

T.C
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARS YÖRESİ KOYUNLARINDA KONTAGİYÖZ AGALAKSİYA
HASTALIĞININ KÜLTÜREL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

138206

Veteriner Hekim Olcay ÖZTÜRKLER
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

YÜKSEKLİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr.Salih OTLU

2003-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı çerçevesinde Veteriner Hekim Olcay ÖZTÜRKLER tarafından hazırlanmış olan; "Kars Yöresi Koyunlarında Kontagiyöz Agalaksiya Hastalığının Kültürel ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüriüyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi :09/07/2003

Adı soyadı

İmza

Başkan

Doç.Dr.Mitat ŞAHİN



Üye

Doç.Dr.Salih OTLU



Üye

Doç.Dr.Gürbüz GÖKÇE



... Bu tezin kabulü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulunun 19...08.03.. gün ve
...08/27..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Yrd.Doç.Dr.Ayla ÖZCAN

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

TABLO LİSTESİ	II-III
ÖNSÖZ.....	IV
GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1-7
MATERYAL VE METOT.....	8-13
BULGULAR	14-15
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	16-19
ÖZET	20
SUMMARY	21
KAYNAKLAR.....	22-27
ÖZGEÇMİŞ.....	28



TABLO LİSTESİ

Tablo-1 : Koyun ve keçilerde kontagiyöz agalaksiya hastalığına neden olan mikoplazma türleri ve biyokimyasal özellikleri.

Tablo-2 : Araştırma kapsamında örnek alınan köyler, örnek tür ve sayıları.

Tablo-3 : Çalışmada kullanılan ekim örnekleri, sayısı ve *Mycoplasma agalactiae* izolasyonu yapılan örnek sayısı ile izolasyon oranı.

Tablo-4 : Araştırma kapsamında incelenen 135 koyun serumunun ELISA testi sonuçları

ÖNSÖZ

Ülkemizde yıllardır Süt Kesen Hastalığı olarak bilinen, koyun ve keçilerin Kontagiyöz Agalaksiya Hastalığı (Contagious Agalactia) temel olarak *Mycoplasma agalactiae* tarafından meydana getirilen, tüm dünyada yaygın olarak gözlenen, özellikle süt veriminin düşmesine ve kesilmesine, bazı olgularda aborta neden olarak büyük ekonomik kayıplara sebep olan bulaşıcı bir enfeksiyondur. Ayrıca infekte hayvanlarda gelişen rahatsızlıkların giderilmesi amacıyla harcanan tedavi giderleri de buna eklendiğinde ekonomik kaybın daha fazla olduğu görülür. Hastalığın mortalitesinin çoğu zaman düşük olmasına rağmen, morbidite bir sürüde % 30-60 arasında değişmektedir. Enfeksiyonun ağır seyrettiği sürülerde kuzu ve oğlaklarda % 40-70 oranında ölüm görülebilir.

Hastalığın tanısı temel olarak etkenin izolasyon ve idenfikasyonu içeren kültürel yoklamalar ile direk veya hasta hayvanlarda etkene karşı oluşan antikorların serolojik yöntemlerle (Komplement fikzasyon, ELISA, İndirek hemagglütinasyon gibi) tesbitine dayalı indirek yolla yapılmaktadır. Bu klasik teşhis yöntemlerinin yanı sıra enfeksiyonun ve izolatin karakterizasyonunun belirlenmesinde üreme inhibisyon ve metabolik inhibisyon testi, flöresan antikor tekniği, immunoblot, polimeraz zincir reaksiyonu ve hibridizasyon tekniklerinden yararlanılmaktadır.

Hastalığın koyun ve keçi yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede, özellikle İtalya, Portekiz ,Yunanistan, Arnavutluk, İsviçre gibi Avrupa ve Akdeniz Ülkeleri ile Asya, Kuzey Afrika, Eski Sovyetler Birliği, Hindistan, Pakistan ve Yakınoğu ülkelerinde sıkça gözleendiği bildirilmektedir. Enfeksiyon ülkemizin çeşitli yörelerinde yetiştirilen koyun ve keçilerde zaman zaman gözlenmektedir. Hastalığın yöremiz koyunlarında da tesbit edildiği ancak üzerinde geniş kapsamlı bir çalışma yapılmadığı görülmektedir.

Yüksek lisans tezi olarak yürütölen bu çalışmada, bulaşıcı ve büyük ekonomik kayıplara neden olan Kontagiyöz Agalaksiya Hastalığının yöremiz

koyunlarındaki durumunun, kültürel ve serolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın her aşamasında değerli bilimsel katkılarını, yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi danışman hocam Sayın Doç.Dr.Salih OTLU' ya, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr.Mitat ŞAHİN' e ve Anabilim Dalı'nın diğer öğretim üyelerine, her zaman yardımlarını aldığım, manevi desteğini gördüğüm eşim Doç.Dr.Yavuz ÖZTÜRKLER' e teşekkürlerimi sunarım.



GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Koyun ve keçilerin kontagiyöz agalaksiya hastalığı (Contagious Agalactia) akut, subakut veya kronik seyirli, mastitis, arthritis ve keratokonjunktivitis ile karakterize, nadiren abortus ve pneumoniye yol açan oldukça bulaşıcı bir enfeksiyondur (3,4,14). Koyun ve keçilerde hastalığın temel etkeni *Mycoplasma agalactiae*'dir (1,6,10,25). Ancak özellikle keçilerde ayrıca *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (Large coloni), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* ve *Mycoplasma putrefaciens* gibi diğer mikoplazma türlerinin de hastalığı meydana getirdiği bilinmektedir (1,12,16,19). Hastalık 1574 yılında İspanya'da, daha sonra 1816 yılında İtalya'da Metaxa tarafından klinik olarak tarif edilmiş, ancak etiyojisi ilk kez 1923 yılında Bridre ve Donattian tarafından ortaya konmuştur (30).

Mikoplazmalar ilk olarak 1898 yılında Fransız bilim adamları Nocard ve Roux tarafından sığırların Contagious Pleura Pneumoniae (CBPP) hastalığından izole edilmiştir (14,30,42). Koyun ve keçilerde ise ilk mikoplazma izolasyonu 1923 yılında Asya ve Avrupa sürülerini uzun süre etkileyen kontagiyöz agalaksiya hastalığının araştırılması sırasında Bridre ve Donattian tarafından yapılmıştır (30). Bugün *M. agalactiae* olarak bilinen bu etken ve sonradan izole edilen diğer mikoplazmaların, sığırların bulaşıcı plöropnömoni hastalığı etkenine benzerliğinden dolayı mikoplazmalar Pleura Pneumonia Like Organism (PPLO) olarak adlandırılmışlardır (46). Mikoplazmalar üzerindeki araştırmalar, koyun ve keçilerden yeni mikoplazma türlerinin izolasyonları, özellikle insan ve kanatlı mikoplazmaları üzerinde yapılan araştırmalar ve geliştirilen yeni metotlarla, son 20 yılda hız kazanmış ve genel olarak koyun ve keçilerde enfeksiyona neden olan mikoplazma türleri bazı istisnalar dışında birlikte ele alınmışlardır (17). Yurdumuzda mikoplazmalardan ileri gelen özellikle koyun ve keçilerin kontagiyöz agalaksiya hastalığı üzerinde birçok değerli araştırmalar yapılmıştır (11,20,30).

