına ilk uluslararası bildirimdir. Soğuk ve uzun kış şartlarının hâkim olduğu Kars yöresinde farklı hayvan türlerinin aynı çatı altında birlikte yetiştirilme alışkanlıkları, sığır orijinli olan *M. bovisgenitalium* etkeninin koyunlara bulaşmasında predispozisyon oluşturan bir faktör olarak speküle edilebilir. Yine de bu spekülasyonun doğrulanmasına ihtiyaç vardır ve eğer ulaşılabiliirse aynı işletmede yetiştirilen sığırlardan elde edilecek Mikoplazma suşlarıyla benzerlik analizlerinin fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Mikoplazmalar, 200' den fazla bakteri içeren Mollicutes adlı geniş bir sınıf içerisinde yer alan *Mycoplasmatales* takımının patojen üyeleridir. Mikoplazmaların taksonomisi ve filogenetiği ile ilgili birçok araştırma bulunmaktadır (Weisburg ve ark. 1989, Pettersson ve ark. 1994, 2000, Maniloff 2002). 16S rRNA gen bölgesi



esas alınarak yapılan ilk filogenetik sınıflandırma Weisburg ve arkadaşları tarafından 1989 yılında yapılmış ve Mikoplazmalar için Anaeroplazma, Asteroplazma, Hominis, Pnömonia ve Spiroplasma adı altında 5 filogenetik grup tanımlanmıştır (Weisburg ve ark. 1989). Sonraki yıllarda bu temel grupların içerisinde bazı yeni kümeler ve alt gruplar da tanımlanmıştır. Yalnız bu filogenetik sınıflandırma grupların monofiletik olmayışı ve farklı türleri barındırması nedeniyle taksonomisi ile bazen uyuşmamaktadır. Mollicutes'lerin taksonomisi 1993 yılında revize edilmiş ve genotipik, fenotipik ve kemotaksonomik çalışmalar sonucu mevcut olan 5 filogenetik gruba Entomoplazma ve Mesoplazma adıyla iki yeni grup daha eklenmiştir. Bunlar içerisinde 20' den fazla tür varlığı ile Hominis filogenetik grubu en geniş olanıdır. Veteriner Hekimlik alanında enfeksiyonlardan sorumlu olan *Mycoplasma* türlerinin büyük bir kısmı Hominis filogenetik grubu içerisinde yer almaktadır. Bunlardan *M. ovipneumoniae*, Hominis grubunun *M. neurolyticum* kümesinin içerisinde; *M. arginini*, Hominis grubunun *M. alkalescens* altkümesinin içerisinde ve *M. bovis genitalium* ise Hominis grubunun *M. bovis* kümesinin alt kümesi içerisinde yer almaktadır. Bu türler içerisinde *M. bovis genitalium* ve *M. ovipneumoniae* aynı branşta yer almalarına rağmen filogenetik olarak kısmen uzak mikroorganizmalardır. *M. arginini* ise *M. hominis* kümesinin diğer branşında yer almaktadır. Pettersson ve ark. (1994) tarafından yapılan bir çalışmada aralarında *M. ovipneumoniae*'nin de bulunduğu 11 yeni *Mycoplasma* türünün 16S rRNA gen bölgesinin direkt katı- faz DNA dizi analizi gerçekleştirilmiş ve veri bankasında yer alan suşlar ile karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, Hominis grubunun *M. neurolyticum* kümesi içerisinde yer alan *M. ovipneumoniae*'nin domuzlarda Mikoplazmozis etkenleri olan *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* ve *M. hyorhinae* ile büyük benzerlik gösterdiğini saptanmışlardır. Filogenetik çalışmalarda Mikoplazmalar  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -Mikoplazma branşlarına da ayrılmıştır (Maniloff 2002). Bu branşlar arasında  $\alpha$  ve  $\beta$ -Mikoplazmalar en yakın homolojiye sahip iken bu iki branş,  $\gamma$ -Mikoplazmalar ile aynı dalda yer alırlar.  $\delta$ -Mikoplazmalar ise tüm bu branşlarla en uzak olan gruptur.  $\alpha$ -Mikoplazmalar içerisinde *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. agalactiae* ve *M. meleagridis*;  $\beta$ -Mikoplazmalar içerisinde *M. hominis* ve *M. arginini*;  $\gamma$ -Mikoplazmalar içerisinde *M. ovipneumoniae* ve *M. conjunctivae* ve  $\delta$ -Mikoplazmalar içerisinde *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* ve *M. iowae* gibi önemli

insan ve hayvan patojenleri yer almaktadır. Benzer bir çalışma 16S rRNA gen bölgesinin analizi gerçekleştirilerek Pettersson ve ark. (2000) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar, Weisburg ve ark. (1989) tarafından bildirilen *M. hominis* kümesinin güncellenmesi amacıyla yaptıkları bu çalışmada bu kümede bulunan türlerin 16S rRNA gen dizilerinin %94 ve üzeri benzerlik gösterdiğini bulmuşlar ve yeni türlerin sınıflandırılmasında benzerliklerin hangi alanlarla kullanılabileceğini tartışmışlardır. Çalışmada, 10 farklı Mollicutes' in 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi gerçekleştirilmiş ve mevcut diğer türlerle karşılaştırılmıştır. Bunlardan *M. arginini*, *M. hominis* kümesi içerisinde *M. alkalescens* ile aynı branşta saptanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen 11 *M. ovipneumoniae* izolatından 1' i hariç kalan 10 *M. ovipneumoniae* izolatı (MYCO1, MYCO8, MYCO9, MYCO10, MYCO15, MYCO16, MYCO18, MYCO20, MYCO21, MYCO22) kendi aralarında büyük bir homojenite saptanmış fakat GenBank' tan elde edilen dizilerle polifiletik bir dallanma göstermiştir. Bu 10 izolat, ABD' nin Hells Kanyonu' nda yetiştirilen Amerikan yaban koyununa ait pnömonik kuzudan elde edilen *M. ovipneumoniae* (EU265779.1) izolatına (Besser ve ark. 2008) büyük bir benzerlik göstermektedir. Heterojenite gösteren 1 *M. ovipneumoniae* izolatı ise perifiletik özelliği ile (MYCO19) Norveç' de Misk öküzlerinden izole edilen *M. ovipneumoniae* (KJ433280.1) (Anonim 6) ile aynı branşta yer almıştır (Şekil 2). Çalışmada elde edilen dendogramın diğer bir kümesini oluşturan *M. arginini* izolatları birbirlerine yakınlık bakımından iki gruba ayrılmışlar ve polifiletik bir dağılım göstermiştir. Birinci grubu temsilen MYCO13 ve MYCO17 birbirlerine en yakın izolatlar iken bu iki izolat, Güney Afrika' da Dorper koyununa ait vajinal svap örneğinden izole edilen *M. arginini* (HQ661819) (Ali 2012) ve İngiltere' den orijini belli olmayan *M. arginini* suşu (GQ409971) (Anonim 4) ile büyük bir benzerlik gösteren MYCO7 kodlu *M. arginini* izolatı ile aynı branşta yer almıştır. İkinci grup ise birbirine çok yakın MYCO2 ve MYCO12 izolatları ile bu izolatlarla aynı branşta yer alan ve pnömonili koyun akciğerlerinden izole edilen ATCC 23243 kodlu *M. arginini* suşuna büyük bir benzerlik gösteren MYCO11 kodlu *M. arginini* izolatından oluşmaktadır (Şekil 2). Çalışmanın diğer filogenetik grubu ise *M. bovis genitalium* izolatlarından

oluşmaktadır. Bu izolatların 4' ü (MYCO3, MYCO4, MYCO5, MYCO14) kendi arasında homojenite ve monofiletik bir dağılım gösterirken bu 4 izolat, 1947' de Edward ve Beckenham (Anonim 5) tarafından sığır genital sisteminden izole edilen *M. bovis genitalium* suşu (NCTC 10122) ve *M. bovis genitalium* type strain (AY121098) ile benzerlik gösteren ve parafiletik bir dağılım gösteren MYCO6 kodlu 1 *M. bovis genitalium* izolatı ile aynı branşta yer almıştır (Şekil 2). Özet olarak bu çalışmada, 16S rRNA sekans analizine göre 22 *Mycoplasma* izolatı için komşu birleştirme yöntemi ile oluşturulan dendogram ve evrimsel ilişki sonucu izolatların tamamının Hominis filogenetik grubu içerisinde ve *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* ve *M. bovis genitalium* olmak üzere üç temel kümede toplandığı görülmüştür. Bu kümelere bakıldığında *M. arginini* ve *M. bovis genitalium* izolatları iki ayrı filogenetik pozisyon almalarına rağmen birbirlerine olan yakınlıkları, *M. ovipneumoniae* izolatlarına olan filogenetik yakınlıklarından daha fazladır. Bu durum, Maniloff (2002) tarafından bildirilen ve  $\alpha$ - Mikoplazmalar içerisinde yer alan *M. bovis genitalium* ile  $\beta$ - Mikoplazmalar içerisinde yer alan *M. arginini* arasındaki homolojiye benzer niteliktedir.

Sonuç olarak, Kars yöresinde mezbaha ve kesimevlerinden temin edilen pnömonili 250 koyun akciğer örneğinden yapılan izolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucu 26' sında Mikoplazma etkenleri tanımlanmıştır. Bu çalışmada Kars yöresinde koyun pnömonilerinde Mikoplazma prevalansı %10.4 olarak saptanmıştır. Mikoplazma kaynaklı solunum sistemi hastalıkları, canlı ağırlık artışında azalma ve ölüm gibi nedenlerle meydana gelebilecek bireysel veya sürü bazında verim kayıpları koyun yetiştiriciliği temelli ekonominin uygulanabilirlik ve sürdürülebilirliğini olumsuz etkilemektedir. Bu bağlamda bu çalışmada elde edilen Mikoplazma pozitifliği önemli ölçüdedir.

Kültürel yoklamalarla saptanan Mikoplazma etkenlerinin PCR temelli moleküler teknikler ve sekans analizleri sonrası, *M. ovipneumoniae* 11 izolat ile *Mycoplasma* türleri içerisinde predominant tür olarak saptanmış, bunu 6 izolat ile *M. arginini* ve 5 izolat ile *M. bovis genitalium* izlemiştir. Gerek izolasyon oranı gerekse tür çeşitliliği açısından yörede yapılan çalışmalarla bazı farklılıklar olsa da Kars