Bulaşıcı agalaksiya hastalığı koyun ve keçi yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede yaygın olarak görülmektedir. Özellikle Fransa, İspanya, Portekiz, İtalya, İsviçre, Arnavutluk ve Yunanistan gibi Avrupa ve Akdeniz Ülkeleri'nin yanı sıra,

Asya, Kuzey Afrika, Eski Sovyetler Birliği, Hindistan, Pakistan ve Yakındoğu Ülkeleri'nde de sıkça gözlenen önemli bir hastalıktır (1,3). Aynı zamanda Avustralya, G.Afrika, G.Amerika'da bildirilmiştir (6). Hastalık ülkemizde uzun yıllardan beri "Süt Kesen Hastalığı" olarak bilinmekte zaman zaman yurdumuzun çeşitli yörelerinde yetiştirilen koyun ve keçilerde gözlenmektedir (6,30).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1984 yılı basımında (Volüm 1) mikoplazmalar Prokaryot alemi içerisinde Tenericutes bölümü, Mollicutes sınıfına bağlı Mycoplasmatales takımında yer almaktadırlar (21,24,42). Bu takımda Mycoplasmataceae, Acholeplasmataceae ve Spiroplasmataceae olmak üzere üç familya bulunmaktadır. Mycoplasmataceae familyası Mycoplasma ve Ureaplasma olmak üzere iki cins içermektedir. Mycoplasma cinsi üremeleri için sterole gereksinim duyan, nonhelikal, fakültatif anaerob veya mikroaerobik mikroorganizmalar olup üreaz aktivitesine sahip olmaları ile Üreaplasma cinsinden ayrılır (4,46). Acholeplasmataceae familyasında yer alan Acholeplasma cinsi üremeleri için sterole ihtiyaç duymazlar (30). Spiroplasmataceae familyasında ise üremeleri için sterole ihtiyaç duyan, helikal Spiroplasma cinsi (T mycoplasma) bulunmaktadır (21).

Hastalığa neden olan *M.agalactiae* 124-250 nm boyutlarında, Gram negatif, aerobik, hareketsiz, pleomorfik bir bakteridir (27,34,35). Mikroskopik incelemede kokoid, filamentöz, branşlı, armut, gözyaşı ve benzeri biçimlerde görülürler (35,42). Diğer mikoplazmalar gibi oldukça küçük bir genoma (1x10) sahip olan etken hücre duvarına sahip olmadığından penisilin ve analoglarına dirençli (3,6) osmotik şok ve deterjanlara duyarlıdır (30). Tomurcuklanma ve ikiye bölünme ile çoğalır. Sterol ilave edilmiş sıvı ve katı besiyerlerinde, nemli ve % 5-10 CO₂' li ortamda iyi ürer. Katı besiyerlerinde 4-5 günde, çapı 1 mm den daha küçük, ortası düğmeli " Fried Egg" diye tanımlanan, kenarları transparan koloniler meydana getirirler (5,24,39). *M.agalactiae* glikozu fermente etmez, arjinin ve üre hidrolizi negatiftir (31). Koyun ve keçilerde kontagiyöz agalaksiya hastalığına neden olan *M.agalactiae* ve diğer mikoplazma türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo- 1 de sunulmuştur.

Tablo-1 : Koyun ve keçilerde kontagiyöz agalaksiya hastalığına neden olan mikoplazma türleri ve biyokimyasal özellikleri.

Mikoplazma türü	Biyokimyasal özellik					
	G	A	F	P	C	S
<i>M.agalactiae</i>	-	-	+	+	-	-
<i>M.capricolum</i>	+	+	-	+	+	+
<i>M.mycooides</i> subsp. <i>mycooides</i>	+	-	-	-	+	+
<i>M.putrefaciens</i>	+	+	+	+	-	-

G: Glikoz fermentasyonu A: Arjinin hidrolizi F: Film ve spot oluşumu

P : Fosfataz aktivitesi C: Kazein hidrolizi S: Serum koagulasyonu

Mycoplasma agalactiae hücre duvarına sahip olmaması nedeniyle diğer mikoplazmalar gibi çeşitli faktörlere karşı bakterilere oranla çok daha duyarlıdır. Sıcaklık, ozmotik şok gibi fiziksel (4), deterjan, alkol ve dezenfektanlar gibi kimyasallar (1) etkeni kolaylıkla inaktive eder. Etken 60 °C'de 5 dakika, 100 °C'de bir dakikada inaktive olur. Oda ısısında bir-iki hafta, 8 °C'de 4 ay, -20 °C'de 8-9 ay kadar canlılığını korur. Kloramin, potasyum hidroklorid ve formalin gibi dezenfektanların uygun konsantrasyonları 15-20 dakikada yıkımlar (27).

Mycoplasma agalactiae her iki tür için de patojendir ancak keçiler hastalığa koyunlardan daha duyarlıdır. Enfeksiyonun inkübasyon periyodu etkenin virülensi ve konakcının direncine bağlı olarak 1 hafta ile iki ay arasında değişmektedir (3,6,26). Olguların birçoğu yaz aylarında gözlenmekte, doğum zamanı ve laktasyonun pik yaptığı dönemlerde artmaktadır (1,18,31). Hastalık infekte hayvanlar ile sağlıklı olanlar arasında temas yoluyla hızla yayılmaktadır. Etken infekte hayvanların göz ve burun akıntıları, süt, dışkı, idrar ve açık eklem lezyonlarından çevreye saçılmaktadır (1,27,39). Bulaşma genel olarak sindirim sistemi yolu ve sağım yapanların elleri ile sağım makinaları aracılığıyla meme yoluyla gerçekleşir (4,18,26). Hastalık kontamine tozların solunmasıyla da bulaşabilmektedir. Genç hayvanlar enfeksiyonu daha çok infekte süt veya

kolostrum emmeleri ile alırlar. İnsanların *M.agalactia*'ya karşı duyarlı olduklarına dair kanıt yoktur.

Mikoplazmalar evcil hayvanların tümünde patojen, kommensal yada saprofitik bir yaşam sürdürmekte (14) mukozal yüzeylere kolonize olarak solunum sistemi, ürogenital sistem ve gastrointestinal sistemden izole edilmektedirler (15). Evcil hayvan ve insanlarda mikoplazmaların sebep oldukları bilinen hastalıklar genel olarak; 1- Septisemi 2- Henüz tam olarak ortaya konamamış mikoplazmaemik fazı takip ederek oluşan eklemlerde ve/ veya serozal boşluklarda yangı ve lokalizasyon 3- Solunum sistemi, genital sistem, meme bezleri veya konjunktivanın lokal infeksiyonları olarak gruplandırılmaktadır (38). Normal şartlar altında *M.agalactiae*'nin konağa giriş yolu sindirim, solunum ve meme kanalı yoluyla. Etken sindirim yoluyla alındığında ince barsak epitellerine tutunarak invaze olduğu yapılan deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur. Memelere etkenin kolonizasyonu ve infeksiyonun oluşmasında sağım teknikleri ve hijyen noksanlığı ile sağım makinalarının oluşturduğu defektlerin neden olduğu bilinmektedir. Infekte hayvanlarda gelişen bakteriyemi ile birlikte ateş şekillenmekte sonra etken kan yoluyla meme, göz, lenf nodülleri, ve tendon gibi organlara yerleşerek yangısal değişikliklere neden olmaktadır (27,34). Uterusta şekillenen yangı nedeniyle abort oluşurken, erkek hayvanların testislerinde yangısal değişiklikler görülebilir.

İnfeksiyon subklinik, akut, subakut veya kronik bir seyir izlemektedir (6,26,27). Hastalık doğal olarak yalnızca koyun ve keçilerde ,genel olarak da gebeliğin son devreleri ile doğumu takiben laktasyon süresi içerisinde görülmektedir. Hastalık sürüde gerekli önlemlerin alınmadığı durumlarda aylarca sürebilir ve gelecek laktasyonda veya ileriki yıllarda yeniden görülebilir. Subklinik ve kronik hastalar aylarca etkeni taşıyarak sağlıklı hayvanlar için büyük risk oluştururlar (39). Daha çok keçilerde olmak üzere koyunlarda da etken savunma sisteminin zayıf olduğu dış kulak yoluna yerleşebilir (27).

Hastalığın ilk klinik bulguları iştahsızlık, durgunluk ve sürünün gerisinde kalmadır. İnfeksiyon klinik olarak, vücut ısısı artışı ve durgunluk, gibi genel septisemik belirtilerin ardından etkenin meme ,göz ve eklemlere lokalizasyonu sonucu oluşan mastitis, keratokonjunktivitis ve arthritits gibi lokal bulgularla

karakterizedir (4,31). Mastitis, sütün renginde yeşilimsi sarı veya grimsi mavi bir renk değişikliği ile karakterize olmakta ve sütün kıvamının azalması, irinleşmesi ile sütün zamanla kesilmesi şekillenmektedir (6,27). İlerleyen olgularda memeler zamanla sarkık , fibröz ve atrofik bir hal almaktadır. Arthritis özellikle karpal ve tarsal eklemlerde meydana gelmekte, şişlik ve ağrı ile karakterize olmaktadır (4,6). Kronik olgularda eklemden ankiloz şekillenerek yürümede güçlük, ayakta duramama ve topallık oluşur. Hastaların yaklaşık % 50'sinde şekillenen keratokonjunktivitisin ilk bulguları önce konjunktiva ve sonra korneanın konjesyonudur. Bu tip hayvanlar kısa bir süre sonra kendiliğinden iyileşebilirse de sekonder bakteriyel infeksiyonların oluşması nedeniyle zaman zaman tek veya çift taraflı körlük oluşabilir . Hastalığın kronik seyrettiği durumlarda infekte hayvanlarda abortus görülmüş olup, ancak henüz patogenezi anlaşılmış değildir. *M.agalactiae*' nın keçilerde granüler vulvovaginitise neden olduğu da bildirilmiştir.

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* LC daha çok keçilerde, *M.agalactiae* infeksiyonlarının nadir yada hiç olmadığı bölgelerde, arthritis, plörezi, pnömoni ve keratokonjunktivitis ile karakterize infeksiyona neden olmaktadır. *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* infeksiyonlarının ise dünyanın birçok bölgesinde, fakat düşük düzeyde, daha çok keçilerde, septisemi, mastitis ve akut arthritis ile seyrettiği bildirilmektedir. *Mycoplasma putrefaciens* ile oluşan doğal infeksiyonlar yalnızca keçilerde ve nadiren bildirilmiştir (17,27). Koyun ve keçilerin kontagiyözagalaksiya hastalığı morbiditesi yüksek olduğu, süt ve et kaybına yol açtığı için ekonomik bir öneme sahiptir. Mortalite genellikle % 10-20 arasında değişir (12). Fakat zaman zaman gelişen sekonder infeksiyonlar daha yüksek bir mortaliteye sebebiyet verebilir (1,6).

Koyun ve keçilerin kontagiyözagalaksiya hastalığının ayırıcı teşhisinde, *Pasteurella haemolytica*'nın neden olduğu mastitis, pnömoni ve arthritis, streptokok ve stafilokok mastitisleri, diğer mikoplazma ve bakterilerin neden olduğu konjunktivitis ile aborta neden olan Chlamydia, Salmonella ve Campylobacter türlerinin neden olduğu infeksiyonlar göz önünde bulundurulmalıdır (1,3,27).

Hastalıkta klinik bulguların varlığı (mastitis, keratokonjunktivitis ve arthritis gibi) ve epidemiyolojik verilere dayanarak klinik tanı mümkün olabilirse de çoğu olguda tipik bulguların tümünün aynı sürüde görülemeyebileceğinden yanılgılar oluşabilir (27). Bu nedenle klinik tanı daima etken izolasyon ve identifikasyonuna dayanan laboratuvar tanısı ile pekiştirilmelidir. Hastalığın laboratuvar tanısı temel olarak etkenin izolasyon ve identifikasyonu içeren kültürel yoklamalar ile (4,24,30,31) direk veya hasta hayvanlarda etkene karşı oluşan antikörlerin serolojik yöntemlerle (Komplement fiksasyonu, ELISA, İndirek hemagglütinasyon gibi) tesbitine dayalı (27,28) indirek yolla yapılmaktadır. Bu klasik teşhis yöntemlerinin yanı sıra infeksiyonun ve izolatin karakterizasyonunun belirlenmesinde üreme inhibisyon ve metabolik inhibisyon testi, flöresan antikör tekniği, immunoblot, polimeraz zincir reaksiyonu ve hibridizasyon tekniklerinden yararlanılmaktadır (27,30).

Hastalığın kültürel teşhisi amacıyla, hasta hayvanlardan uygun bir şekilde alınacak süt örneği, eklem sıvısı, göz sıvabı, kan ve idrar örneği gibi materyaller kullanılır (14,34). Otopsi sonrası ise meme dokusu ve bölgesel lenf yumrusu, lezyonlu akciğer, karaciğer, dalak gibi organlar ile eklem sıvısı değerlendirilir (2,27). Tüm örnekler aseptik koşullarda alınmalı, mümkünse taşıma ortamı içerisinde (kalp infüzyon buyyon, %20 serum, %10 maya ekstraktı, 250-1000 IU/ml oranında penisilin içeren) ve soğuk zincirde, mümkün olan en kısa zamanda laboratuvara taşınmalıdır (27,30). Şüpheli materyallerden etken izolasyonu amacıyla, %20 steril at serumu, %10 maya ekstraktı, 500 IU/ml penisilin ve 1/2000 talyum asetat ilavesiyle hazırlanan katı ve sıvı besiyerlerine ekimler yapılır (4,31). Ekim yapılan besiyerleri 37 ° C'de nemli ve %5-10 CO₂'li ortamlarda 3-5 gün ve daha fazla inkübe edilirler. Bu süre sonunda katı besiyerinde üreyen koloniler stereo mikroskop altında incelenerek küçük, ortaları merkezli, tipik koloniler değerlendirilirler. Bu tip kolonilerin, bakterilerin L formlarından ayırt edilmesi için inhibitörsüz katı besiyerlerine pasajlar yapılır (4). Tipik koloniler agarla birlikte blok halinde sıvı besiyerlerine geçilerek saf sıvı kültürler elde edilir. Bu şekilde izole edilen etkenin identifikasyonu, glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz testi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu, hemoliz testi ve üreme inhibisyon testi gibi yöntemlerle yapılmaktadır (2,30,31). Mikoplazmaları, Acheloplasma'lardan ayırt etmek için

dijitonine duyarlılık testi , Ureaplasmalardan ayırt etmek için ise üreaz testinden yararlanılmaktadır (4).

Hastalığın tedavisi, erken teşhis ve etkili antibiyotiklerin uygun bir süre (3-5 gün) kullanımı ile yapılabilmektedir. En etkili antibiyotikler olarak tetrasiklinler, makrolidler (tylosin, eritromisin, josamisin gibi), florfenikol, tiamulin ve florokinolonlardır (6,27). Bazı hayvanlarda gelişen kronik arthritıs ve keratokonjunktivitıs olgularında tedaviden istenilen sonuç alınamamaktadır. Araştırmacıların birçoğu antibiyotiklerin sistemik uygulanmasını tavsiye etmektedirler. Ancak kronik mastitıs olgularında meme içi uygulamalar yararlıdır. Mikoplazmalar penisilin ve analoglarına dirençlidirler (3,18,30).