yöresinde koyunlarda pnömoni vakalarından sorumlu olan temel türler *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*' dir. Bu çalışmada olduğu gibi koyunlara ait çeşitli enfeksiyöz vakalardan *M. bovis*' un artan bildirimi ise bu etkenin konak spektrumuna koyunların da eklenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Yapılacak epidemiyolojik çalışmalarda ve koruma- kontrol programlarının planlanmasında koyunlarda patojen bir *Mycoplasma* türü olarak *M. bovis*' un da göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Birçok bakteriyel enfeksiyonun teşhisinde etken izolasyonu halen altın standart olarak görülmektedir. Bu çalışmada da selektif ve zenginleştirilmiş besiyerlerinin kullanıldığı ve pnömonik koyun akciğer örneklerinden Mikoplazma etkenlerinin izolasyonu yöntemine başvurulmuştur. İzolatların teyidi ve tür bazında analizi ise moleküler teknikler ve sekans analizleri ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon ve moleküler identifikasyon çalışma bulguları mikrobiyoloji alanında modern teknolojinin son ürünü olan sekans analizi sonuçları ile büyük uyum göstermiştir. Dünyada ve ülkemizde sekans analizi ve filogenetik gruplamaların giderek yaygınlaşması ve bu metodolojiye kolay ve ucuz erişim imkanı, konvansiyonel yöntemlere göre daha ergonomik olan bu yöntemlerin Mikoplazma etkenlerinin teşhisi ve taksonomik güncelleme, suş çeşitliliği ve varyant analizi, aşı geliştirmesi, tedavi yanıtının izlenmesi ve enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi gibi laboratuvar ve saha çalışmalarında fayda sağlayacağı ve bu yöntemlerin konvansiyonel yöntemlere kolaylıkla entegre edilebileceği öngörülebilir. Bu kapsamda, pnömonik koyun akciğerlerinden *Mycoplasma* türlerinin saptanmasında kültür, moleküler yöntemler ve sekans analizinin birlikte yapıldığı bu çalışmanın örnek teşkil edeceği umulmaktadır.

## 5. KAYNAKLAR

Abdel Halium MM, Salib FA, Marouf SA, Abdel Massieh ES: Isolation and molecular characterization of *Mycoplasma* spp. in sheep and goats in Egypt. *Vet World*, 12 (5): 664-670, 2019.

Abu- Amero KK, Halablab MA and Miles RJ: Nicin resistance distinguishes *Mycoplasma* species from *Acholeplasma* species and provides a basis for selective growth media. *Appl Environ Microbiol*, 62, 3107-3111, 1996.

Adehan RK, Ajuwape ATP, Adetosoye AI, Alaka OO: Characterization of Mycoplasmas isolated from pneumonic lungs of sheep and goats. *Small Rum Res*, 63, 44-49, 2006.

Afshar B, Pitcher D, Nicholas RAJ and Miles RJ: An evaluation of PCR methods to detect strains of *Mycoplasma fermentans*. *Biology*, 36, 117-121, 2007.

Akça D ve Şahin M: Kars yöresi sığırlarından alınan süt ve vajinal svap örneklerinden *Listeria* türlerinin araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 987-993, 2011.

Aksoy E: Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü' ne gelen koyun materyallerinde Mikoplazmal enzootik pnömoni olayları ve patolojik bulgular. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 7 (4): 172-197, 1993.

Al- Aubaidi JM, Taylor WD, Bubash GR, Dardiri AH: Identification and characterization of *Mycoplasma arginini* from Bighorn sheep (*Ovis canadensis*) and goats. *Am J Vet Res*, 33 (1): 87-90, 1972.

Ali H: Molecular Characterization of *Mycoplasma* Species Isolated from The Genital Tract of Dorper Sheep in South Africa. University of Pretoria, Faculty of Veterinary Science, Department of Veterinary Tropical Diseases, Magister Scientiae (Veterinary Science), South Africa, 2012.

Alley MR: The Pathogenesis of Pneumonia in Sheep. Massey University, PhD Thesis, New Zealand, 1975.

Alley MR, Ionas G, Clarke JK: Chronic non- progressive pneumonia of sheep in New Zealand- A review of the role of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *New Zealand Vet J*, 47, 155-160, 1999.

Amores J, Corrales JC, Martin AG, Sanchez A, Conteras A: Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in ear swabs taken from goats. *Vet Microbiol*, 140, 105-108, 2010.

Anonim 1: The University of Babylon. Mycoplasma: Clinical Manifestations. [http://www.uobabylon.edu.iq/uobcoleges/ad\\_downloads/8\\_27211\\_234.pdf](http://www.uobabylon.edu.iq/uobcoleges/ad_downloads/8_27211_234.pdf). Erişim 01.05.2019.

Anonim 2: [https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/307/3145350/PMC3145350\\_ECAM2011-209406.001.png](https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/307/3145350/PMC3145350_ECAM2011-209406.001.png). Erişim 01.05.2019.

Anonim 3: Wikipedia, 2019. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kars>. Erişim 01.05.2019.

Anonim 4: National Center for Biotechnology Information. *Mycoplasma arginini* strain 284F08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ409971.1/>. Erişim 07.05.2019.

Anonim 5: Public Health England. Bacteria Collection: *Mycoplasma bovis* <https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?refId=NCTC+10122&collection=nctc>. Erişim 07.05.2019.

Anonim 6: National Center for Biotechnology Information. *Mycoplasma ovipneumoniae* strain Dovre 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ433280.1/>. Erişim 07.05.2019.

Arslan S, Öncel T, Malal ME, Satır E, Sait A, Ünsal Baca A, Yaman Aydoğan D: Bacteriological, virological and parasitological etiology in diarrhea cases in determined in post-mortem lambs and kids in Marmara Region. *Van Vet J*, 27 (3): 147-152, 2016.

Ayling RD, Bashiruddin SE, Nicholas RAJ: *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain Between 1990 and 2000. *Vet Rec*, 155, 413-416, 2004.

Ayling R, Nicholas R, Hogg R, Wessels J, Scholes S, Byrne W, Hill M, Moriarty J, Brien T: *Mycoplasma bovis* isolated from brain tissue of calves. *Vet Rec*, 156, 391-392, 2005.

Azizi S, Tajbakhsh E, Rezaii A, Nekouei SH, Namjoo AR: The role of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in pneumonic lungs of slaughtered sheep. *Rev Med Vet*, 162, 310-315, 2011.

Bakke T: The occurrence of Mycoplasmas and bacteria in lungs from sheep in Southern Norway. *Acta Vet Scand*, 23 (2): 235-247, 1982.

Ball HJ: Experimental mastitis caused by *Mycoplasma bovis* and *M. canadense* in the ewe. *Vet Microbiol*, 22 (4): 383-388, 1990.

Bashiruddin JB: Extraction of DNA from Mycoplasmas. **In:** Miles R, Nicholas R (Eds): *Mycoplasma Protocols: A Laboratory Manual*. Humana Press, New Jersey, 1998.

Baysal T and Güler L: Bacterial agent isolation from kids and lamb with enzootic pneumoniae in Konya Region. *Veterinarium*, 3, 1-5, 1992.

Beier T, Hotzel H, Lysnyansky I, Grajetzki C, Heller M, Rabeling B, Yogev D, Sachse K: Intraspecies polymorphism of *vsp* genes and expression profiles of variable surface protein antigens (Vsp) in field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol*, 63, 189-203, 1998.

Belloy L, Vilei EM, Giacometti M, Frey J: Characterization of LppS, an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae*. *Microbiology*, 149, 185-193, 2003.

Besser TE, Cassirer EF, Potter KA, VanderSchalie J, Fischer A, Knowles DP, Herndon DR, Rurangirwa FR, Weiser GC, Srikumaran S: Association of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection with population-limiting respiratory disease in free ranging rocky mountain Bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*). *J Clin Microbiol*, 46, 423-430, 2008.

Besser TE, Highland M, Baker K, Cassirer EF, Anderson NJ, Ramsey JM, Mansfield K, Bruning DL, Wolff P, Smith JB, Jenks JA, Mansfield K, Bruning DL, Wolff P, Smith JB, Jenks JA: Causes of pneumonia epizootics among Bighorn Sheep, Western United States, 2008-2010. *Emerg Infect Dis*, 18 (3): 406-414, 2012.

Black SR, Barker IK, Mehre KG, Crawshaw GJ, Rosendal S, Ruhnke L, Thorsen J, Carman S: An epizootic of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection in captive Dall' s Sheep (*Ovis dalli dalli*). *J Wildl Dis*, 24, 627-635, 1988.

Boettger CM and Dohms JE: Separating Mycoplasma field strains from non- pathogenic avian Mycoplasmas. *Avian Dis Dig*, 1 (1): e21-e21, 2006.

Botes A, Peyrot BM, Olivier AJ, Burger WP, Bellstedt DU: Identification of three novel *Mycoplasma* species from ostriches in South Africa. *Vet Microbiol*, 111, 159-169, 2005.

Bredt W: Pathogenicity Factors of Mycoplasmas. *Infection*, 4, Suppl. 1, 9-12, 1976.

Bridre J and Donatien A: Le microbe de l' agalaxie contagieuse et sa culture in vitro. *Comptes rendus hebdomadaire des seances de l' Academie des Sciences, Paris*, 177, 841-843, 1923.

Brogden KA, Rose D, Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Tully JG: Isolation and identification of Mycoplasmas from the nasal cavity of sheep. *Am J Vet Res*, 49 (10): 1669-1672, 1988.

Büyük F, Celebi O, Şahin M, Ünver A, Tazegül E: İki farklı koyun ve keçi sürüsünde *Brucella* ve *Campylobacter* ortak enfeksiyonu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 17 (Suppl A), 177-180, 2011.

Carmichael LE, St George TD, Sullivan ND, Horsfall N: Isolation, propagation and characterization studies of an ovine Mycoplasma responsible for proliferative interstitial pneumonia. *Cornell Vet*, 62, 654-679, 1972.

Carter GR and Chengappa MM: *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia, US, 1991.

Cheng X, Nicolet J, Poumarat F, Regalla J, Thiaucourt F, Frey J: Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology*, 141, 3221-3228, 1995.

Clarke JK, Brown VG, Alley MR: Isolations and identification of Mycoplasmas from the respiratory tracts of sheep in New Zealand. *New Zealand Vet J*, 47, 591-596, 1974.

CLSI 2008: *Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline*. **In:** Institute CaLS (Ed): CLSI Document MM18- A. Wayne, PA, ABD, 2008.

Cole BC, Washburn LR and Taylor- Robinson D: Mycoplasma- induced arthritis. **In:** Razin S and Barile MF (Eds): *The Mycoplasmas*, Academic Press, Inc., Orlando, Fla, 1985.

Darzi MM, Sood N, Gupta PP, Banga HS: The pathogenicity and pathogenesis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (F38) in the caprine mammary gland. *Vet Res Commun*, 22 (3): 155-165, 1998.

De Castro LA, Rodrigues Pedroso T, Kuchiishi SS, Ramenzoni M, Kich JD, Zaha A, Henning Vainstein M, Bunselmeyer Ferreira H: Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion- related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Microbiol*, 116 (4): 258-269, 2006.

Di Provvido A, Averaimo D, Zilli K, Marruchella G, Scacchia M: *Mycoplasma pneumonia* in small ruminants: A ten- year long retrospective survey. *Small Rum Res*, 153, 103-106, 2017.

Diker KS: Veteriner Epidemiyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğrenci Ders Notları. Ankara, 1993.

Djordjevic SP, Forbes WA, Forbes- Faulkner J, Kuhnert P, Hum S, Hornitzky MA, Vilei EM, Frey J: Genetic diversity among *Mycoplasma* species bovine group 7: Clonal isolates from an outbreak of polyarthritis, mastitis, and abortion in dairy cattle. *Electrophoresis*, 22, 3551-3561, 2001.

Dubey JP and Lindsay DS: *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J Vet Diagn Invest*, 2, 230-233, 1990.

Dufour- Gesbert F, Dheilily A, Marois C, Kempf I: Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Vet Microbiol*, 114 (1-2): 148-154, 2006.