Koyun ve keçilerin kontagiyözagalaksiya hastalığından korunmada çeşitli ülkelerde kullanılan canlı ve inaktif aşılarda geliştirilmiştir (3,6,12). Canlı aşılarda kullanılmadığı ülkelerde adjuvanlı ölü aşılarda kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalar fenol ve saponinli inaktif aşılarda formalinli veya ısı ile inaktive edilmiş olanlara göre daha koruyucu olduğunu göstermektedir. Canlı aşılarda inaktiflere oranla daha güçlü bir koruma sağlamakta ancak bazı sakıncaları nedeniyle çok az ülkede kullanımına izin verilmektedir (2).

Yetiştiricilikte alınacak genel ve özel hijyenik önlemler, iyi bakım ve besleme, hasta hayvanların sağlıklılarından ayrılması, süt veren hayvanlarla gençlerin bir arada tutulmaması (1,3), sağım makinalarının ve barınakların temizliği ve dezenfeksiyonu ile enfekte süt ve kolostrumun yavrulara pastörize edilerek verilmesi hastalığın prevalans ve şiddetinin azaltılmasında oldukça önemlidir. (27). Eradikasyon ancak sürüdeki bütün enfekte ve şüpheli hayvanların kesimi ile sağlanabilir ki, bu da özellikle sosyal ve ekonomik açıdan özellikle gelişmekte olan ülkelerde uygulanması güç bir programdır.

Yüksek lisans tezi olarak yürütölen bu araştırmada, bulaşıcı ve büyük ekonomik kayıplara neden olan kontagiyözagalaksiya hastalığının Kars yöresi koyunlarındaki durumunun, kültürel ve serolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

MATERYAL

Ekim materyali : Araştırma kapsamında Ocak-Aralık 2002 tarihleri arasında Kars merkeze bağlı yedi köye gidilerek mastitis, keratokonjunktivitis ve arthritis bulgularından birini veya birkaçını gösteren koyunlardan alınan 60 süt, 14 göz sıvabı ve 5 eklem sıvısı örneği *Mycoplasma agalactiae* izolasyonu amacıyla ekim materyali olarak kullanıldı (Tablo-2). Örnekler kısa sürede ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılarak değerlendirildi (2,34).

Standart suő

Araştırmada kontrol amacıyla, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen *M.agalactia* standart suşu kullanıldı.

Kan serumu örnekleri

Serolojik yoklama amacıyla, Kars merkeze bağlı 7 köyde yetiştirilen, klinik olarak hastalık bulguları (mastitis, keratokonjiktivits, arthritis) gösteren veya sağlıklı hayvanlardan rastgele alınan toplam 135 koyun kan örneği değerlendirildi (Tablo-2). Kan örneklerinin pıhtılaşmasını takiben, çizimleri yapılarak elde edilen kan serumu örnekleri, ELISA testine tabi tutuluncaya kadar -20°C'de saklandı.

Tablo-2 : Araştırma kapsamında örnek alınan köyler, örnek tür ve sayıları.

Yer	Süt örneği	Göz sıvabı	Ekleme sıvısı	Kan serumu
Kümbetli/Merkez	10	2	1	22
Karapınar/Susuz	5	-	-	13
Aynalı/Susuz	20	5	2	42
Subatan/Merkez	10	2	1	19
Çağlayan/Merkez	5	4	-	13
Çıyrıklı/Susuz	7	-	1	19
Gölbashi/Susuz	3	1	-	7
Toplam	60	14	5	135

Besiyerleri

Şüpheli örneklerden *M. agalactiae* izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla, %20 steril at serumu, %10 maya ekstraktı, 500 IU/ml penisilin ve 1/2000 talyum asetat ilavesiyle hazırlanan PPLO Agar (Difco) ve PPLO Broth (Difco) kullanıldı (29,30).

ELISA test kiti

Kan serumu örneklerinde *M.agalactiae*'ye karşı oluşan spesifik antikorların serolojik olarak saptanması amacıyla kullanılan ELISA test kiti, Cypress Diagnostics firmasından (Langdorpsesteenweg 160, 3201 Langdorp-Belgium) temin edilmiş ve üretici firmanın öngördüğü şekilde uygulanmıştır.

METOT

Besiyerlerinin hazırlanması

Mikoplazmaların üretilmesi amacıyla 1000 ml katı besiyeri hazırlamak için 35 gr PPLO Agar (Difco) tartılarak 680 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Süspansiyon homojen hale gelene kadar ısıtıldıktan sonra 121 °C' de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi . Daha sonra besiyerine aseptik şartlarda, steril at serumu 200 ml, steril taze maya ekstraktı 100 ml, penisilin G 500 IU / ml, talyum asetat (1/2000) 20 ml miktarlarında ilave edilip pH 7.6 – 7.8'e ayarlanarak 9 cm çapında petri kutularına döküldü. Besiyeri kullanılıncaya kadar +4 °C de saklandı.

Mikoplazmaların üretilmesi ve identifikasyonda test ortamı olarak kullanılan sıvı besiyerinin hazırlanması için, 2.1 gr PPLO Broth (Difco) 70 ml distile suda çözdürülerek otoklavda 121 °C' de 15 dakika süreyle steril edildi. Besiyerine aseptik şartlarda steril at serumu 20 ml , taze maya özütü 10 ml, penisilin G 500 IU/ml, talyum asetat (1/2000) 2 ml aseptik şartlarda katılarak pH 7.6-7.8'e ayarlanıp steril tüplere 5'er ml miktarında taksim edildi. Besiyeri kullanılıncaya kadar +4 °C de saklandı.

İzolasyon çalışmaları

Şüpheli materyallerden etken izolasyonu amacıyla süt örnekleri ve eklem sıvıları PPLO agar'a 0.1 ml miktarında, göz sıvabı örnekleri ise direkt sürülerek ekimleri yapıldı. Ekim yapılan katı besiyerleri 37 °C de, nemli ve %10 CO₂ li (Anaerocult C, MERCK) ortamda beş gün süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda katı besiyerinin stereo mikroskop ile incelenmesi sonucu saf olarak üreyen, ortaları merkezli " Fried egg " diye tanımlanan, tipik koloniler dikkate alındı. Bu kolonilerin inhibitörsüz katı besiyerlerine pasajları yapılarak L formlarından ayırımı yapıldıktan sonra, agar ile bir blok halinde PPLO buyyona geçilerek sıvı kültür elde edildi. Bu şekilde izole edilen mikoplazma suşlarının, sıvı kültürleri ile yapılan digitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu,

arjinin hidrolizi, tetrazolium redüksiyonu ve fosfataz aktivitesi gibi biyokimyasal testler sonucu identifikasyonu gerçekleştirildi.

İdentifikasyon çalışmaları

İzole edilen mikoplazma suşlarının, sıvı kültürleri ile yapılan digitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, tetrazolium redüksiyonu ve fosfataz gibi biyokimyasal testleri aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Dijitonine duyarlılık

Bu test , Tully'nin (45) bildirdiği metoda göre yapıldı . Bu amaçla 30 mg dijitonin 2 ml %1,5'lik dijitonin solüsyonu hazırlandı. Solüsyon, Watman (No.40) filtre kağıdından hazırlanan 6 mm çapındaki disklere her bir diske 0.025 ml dijitonin olacak şekilde emdirildi. 37 ° C' de kurutulan diskler + 4 °C' de saklandı . İzole edilen suşların 1/100 dilüsyonlarından 0.1 ml katı besiyeri yüzeyine bir baget yardımıyla yayılarak etüvde besiyerinin yüzeyi kurutulduktan sonra üzerine steril bir pens yardımıyla dijitonin diski hafifce bastırılarak konuldu. Petriler ,nemli ve %10 CO₂ 'li (Anaerocult C, Merck) ortamda 37 °C'de 5 gün süreyle inkübe edildikten sonra disk etrafında oluşan inhibisyon alanı ölçülerek değerlendirildi . Değerlendirmede disk etrafında oluşan 4 mm ve daha geniş inhibisyon alanı pozitif olarak kabul edildi.

Glikoz fermentasyonu

Bu test ,Razin ve Cirillo' nun (36) bildirdiği yöntemine göre yapıldı . Hazırlanan %10 glikoz solüsyonundan 5 ml 'lik PPLO buyyonlara 0.5 ml ilave edilerek %1 glikoz içeren sıvı besiyeri test edilecek kültürden 0.1 ml inoküle edilip , üzerine %0,002 oranında fenol red katılarak ekim yapılmayan bir kontrol tüpü ile birlikte 37 °C'de , nemli ve %10 CO₂ 'li (Anaerocult C, Merck) ortamda 5 gün süreyle inkübe edildi . Besiyerinin renginin ortamın pH'sının 7'nin altına düşmesi nedeniyle kırmızıdan sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Arjinin hidrolizi

Bu test Barile' nin (8) bildirdiği yönteme göre yapıldı . Bunun için %2'lik arginin solüsyonundan 5 ml'lik PPLO buyyonlara 0.01 ml ilave edilerek %0.2'lik arginin içeren ve pH'sı 7 olan sıvı besiyerleri hazırlandı . Test edilecek kültürden hazırlanan besiyerine 0.1 ml ekim yapıldıktan sonra %0.002 oranında fenol red ilave edilerek ekim yapılmayan bir kontrol tüpüyle birlikte 37 °C'de nemli ve % 10 CO₂ 'li ortamda 5 gün süreyle inkübe edildi . Bu süre sonunda ekim yapılan besiyerinin renginin pembe yada kırmızıya dönüşmesi kontrol tüpünde ise renk değişikliğinin olmaması pozitif olarak değerlendirildi.

Tetrazolium redüksiyonu

Steril 2,3,5 triphenyltetrazolium chlorid'in %0,002 oranında katılmasıyla hazırlanan PPLO buyyonlara , test edilecek kültürden 0.1 ml ekilerek ekim yapılmayan bir kontrol tüpüyle birlikte 37 ° C de 5 gün süreyle inkübe edildiler .Besiyerinin renginin pembe kırmızıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi (41).

Fosfataz testi

Steril phenolftalein diphosphat'tan %0.1 oranında katılarak hazırlanan katı besiyerine izole edilen suşların ekimi yapılarak 37 °C, nemli ve mikroaerobik ortamda 5 gün süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda oluşan kolonilerin zerine 5 N NaOH dökülerek yarım dakika içerisinde kırmızı rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (13).

ELISA testi

Test, üretici firmanın belirttiği prosedüre göre yapılmıştır. Bu amaçla kit içeriğinde bulunan, pozitif ve negatif kontrol serumları sulandırılmadan ve 50 µl miktarında, tüm çukurları *M.agalactiae* spesifik antijeni ile kaplanmış mikroplyt üzerinde bilinen ikişer çukura konuldu. Test edilecek serum örnekleri ise sulandırma sıvısı ile 1/100 oranında sulandırılarak uygun çukurlara 50 µl miktarında konulduktan sonra mikroplyt aliminyum folyö ile örtülüp 37 °C'de 20 dakika süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda mikroplyt yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkayıp kurutulduktan sonra her çukura 50 µl miktarında konjugat konulup üzeri kapatılarak bir kez daha aynı ısı ve sürede inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda yukardaki gibi yapılan yıkama ve kurutma işlemini takiben her çukura 50 µl substrat (3,3',5,5' tetrametilbenzidin, TMB) konularak birkaç saniye hafifçe çalkalanıp, oda ısısında (20-25 °C) ve karanlıkta, 10 dakika süreyle bekletildi. Süre sonunda her çukura 50 µl miktarında stop solüsyonu (H₂SO₄, sülfirik asit) konularak reaksiyon durdurulduktan sonra ELISA okuyucuda (Metertech Σ 960) 450 nm filtrede okunarak sonuçlar kaydedildi.

Pozitif kontrol serum optik dansitesinin 0,7 den büyük ve negatif kontrol serum optik dansitesinden en az dört kat veya daha büyük olması durumunda ELISA testinin uygun olarak yürütüldüğü kabul edildi. Sonuç olarak, test edilen serum örneklerinin optik dansite değeri, negatif kontrol serumu optik dansite değerinin iki katına bölünmesi ile elde edilen değer 1 den küçük ise negatif, 1-1,5 arasında ise şüpheli, 1,5 den büyük ise pozitif olarak kabul edildi.

BULGULAR

İzolasyon ve identifikasyon sonuçları

Kars merkeze bağlı yedi köye gidilerek mastitis, keratokonjunktivitis ve arthritıs bulgularından birini veya birkaçını gösteren koyunlardan alınan örneklerin kültürel yoklaması sonucu; 60 süt örneğinin 3'ünden (% 5.0) 14 göz sıvabının 2'sinden (% 14.2) ve 5 eklem sıvısının 1'inden (% 20) olmak üzere toplam 79 adet örneğın 6'sından (% 7.5) *Mycoplasma agalactiae* suşu izole ve identifiye edildi (Tablo - 2).

Tablo 2. Çalışmada kullanılan ekim örnekleri, sayısı ve *Mycoplasma agalactiae* izolasyonu yapılan örnek sayısı ile izolasyon oranı.

Örnekler	Örnek sayısı (n)	İzolasyon yapılan örnek sayısı	İzolasyon oranı (%)
Süt	60	3	5
Göz sıvabı	14	2	14.2
Eklem sıvısı	5	1	20
Toplam	79	6	7.5

ELISA testi sonuçları

Çalışma kapsamında toplanan ve serolojik olarak ELISA testiyle değerlendirilen 135 adet koyun kan serumu örneğinin 16'sı (% 11.85) pozitif, 15'i (% 11,11) şüpheli ve 104'ü (% 77.03) ise negatif bulunmuştur (Tablo- 3).

Tablo 3. Araştırma kapsamında incelenen 135 koyun serumunun ELISA testi sonuçları.

İncelenen kan serumu sayısı	Pozitif örnek sayısı ve oranı (%)	Şüpheli örnek sayısı ve oranı (%)	Negatif örnek sayısı ve oranı (%)
135	16 (%11,85)	15 (% 11,11)	104 (% 77,03)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Koyun ve keçilerin kontagiyöz agalaksiya hastalığı, özellikle Akdeniz Ülkeleri ile Kuzey Afrika, Orta ve Yakınoğu ülkelerinde sıklıkla gözlenen (1,3) ve ekonomik kayıplara neden olan bir enfeksiyondur. Hastalık seyrek de olsa dünyanın diğer birçok bölgesinde gözlenmektedir (6). Hastalığın laboratuvar tanısı temel olarak enfekte hayvanlardan etken izolasyonuna dayanan kültürel (23,30) veya enfekte hayvanlarda etkene karşı meydana gelen spesifik serum antikörlerinin ortaya konulmasına dayanan serolojik yöntemlerle (2,14,16) yapılmaktadır.