El Mahi MM and Nayil AA: Isolation of Mycoplasmas from pneumonic sheep lungs in the Sudan. *Res Vet Sci*, 24 (3): 314-317, 1978.

Erken N: The Isolation and Identification of Mycoplasma Species in Sheep and Lambs That Indicates Pneumonia in Samsun Region. Samsun Veterinary Control and Research Institute, MSc Thesis, Samsun, 2004.

Erno H: Mycoplasmosis of ruminants: A general introduction. *Rev Sci Tech OIE*, 6, 553-563, 1987.

Feberwee A, Dijkstra JR, von Banniseht- Wysmuller TE, Gielkens AL, Wagenaar JA: Genotyping of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis and digitalized Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet Microbiol*, 111, 125-131, 2005.

Ferguson NM, Hepp D, Sun S, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH, Garcia M: Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by Gene Targeted Sequencing (GTS) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiol*, 151, 1883-1893, 2005.

Fernandez S, Galapero J, Rey J, Pérez CJ, Ramos A, Rosales R, Ayling R, Alonso JM, Gómez L: Investigations into the seasonal presence of *Mycoplasma* species in fattening lambs. *Vet J*, 212, 80-82, 2016.

Fleury B, Bergonier D, Berthelot X, Peterhans E, Frey J, Vilei EM: Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. *Infect Immun*, 70 (10): 5612-5621, 2002.

Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM, Fritchman JL, Weidman JF, Small KV, Sandusky M, Fuhrmann J, Nguyen D, Utterback TR, Saudek DM, Phillips CA, Merrick JM, Tomb JF, Dougherty BA, Bott



KF, Hu PC, Lucier TS, Petterson SN, Smith HO, Hutchison III CA and Venter JC: The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. Science, 270, 397-403, 1995.

Frey J: Mycoplasmas of animals. **In:** Razin S, Herrmann R, (Eds). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

Frey J, Cheng X, Moncrat MP, Abdo EM, Krawinkler M, Bolske G, Nicolet J: Genetic and serologic analysis of the immunogenic 67- kDa lipoprotein of *Mycoplasma* sp. bovine group 7. Res Microbiol, 149, 55-64, 1998.

Geary SJ, Forsyth MH, Abul Soaud S, Wang G, Berg DE, Berg CM: *Mycoplasma gallisepticum* strains differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. Mol Cell Probes, 8, 311-316, 1994.

Giacometti M, Nicolet J, Johansson KE, Naglic T, Degiorgis MP, Frey J: Detection and identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivitis by PCR based on the 16S rRNA gene. J Vet Med, B, 46, 173-180, 1999.

Goncalves R, Regalla J, Nicolet J, Frey J, Nicholas R, Bashiruddin J, de Santis P, Goncalves AP: Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: Discrimination of major surface proteins. Vet Microbiol, 63, 13-28, 1998.

Gökçe E, Ünver A, Erdoğan HM: İshalli neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 16, 717-722, 2010.

Güler L: Pnömonili Koyun ve Keçilerden Mikoplazmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotiklere Olan Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, 1993.

Gülmez Sağlam A, Erkiliç EE, Büyük F, Kirmizigül AH, Gökçe G, Balyen L, Akyüz E, Aydın U, Özba B, Otlı S: *Moraxella ovis* and *Mycoplasma conjunctivae* isolation from an ovine infectious keratoconjunctivitis outbreak and fortified treatment approaches. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 24 (4): 551-556, 2018.

Hazıroğlu R, Diker KS, Türkarlan J, Gülbahar MY: Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica* antigens by an immunoperoxidase technique in pneumonic ovine lungs. Vet Pathol, 33, 74-76, 1996.

Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC and Herrmann R: Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res, 24, 4420-4449, 1996.

Hong Y, Garcia M, Leiting V, Bencina D, Dufour- Zavala L, Zavala G, Kleven SH: Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene vlhA. Avian Dis, 48 (3): 606-616, 2004.

Hong Y, Garcia M, Levisohn S, Lysynansky I, Leiting V, Savelkoul P, Kleven SH: Evaluation of Amplified Fragment Length Polymorphism for differentiation of avian *Mycoplasma* species. J Clin Microbiol, 43, 909-912, 2005.

Ikede BO: The pattern of respiratory lesion in goats and sheep in Nigeria, Part II: Lesions in sheep. *Bull Anim Health Prod Afr*, 26 (2): 172-185, 1978.

Ionas G: Studies on *Mycoplasma ovipneumoniae* in New Zealand Sheep: Epidemiology and Compraison of Isolates. Massey University, New Zealand, 1983.

Ionas G, Norman NG, Clarke JK, Marshall RB: A study of the heterogeneity of isolates of *Mycoplasma ovipneumoniae* from sheep in New Zealand. *Vet Microbiol*, 29, 339-347, 1991.

Jensen JS, Blom J, Lind K: Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *Int J Exp Pathol*, 75, 91-98, 1994.

Kabir H and Bari M: Isolation and identification of *Mycoplasma* from respiratory system of goat. *Microbiol Res Int*, 3 (2): 20-26, 2015.

Kahya S, Buyukcangaz E, Carlı KT: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 32 (1): 31-38, 2013.

Karaarslan A ve Özsan M: Hücre kültürlerinde *Mycoplasma* kontaminasyonu. *Ankara Üniv Tıp Fak Mecmuası*, 51, 3, 169-172, 1998.

Kılıc A, Kalender H, Eroksuz H, Muz A, Tasdemir B: Identification by culture, PCR, and immunohistochemistry of *Mycoplasmas* and their molecular typing in sheep and lamb lungs with pneumonia in Eastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 45 (7): 1525-1531, 2013.

Kokotovic B, Friis NF, Nielsen EO, Ahrens P: Genomic diversity among Danish field strains of *Mycoplasma hyosynoviae* assessed by Amplified Fragment Length Polymorphism analysis. *Vet Microbiol*, 85 (3): 221-231, 2002.

Königsson M: Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. *Vet Microbiol*, 85 (3): 209-220, 2002.

Kusiluka LJ, Ojeniyi B, Friis N, Kokotovic B, Ahrens P: Molecular analysis of field strains of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*, small colony type isolated from goats in Tanzania. *Vet Microbiol*, 82 (1): 27-37, 2001.

Lefevre PC, Jones GE, Ojo MO: Pulmonary Mycoplasmosis of small ruminants. *Rev Sci Tech OIE*, 6, 759-799, 1987.

Ley DH, McLaren JM, Miles AM, Barnes HJ, Miller SH, Franz G: Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts- 11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis*, 41 (1): 187-194, 1997.

Lin YC, Miles RJ, Nicholas RAJ, Kelly DP, Wood AP: Isolation and immunological detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in sheep with atypical pneumonia, and lack of a role for *Mycoplasma arginini*. *Res Vet Sci*, 84, 367-373, 2008.

Liu T, Garcia M, Levisohn S, Yogev D, Kleven S: Molecular variability of the adhesion-encoding gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*, 39, 1882-1888, 2001.

Lorenzon S, Arzul I, Peyraud A, Hendrikx P, Thiaucourt F: Molecular epidemiology of Contagious Bovine Pleuropneumonia by Multilocus Sequence Analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* biotype SC strains. *Vet Microbiol*, 93 (4): 319-333, 2003.

Loria GR, Sammartino C, Nicholas RAJ, Ayling RD: *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Res Vet Sci*, 75, 3-7, 2003.

Madanat A, Zendulkova D, Pospisil Z: Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet Brno*, 70, 403-412, 2001.

Maksimovic Z, De La Fe C, Rifatbegovic M: Presence of Mycoplasmas in the respiratory system of small ruminants managed under extensive production system. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 352-354, 2013.

Malone FE, McCullough SJ, McLoughlin MF, Ball HJ, O' Hagan J, Neill SD: Infectious agents in respiratory disease of housed, fattening lambs in Northern Ireland. *Vet Rec*, 122 (9): 203-207, 1988.

Maniloff J: Phylogeny and Evolution. **In:** Razin S and Herrmann R (Eds.): *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002.

Mannering SA, McAuliffe L, Lawes JR, Erles K, Brownlie J: Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. *Vet Microbiol*, 135 (3-4): 292-296, 2009.

Manso- Silvan L, Perrier X, Thiaucourt F: Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein- coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57 (Pt 10): 2247-2258, 2007.

Marmur J: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Bio*, 3, 208-218, 1961.

Marois C, Dufour- Gesbert F, Kempf I: Comparison of Pulsed- Field Gel Electrophoresis with Random Amplified Polymorphic DNA for typing of *Mycoplasma synoviae*. *Vet Microbiol*, 79, 1-9, 2001.

Marshall AJ, Miles RJ, Richards L: The phagocytosis of Mycoplasmas. *J Med Microbiol*, 43, 239-250, 1995.

Martin WB: Respiratory diseases induced in small ruminants by viruses and Mycoplasma. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 2, 311-334, 1983.

Martin WB: Respiratory infections of sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 19, 171-179, 1996.

Mayor D, Jores J, Korczak BM, Kuhnert P: Multilocus Sequence Typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: A diverse pathogen with limited clonality. *Vet Microbiol*, 127, 63-72, 2008.

McAuliffe L, Ayling RD, Nicholas RA: Identification and characterization of Variable-Number Tandem- Repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. FEMS Microbiol Lett, 276, 181-188, 2007.

McAuliffe L, Churchward CP, Lawes JR, Loria GR, Ayling RD, Nicholas RAJ: VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. BMC Microbiol, 8, 193, 2008.

McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling RD, Nicholas RAJ: Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S rDNA- PCR and DGGE Fingerprinting. J Clin Microbiol, 41, 4844-4847, 2003b.

McAuliffe L, Ellis R, Lawes J, Ayling RD, Nicholas RAJ: 16S rDNA- PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. J Med Microbiol, 54, 731-739, 2005.

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

McAuliffe L, Hatchell FM, Ayling RD, King AIM, Nicholas RAJ: Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in Pasteurella- vaccinated sheep flocks with respiratory disease in England. Vet Rec, 153, 687-688, 2003a.

McAuliffe L, Kokotovic B, Ayling RD, Nicholas RA: Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. J Clin Microbiol, 42, 4556-4565, 2004.

Meloni GA, Bertoloni G, Busolo F, Convent L: Colony morphology, ultrastructure and morphogenesis in *Mycoplasma hominis*, *Acholeplasma laidlawii* and *Ureaplasma urealyticum*. J Gen Microbiol, 116, 435-443, 1980.

Miles K, Churchward CP, McAuliffe L, Ayling RD, Nicholas RA: Identification and differentiation of European and African/Australian strains of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small- colony type using Polymerase Chain Reaction analysis. J Vet Diagn Invest, 18, 168-171, 2006.

Miles K, McAuliffe L, Ayling RD, Nicholas RAJ: Rapid detection of *Mycoplasma dispar* and *M. bovirhinis* using allele specific Polymerase Chain Reaction protocols. FEMS Microbiol Lett, 241 (1): 103-107, 2004.

Miles K, McAuliffe L, Persson A, Ayling RD, Nicholas RA: Insertion sequence profiling of UK *Mycoplasma bovis* field isolates. Vet Microbiol, 107, 301-306, 2005.

Miles RJ: Catabolism in Mollicutes. J Gen Microbiol, 138, 1773-1783, 1992.