Dünyanın birçok bölgesinde gerek koyunlarda gerekse keçilerde izolasyona dayalı olarak kontagiyöz agalaksiya hastalığının görüldüğünü bildiren birçok araştırma mevcuttur. Gil ve ark. (23) 1991-1995 yılları arasında İspanya'nın Güneybatı Bölgesi'nde kontagiyöz agalaksiya hastalığı gözlenen 43 keçi sürüsünden, 596 hasta hayvandan aldıkları 1309 örneğin kültürel yoklaması sonucu 543 mikoplazma suşu izole edildiğini, izolatların % 82.7'sinin *M.agalactiae* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar söz konusu bölgede Keçilerin kontagiyöz agalaksiya hastalığına birinci sırada *M.agalactiae*'nin, ikinci sırada ise *M m mycoides* (LC)'in neden olduğunu vurgulamışlardır. Yine Real ve ark. (37) İspanya'nın Kanarya Adaları'nda mastitis ve / veya agalaksi bulguları gösteren, üç keçi sürüsünden alınan süt örneklerinden çok sayıda mikoplazma izole etmişlerdir. Araştırmacılar izole edilen mikoplazma suşlarının biyokimyasal testler ve metabolik inhibisyon testiyle yapılan incelenmesi sonucunda birinci sürüden *M.agalactiae*, ikinci sürüden *M.mycoides mycoides*, üçüncü sürüden ise *M.mycoides capri* olarak tanımladığını ve bu araştırmayla söz konusu yörede *M.agalactiae* enfeksiyonunun ilk kez bildirildiğini belirtmişlerdir. Bajmacy ve ark. (7), Macaristan'da 1997 yazında 200 keçi ve 500 koyunlu bir çiftlikte 150 hayvanın etkilendiği körlüğe neden olan keratokonjunktivitis, topallığa neden olan poliartiritis ve memelerin atrofisi ile sonuçlanan mastitis ile karakterize yaklaşık bir aydır süregelen bir salgın görüldüğünü, hasta hayvanlardan alınan eklem sıvılarından PCR tekniği ile mikoplazma varlığı belirlendiğini, 14 hayvandan alınan eklem sıvısı ve süt örneğinden mikoplazma izolasyonu

yapıldığını, bu suşların biyokimyasal özellikleri ve üreme inhibisyon testi ile *M.agalactiae* olarak identifiye edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar infekte sürünün kesime sevk edildiğini ve Macaristan'da bundan önceki son salgının 1948 yılında gözlemlendiğini vurgulamışlardır. Gaillard-Perrin ve ark. (22), Politevine bölgesinde 136 süt keçisinde ve Midi-Pyrenees'de 65 keçilik bir sürüde agalaksiya ve arthritis bulguları gözlemlendiğini, her iki sürüden alınan süt örneklerinden *M.putrefaciens* ve yine ilk sürüde bulunan arthritisli bir keçinin eklem sıvısından ve ikinci sürüdeki keçilerin kulak sıvabı örneklerinden *M.mycoides* subsp. *mycoides* izole edildiğini belirtmişlerdir. Talavera ve Goncervere (43), 302 keçinin bulunduğu bir sürüde gözlenen salgından elde edilen süt örneklerinin üçünden saf olarak *M.agalactiae* ve birinden ise saf olarak *M.capricolum* üretmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca 240 başlık bir keçi sürüsünde görülen salgınında ise akciğer ve süt örneklerinden izole edilen suşların %60'ını *M.mycoides* subsp. *mycoides* (LC) %40'ı ise *M.agalactiae* olarak belirlemişlerdir. Talavera ve Goncer (44), bulaşıcı agalactia hastalığının İspanya'da koyun ve keçilerde yaygın bir hastalık olmadığını, ancak 1980 ve 1982 yılları arasında bu hayvanlardan izole edilen 63 Mycoplasma suşunun 52'sinin *M.agalactia* olduğunu, 10'nun ise *M.mycoides mycoides* ve bir tanesinin de *M.capricolum* olduğunu saptamışlardır. Picavet ve ark. (33), Fransa'da 1979 ve 1981 yılları arasında arthritis, mastitis ve keratokonjunktivitis ile seyreden 5 salgından *M.mycoides* var.*mycoides* ve *M.capricolum* tespit edildiğini ancak *M.agalactiae* belirlenemediğini tedaviden olumlu bir sonuç alınamaması nedeniyle hasta hayvanların kesime sevk edildiğini bildirmişlerdir.

Koyun ve keçilerin kontagiyöz agalaksiya hastalığı uzun yıllardır ülkemizde yetiştirilen koyun ve keçilerde de gözlenmekte ve bildirilmektedir. Erdağ ve arkadaşları (20) yurdumuzun çeşitli bölgelerinde koyun ve keçilerden izole ettikleri mikoplazma suşlarını koloni görünüşleri, karanlık saha incelemesi, hemoliz testi, glikoz fermentasyonu, koagüle at serumu testi, süt agarda pigmentasyon testi ile A, C ve N olmak üzere 3 tipe ayırmışlardır. Araştırmacılar tip A' nin bulaşıcı agalaksinin etkeni olduğunu, tip N' nin sağlam ve infekte hayvanların burun ve göz mukozasından izole edildiğini, tip C' nin ise bulaşıcı agalaksinin etkeni olmadığını bildirmişlerdir. Beşe ve Arda (11),

1968 yılı yaz aylarında Ankara iline bağlı köylerde mastitis, keratit, iritis, purulent konjunktivit ve arthrit semptomları gösteren koyunlardan aldıkları 60 süt, 25 konjunktival sıvı, 25 burun akıntısı ve 10 eklem sıvısı örneğinden izole ettikleri 10 mikoplazma suşunu, morfolojik, kültürel ve biyokimyasal karakterlerine göre *M.agalactiae* olarak tanımlamışlardır. Otlu ve ark. (31), Kars bölgesinde 200 başlık bir koyun sürüsünde 20 hayvanın etkilendiği, mastitis, arthrit ve keratokonjunktivitle karakterize bir hastalık gözlemlendiğini, hasta hayvanlardan alınan süt örneği, göz sıvısı ve eklem sıvısının bakteriyolojik yoklamasında saf olarak *Mycoplasma agalactiae* izole ve tanımlanmış olduğunu, izole edilen suşun danofloksasin, enrofloksasin ve linkospektine duyarlı, streptomisin ve ampiciline dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Gerçekleştirilen bu araştırmada *M.agalactiae* izolasyonu amacıyla, ekimi yapılan şüpheli 60 süt örneğinin 3'ünden (% 5.0) 14 göz sıvısının 2'sinden (% 14.2) ve 5 eklem sıvısının 1'inden (% 20) olmak üzere toplam 79 adet örneğin 6'sından (% 7.5) *Mycoplasma agalactiae* suşu izole ve tanımlanmış edildi. Çeşitli şüpheli örneklerden etkenin belirli oranlardaki izolasyonu hastalığın Kars yöresi koyunlarında varlığını göstermekte ayrıca serolojik sonuçlarımızı da desteklemektedir.