Miles RJ and Agbanyim C: Determination of Substrate Utilisation Rates by Mycoplasmas. **In:** Miles RJ, Nicholas RAJ (Eds.): Methods in Molecular Biology: Mycoplasma Protocols. Vol. 104, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.

Miles RJ, Wadher BJ, Henderson CL, Mohan K: Increased growth yields of *Mycoplasma* species in the presence of pyruvate. Letters App Microbiol, 7, 149-151, 1988.

Mitchell A and Finch LR: Pathways of nucleotide biosynthesis in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. J Bacteriol, 130, 1047-1054, 1977.

Mitchell A and Finch LR: Enzymes of pyrimidine metabolism in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. J Bacteriol, 137, 1073-1080, 1979.

Monnerat MP, Thiaucourt F, Poveda JB, Nicolet J, Frey J: Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Clin Diagn Lab Immunol, 6, 224-230, 1999.

Niang M, Rosenbusch RF, Andrews JJ, Lopez- Virella J, Kaeberle ML: Occurrence of autoantibodies to cilia in lambs with a “coughing syndrome”. Vet Immunol Immunopathol 64, 191-205, 1998.

Nicholas R, Ayling R, McAuliffe L: *Mycoplasma* Diseases of Ruminants: Disease, Diagnosis and Control. CABI, Cambridge, MA, 2008.

Nicholas RAJ: Improvement in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by Mycoplasmas. Small Rum Res, 45, 145-149, 2000.

Nicholas RAJ and Baker S: Recovery of Mycoplasmas from Animals. **In:** Miles RJ and Nicholas RAJ (Eds): *Mycoplasma* Protocols. Eds Totowa, Humana Book, 1998.

Otlu S: Kars Yöresinde Koyun Pnömonilerinden Mikoplazmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotiklere Olan Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Kars, 1996.

Özen H, Karaman M, Şahin M, Özcan K: PCR detection of *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* and *M. mycoides* subsp. *mycoides* (small colony type) and investigations of pathological findings in pneumonic cattle. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 15, 125-133, 2009.

Parham K, Churchward Colin P, McAuliffe L, Nicholas RAJ, Ayling RD: High level of strain variation within the *Mycoplasma ovipneumoniae* population of the UK has implications for disease diagnosis and management. Vet Microbiol, 118, 83-90, 2006.

Pasic S and Popovic M: The study of ovine Mycoplasmas in Bosnia and Herzegovina (Yugoslavia): 2. enriched media for isolation of ovine Mycoplasmas. Veterinaria, 38, 307-311, 1989.

Patel H, Mackintosh D, Ayling RD, Nicholas RAJ, Fielder MD: A novel medium devoid of ruminant peptone for high yield growth of *Mycoplasma ovipneumoniae*. Vet Microbiol, 127 (3-4): 309-314, 2008.

Patel JB: 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol Diagn, 6, 313-321, 2001.

Pettersson B, Bolske G, Thiaucourt F, Uhlen M, Johansson KE: Molecular evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains, based on polymorphisms in the 16S rRNA genes. J Bacteriol, 180, 2350-2358, 1998.

Pettersson B, Johansson KE, Uhlen M: Sequence analysis of 16S rRNA from Mycoplasmas by direct solid phase DNA sequencing. Appl Environ Microbiol, 60, 2456-2461, 1994.

Pettersson B, Tully JG, Bölske G, Johansson KE: Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg et al., 1989) based on 16S rDNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 291-301, 2000.

Peyraud A, Woubit S, Poveda J, De la Fe C, Mercier P, Thiaucourt F: A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. *Mol Cell Probes*, 17 (6): 289-294, 2003.

Pilo P, Martig S, Frey J, Vilei EM: Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein LppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet Res*, 34, 761-775, 2003.

Pollack JD, Williams MV, McElhaney RN: The comparative metabolism of the Mollicutes (Mycoplasmas): The utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function. *Crit Rev Microbiol*, 23, 269-354, 1997.

Popovic M and Pasic S: Study of ovine Mycoplasmas in Bosnia and Herzegovina. I. results of isolation from pneumonic lungs of sheep. *Veterinaria Yugoslavia*, 35 (4): 493-496, 1986.

Poumarat F and Solsona M: Molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony, the agent of Contagious Bovine Pleuropneumonia. *Vet Microbiol*, 47, 305-315, 1995.

Poveda JB and Nicholas RAJ: Serological Identification of Mycoplasmas by Growth and Metabolic Inhibition Tests. **In:** Miles RJ, Nicholas RAJ (Eds): *Mycoplasma Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1998.

Razin S: The Genera Mycoplasma, Ureaplasma, Acholeplasma, Anaeroplasma, and Asteroplasma. **In:** Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (Eds): *The Prokaryotes*, Vol. II, Springer-Verlag, New York, 1991.

Razin S: *Mycoplasma* taxonomy and ecology. **In:** Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB (Eds): *Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1992.

Razin S: DNA probes and PCR in diagnosis of Mycoplasma infections. *Mol Cell Probes*, 8, 497-511, 1994.

Razin S and Freundt EA: The Mycoplasmas. **In:** Krieg NR and Holt JG (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.

Razin S, Yogeve D, Naot Y: Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 1094-1156, 1998.

Rodwell AW and Mitchell A: Nutrition, Growth, and Reproduction. **In:** Barile MF and Razin S (Eds): *The Mycoplasmas*, Vol 1, Academic Press, New York, 1979.

Ruffin DC: Mycoplasma Infections in Small Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(2), 315-332, 2001.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS: Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*, 51, 873-884, 1986.

Shahzad W, Ajuwape AT, Rosenbusch RF: Global suppression of mitogen- activated ovine peripheral blood mononuclear cells by surface protein activity from *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol*, 136, 116-121, 2010.