Koyun ve keçilerin kontagiyöz agalaksiya hastalığı üzerinde dünyanın birçok bölgesinde serolojik araştırmalar yapılmış (32,40)ve değişen oranlarda varlığı bildirilmiştir. Bleaid ve ark. (9) 1989 yılında Cezayir 'de hastalıktan şüpheli koyun ve keçi sürülerinden topladıkları 372 serum örneğini ELISA testi ile incelemişler *Mycoplasma capricolum* için % 28, *M.mycoides mycoides* için % 23 ve *Mycoplasma agalactiae* için %17 pozitif sonuç belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca aldıkları 80 süt örneğinden izolasyon yapamadıklarını, bu durumun ve serolojik yoklama sonucu elde edilen düşük pozitiflik oranının, araştırmanın hastalığın düşüş gösterdiği ve infekte hayvanların antibiyotik tedavisine maruz bırakılması sonrası bir dönemde yapılmasına bağlamışlardır. Madanat ve ark. (28) Çek Cumhuriyeti ve Ürdün'de yetiştirilen koyun ve keçilerde kontagiyöz agalaksiya hastalığı'nın prevalansını belirlemek için yaptıkları bir çalışmada, Çek Cumhuriyeti' ne ait 80 (60 koyun ve 20 keçi) ve

Ürdün'den sağlanan 137 (78 koyun ve 59 keçi) kan serumu örneğini ELISA ile incelemişler, Çek Cumhuriyeti'nden elde edilen tüm örneklerin negatif olduğunu, Ürdün'den elde edilen 137 örneğin 8'inin (% 5,83) pozitif, 11'inin (% 8,02) şüpheli, 117'sinin (% 85.40) negatif olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, hastalığın yaklaşık onbeş yıldır Çek Cumhuriyeti'nde görülmediğini oysa Ürdün'de yetiştirilen koyun ve keçilerde, diğer Arap Ülkeleri'nde olduğu gibi sıklıkla gözlenen ciddi bir infeksiyon olduğunu belirtmişlerdir. Marino – Ode ve ark (29), 644 keçiden alınan süt örneğini *M.agalactiae* infeksiyonu yönünden ELISA ile incelemişler ve 259'unu (% 40,2) pozitif, 374'ünü (% 58,1) negatif ve 11'ini (% 1,7) şüpheli bulmuşlardır. Araştırmacılar başka bir yörede yetiştirilen keçilerden aldıkları 251 keçi serumu örneğinin ise 123'ünü (% 49) pozitif, 126'sını (% 50.2) negatif ve 2'sini (% 0,8) şüpheli olarak belirlemişlerdir.

Yürütülen bu çalışmada, Kars merkez ve ilçelerine bağlı 7 köyde yetiştirilen 135 adet koyundan elde edilen kan serumu kontagiyöz agalaksiya hastalığı yönünden, serolojik olarak ELISA testiyle incelenmiş 16'sı (% 11.85) pozitif, 15'i (% 11,11) şüpheli ve 104'ü (% 77.03) ise negatif bulunmuştur. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde birçok Akdeniz Ülkesi'nde olduğu gibi Kars yöresinde de infeksiyonun varlığı belirlenmiştir. Serolojik incelemeler sonucu ortaya çıkan değerler kontagiyöz agalaksiya hastalığının yöremiz koyunlarında oldukça önemli bir oranda gözlendiğini göstermektedir.

Bu araştırma, Kars yöresi koyunlarında daha önceden de varlığı bildirilen kontagiyöz agalaksiya hastalığı üzerinde, kültürel ve serolojik yöntemlerle araştırılmasını içeren, geniş kapsamlı ilk çalışmadır. Araştırmanın sonuçları, hastalığın yörede yetiştirilen koyunlarda görülen önemli infeksiyonlardan biri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, ekonomik kaybın önlenmesi için sistemli bir şekilde aşılama çalışmalarının yapılması son derece yararlı olacaktır.

ÖZET**Kars yöresi koyunlarında kontagiyöz agalaksiya hastalığının kültürel ve serolojik yöntemlerle araştırılması**

Bu araştırma Kars yöresi koyunlarında kontagiyöz agalaksiya hastalığının, kültürel ve serolojik yöntemlerle belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, Kars merkeze bağlı yedi köye gidilerek, kültürel yoklama için hastalık belirtileri gösteren (mastitis, arthritis, keratokonjunktivitis) koyunlardan 60 süt, 14 göz sıvabı ve 5 eklem sıvısı örneği, serolojik yoklama için ise klinik olarak hastalık bulguları gösteren veya sağlıklı, toplam 135 koyundan kan örneği toplanmıştır. Kültürel yoklamalar sonucu, 60 süt örneğinin 3'ünden (% 5.0), 14 göz sıvabınının 2'sinden (% 14.2) ve 5 eklem sıvısınının 1'inden (% 20) olmak üzere toplam 79 adet örneğin 6'sından (% 7.5) *Mycoplasma agalactiae* suşu izole ve tanımlanmıştır. Araştırma kapsamında toplanan ve serolojik olarak ELISA testiyle değerlendirilen 135 adet koyun kan serumu örneğinin 16'sı (% 11.85) pozitif, 15'i (% 11,11) şüpheli ve 104'ü (% 77.03) ise negatif bulunmuştur. Bu sonuçlar, kontagiyöz agalaksiya hastalığının Kars yöresi koyunlarında görülen önemli infeksiyonlardan biri olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler : Koyun, *Mycoplasma agalactiae*, kontagiyöz agalaksiya, izolasyon, seroloji.

SUMMARY

Cultural and serological studies on contagious agalactia in sheep in Kars district, Turkey

This study aimed to determine the extent of contagious agalactia in sheep in Kars district by cultural and serological methods. For this purpose, cultural investigation utilized 60 milk, 14 eye swabs and 5 joint fluid samples collected from sheep showing symptoms of the disease from 7 villages in Kars district. A total of 135 blood samples were collected from sheep showing signs of the disease or from clinically healthy sheep in order to undertake the serological investigations. On the cultural investigation, 6 (7,5 %) *M.agalactiae* were isolated and identified from the total of 79 samples. The distribution of isolates was 3 from 60 milk samples (5,0 %), 2 from 14 eye swabs (14,2 %) and 1 from 5 joint fluids (20 %). Serum samples were serologically tested by ELISA and 16 samples (11,85 %) were found to be positive, 15 (11,11 %) suspicious and 104 (77,03 %) negative. In conclusion, these results demonstrate that contagious agalactia is one of the most important infectious diseases of sheep in Kars district, Turkey.

Key words : Sheep, *Mycoplasma agalactiae*, contagious agalactia, isolation, serology.

KAYNAKLAR

1. Anon. (2002) : Contagious agalactia of sheep and goats.
<http://www.vet.uga.edu/vpp/gray-book/FAD/CAS.htm>
2. Anon. (2000): Office International des Epizooties (OIE) manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4 th. Ed.
3. Anon. (1991) : The merck veterinary manual. Contagious agalactiae. 7 th Ed. Merck and Co., Inc. Rahway, N. J. USA, 1003-1004.
4. Arda,M., Minbay,A., Leloğlu,N., Aydın,N., Kahraman ,M., Akay,Ö., Ilgaz A., İzgür,M.,Diker ,KS: (1997): Özel Mikrobiyoloji , Medisan Yayınevi ,Ankara, 282-283
5. Arda, M. (1997) : Temel mikrobiyoloji. Medisan yayın serisi No. 25, Ankara
6. Aytuğ, C. N., Alaçam, E., Özkoç, Ü., Yalçın, B. C., Gökçen, H., Türker, H. (1990) : Koyun-keçi hastalıkları ve yetiştiriciliği. Tüm Vet Hayvancılık Hizmetleri Yayını. NO.2 Bursa. 171-174
7. Bajmocy, E., Kaszanyitzky, E. J., Bolske, G., Matiz, K., Tanyi, J. (1998) : Diagnosis of contagious agalactiae in Hungary. Magyar Allatorvosok Lapya 120 (7) : 390-394.
8. Barile, M. F. (1983) : Arginin hydrolysis. In: Methods in Mycoplasmaology. Vol.1,Ed. S. Razin and J. G. Tully. Academic Pres , New York, 345-349.
9. Belaid B, Le Goff, C., Lefevre, P.C. (1990) : Epidemiological and serodiagnostic survey of contagious agalactia of sheep and goats in Eastern Algeria. Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop., 43 (1) : 37-41.