Sheehan M, Casidy JP, Brady J, Ball H, Doherty ML, Quinn PJ, Nicholas RAJ, Markey BK: An aetiopathological study of chronic bronchopneumonia in lambs in Ireland. *Vet J*, 173, 630-637, 2007.

Sheehan M, Markey B, Cassidy J, Ball H, Duane M, Doherty ML: New transtracheal bronchoalveolar lavage technique for the diagnosis of respiratory disease in sheep. *Vet Rec*, 157, 309-313, 2005.

Sikdar A: Studies on the Mycoplasmas of the respiratory tracts of sheep and goats. PhD Thesis, Agra University, India, 1979.

St George TD: Investigations of respiratory disease of sheep in Australia. *Aust Vet J*, 48 (6): 318-322, 1972.

St George TD and Carmichael LE: *Mycoplasma ovipneumoniae* from sheep with chronic pneumonia. *Vet Rec*, 97, 205-206, 1975.

St George TD, Sullivan ND, Love JA, Horsfall N: Experimental transmission of pneumonia in sheep with a Mycoplasma isolated from pneumonic sheep lung. *Aust Vet J*, 47, 282-283, 1971.

Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F: The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using Pulsed- Field Gel Electrophoresis. *Vet Microbiol*, 109, 29-36, 2005.

Stakenborg T, Vicca J, Maes D, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F, Butaye P: Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J Microbiol Methods*, 66, 263-275, 2006.

Stewart SD, Watson HL, Cassell GH: Investigation of the clastogenic potential of *Ureaplasma urealyticum* on human leukocytes. *IOM Lett*, 3, 662-663, 1994.

Stipkovits L, Schimmel D, Varga L: Study of *Acholeplasma* strains isolated from swine. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 23, 307-313, 1973.

Subramaniam S, Bergonier D, Poumarat F, Capaul S, Schlatter Y, Nicolet J, Frey J: Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the uvrC genes by PCR. *Mol Cell Probes*, 12, 161-169, 1998.

Tabatabayi AH, Gharagozlou MJ, Ghader- Sohi A: A survey of *Mycoplasma arginini* and other agents from subacute and chronic ovine pneumonia in Iran. *Prev Vet Med*, 12 (1-2): 153-158, 1992.

Thiaucourt F and Bölske G: Contagious Caprine Pleuropneumonia and other pulmonary Mycoplasmosis of sheep and goats. Rev Sci Tech, 15, 1397-1414, 1996.

Thurley DC, Boyes BW, Davies DH, Wilkins MF, O'Connell E, Humphreys S: Subclinical pneumonia in lambs. N Z Vet J, 25 (7): 173-176, 1977.

Thomas A, Ball H, Dizier I, Trolin A, Bell C, Mainil J, Linden A: Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. Vet Rec, 151, 472-476, 2002.

Tola S, Idini G, Manunta D, Galleri G, Angioi A, Rocchigiani AM, Leori G: Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by Polymerase Chain Reaction. Vet Microbiol, 51 (1-2): 77-84, 1996.

Tsai S, Wear DJ, Shih JWK, Lo SC: Mycoplasmas and oncogenesis: Persistent infection and multistage malignant transformation. Proc Natl Acad Sci USA, 92, 10197-10201, 1995.

Tully J: Test form digitonin sensitivity and sterol requirement. Method in Mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma Characterization. In: Razin S and Tully J (Eds): Academic Press, New York, 1983.

Turan MK, Günay ÖC, Kayış SA, Çörtük M: Mikrobiyotada 16S rRNA ve basit biyoinformatik analizler. J Biotechnol and Strategic Health Res, 2 (1): 23-34, 2018.

USDA: Sheep and Lamb Nonpredator Death Loss in the United States, 2009. Fort Collins, CO. 591.0511, 2010.

Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, Kruif AD, Haesebrouck F: Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Vet Microbiol, 97, 177-190, 2003.

Vilei EM and Frey J: Differential clustering of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains by PCR- REA of the bgl locus. Vet Microbiol, 100, 283-288, 2004.

Vilei EM, Nicolet J, Frey J: IS1634, a novel insertion element creating long, variable- length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small- colony type. J Bacteriol, 181, 1319-1323, 1999.

Wang RY, Shih JW, Weiss SH, Grandinetti T, Pierce PF, Lange M, Alter HJ, Wear DJ, Davies CL, Mayur RK, Lo SC: *Mycoplasma penetrans* infection in male homosexuals with AIDS: High seroprevalence and association with Kaposi' s sarcoma. Clin Infect Dis, 17 (4): 724-729, 1993.

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J, Maniloff J, Woese CR: A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas: Basis for their classification. J Bacteriol, 171 (12): 6455-6467, 1989.

Weiser GC, Drew ML, Cassirer EF, Ward AC: Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *M. arginini* in Bighorn Sheep using enrichment culture coupled with genus- and species- specific Polymerase Chain Reaction. J Wildl Dis, 48 (2): 449-453, 2012.



Westberg J, Persson A, Pettersson B, Uhlén M, Johansson KE: ISMmy1, a novel insertion sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. FEMS Microbiol Lett, 208, 207-213, 2002.

Woubit S, Manso- Silvan L, Lorenzon S, Gaurivaud P, Poumarat F, Pellet MP, Singh VP, Thiaucourt F: A PCR for detection of Mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: Application to the diagnosis of Contagious Agalactia. Mol Cell Probes, 21, 391-399, 2007.



## 6. ÖZGEÇMİŞ

Çıldır/Ardahan 1977 doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Ardahan’ da tamamladım. 1994 yılında girdiğim Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1999 yılında “Veteriner Hekim” ünvanı alarak mezun oldum. 2000-2003 yılları arasında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansımı tamamladım. 2006 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora başladım. Halen serbest Veteriner Hekim olarak çalışmaktayım. Evli ve iki kız çocuk annesiyim.