10. Bergonier, D., Berthelot, X., Poumarat, F. (1997): Contagious agalactia of small ruminants : current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci Tech., OIE.* 16 (3): 848 -73.
11. Beşe, M. ve Arda, M. (1969) : Koyunlarda *Mycoplasma agalactiae*'nin ilk izolasyonu üzerine araştırmalar. *Ankara Üni. Vet. Fak. Derg.*, 16: 257-266.
12. Blood, D. C., Radostits, O. M., Arundel, J. H., Gay, C. C. (1989) : *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses.* 7 th. Ed. Bailliere, Tindall.
13. Bradbury, J. M. (1983) : Phosphatase activitiy. In : *Methods in Mycoplasmology.* Vol.1, Ed. S. Razin and J. G. Tully, Academic Pres, New York. 363-366.
14. Carter, G. R., Chengappa. M. M., Clauss, G. W. and Rikihisa, Y. (1991) : *Mycoplasmas.* In : *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology.* 4 th Ed. Lea and Febiger. USA. 237- 243.
15. Clyde, W. A. (1983) : *Mycoplasma –animal host interrelationships .* In: *Methods in Mycoplasmology.* Vol.1., Ed. S. Razin and J. G. Tully. Academic Pres , New York, 15-19.
16. Cokrevski, S., Crcev, D., Loria, G. R, Nicholas, R. A. (2001) : Outbreaks of contagious agalactia (CA) in small ruminants in the Republic of Macedonia. *Vet. Rec.* 148 (21): 667.
17. Cottew, G. S. (1983) : Recovery and identification of caprine and ovine mycoplasmas. In: *Methods in Mycoplasmology.* Vol.1., Ed. S. Razin and J. G. Tully. Academic Pres , New York. pp.91-104.
18. Da Massa, A. J., Wakenel, P. S. and Brooks, D. L. (1992): *Mycoplasmas of goats and sheep.* *J. Vet. Diagn. Invest .*,4 (1) : 101-103

19. Da Massa, A. J., Brooks, D. L., Holmberg, C. A. (1987) : Comparison of caprine mycoplasmosis caused by *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, and *Mycoplasma putrefaciens*. *Isr. J. Med. Sci.*, 23 : 636-640.
20. Erdağ, O., Arısoy, F., Watson, W. A. ve Cottew, G. S. (1967) : Türkiye'de koyun ve keçilerden izole edilen *Mycoplasma agalactiae* suşlarının tiplerinin ayırımı. *Pendik Vet. Kont. ve Araş. Enst. Derg.*, 1 (1) 26-35.
21. Freundt, E. A. (1983) : Principles of Mycoplasma classification and taxonomy. In: *Methods in Mycoplasmaology*. Vol.1., Ed. S. Razin, and J. G. Tully. Academic Press, New York. pp. 9-13.
22. Gaillard - Perrin, G., Picavet, D. P., Perrin, G. (1986) : Isolation of *Mycoplasma putrefaciens* in two herds of goats showing symptoms of agalactiae. *Rev. Med. Vet.*, 137 (1) : 67-70.
23. Gil, M. C., Hermoso de Mendoza, M., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso de Mendoza, J. (1999) : Aetiology of caprine contagious agalactia syndrome in Extremadura, Spain. *Vet. Rec.*, 144: 24-25
24. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994) : The Mycoplasmas. (or Mollicutes) : Cell wall-less bacteria. In : *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 th. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
25. Jones, G. E. (1983) : Mycoplasmas of sheep and goats : A synopsis. *Vet. Rec.* 113: 619-620.
26. Kimberling, C. V. (1988) : Jensen and Swift's Diseases of sheep. 3 rd. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 31-34.
27. Madanat, A., Zendulkova, D., Pospisil, Z. (2001) : Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet. Brno.*, 70 : 403-412.

28. Madanat, A., Zendulkova, D., Lany, P., Pospisil, Z., Cihal, P. (2002) : Prevalance of *Mycoplasma agalactiae* antibiotics in Czech and Jordanian herds of small ruminant. Acta Vet. Brno., 71 (1) : 37-44.
29. Morino-Ode, U., Postizzi, S., Nicolet, J. (1984) : Epidemiological studies on distribution of infectious agalactia in goats in the Ticino canton. Schweizer Archiv fur Tierheilkunte, 126 (3) : 111-119.
30. Otlu, S. (1997) : Kars yöresinde koyun pnömonilerinden mikoplazmaların izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi. Etlik Vet. Mikrob. Derg., 9 (1) :157- 174.
31. Otlu, S., Aydın, F., Genç, O., Taş, C. (1997) : Clinical and bacteriological studies on contagious agalactiae in sheep. Pendik Vet. Mikrobiol. Derg. 28 (1) 33-38.
32. Perreau, P., Goff, C. Le, Giauffret, A. (1976) : Serological Diagnosis of contagious agalactia in small ruminants : the complement fixation test. Bulletin de l'Academie veterinaire de France 49 (2): 185-192.
33. Picavet, D. P., Tainturier, D., Chantal, J., Ferney, J., Akakpo, J. A., Balezo, P. (1983) : Some outbreaks of 'contagious agalactia' among goats in southwestern France. Rev. Sci. Tec., 2 (2) : 489-497.
34. Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., Carter, G. R. (1998) : Clinical Veterinary Microbiology. Mosby -Year Book, London, England.
35. Razin S. (1983) : Characteristics of the Mycoplasmas as a group. In: Methods in Mycoplasmology. Vol.1., Ed. S. Razin and J.G. Tully. Academic Pres , New York.

36. Razin, S. and Cirillo, V. P. (1983) : Sugar fermentation. In: Methods in Mycoplasmaology. Vol.1, Ed. S. Razin and J. G. Tully. Academic Pres , New York. 337-345.
37. Real, F., Deniz, S., Acosta, B., Ferrer, O. And Poveda, J. B. (1994) : Caprine Contagious Agalactia caused by *mycoplasma agalactiae* in the Canary Island. Vet. Rec., 135: 15-16.
38. Rosendal, S. (1986) : Mycoplasma. In : Gyles, C. L., Thoen, C. O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State Univesity Pres. Ames. Pp. 205- 215.
39. Sarris, K. (1996) : Contagious agalactia. In: Frey, J. and Sarris, K. : Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiyology and molecular genetics. EUR 16934, COST, European Commission, European Communities Official Publications Office, Luxembourg, 12-15.
40. Schaeren W. and Nicolet J. (1982): Micro-ELISA for detecting contagious agalactia .Schweiz.Arch.Tierheilkd.,124: 163-177
41. Senterfit, L. B. (1983) : Tetrazolium reduction. In : Methods in Mycoplasmaology. Vol.1., Ed. S. Razin and J. G. Tully, Academic Pres, New York. 377-378.
42. Şahin, M., (1997): Kars yöresinde sığır pnömonilerinden mikoplazmaların izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere olan duyarlılıkların belirlenmesi. Etlik Vet. Mikrob. Derg., 9 (2) : 71-90.
43. Talavera, J., Goncer, A. (1985) : Two outbreaks of contagious agalactiae in goats, each caused by two different pathojenic mycoplasmas. Anales del instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ganadera, Spain 22 (1): 135-138.

44. Talavera, J., Goncer, A. (1984) : Contagious agalactia of sheep and goats in Spain, Frequency of the different aetiological agents. Comunicaciones I.N.I.A., Higiene Sanidad Animal (9): 15.
45. Tully, J. G . (1983). Tests for digitonin sensitivity and sterol requirement. In: Methods in Mycoplasmaology. Vol.1., Ed. S. Razin and J. G. Tully. Academic Pres , New York. 355-362
46. Türkaslan, J. (1992) : Değişik hayvan orjinli materyallerden izole edilen mikoplazmaların identifikasyonu üzerine araştırmalar. Uzmanlık tezi. Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü. İstanbul .



ÖZGEÇMİŞ

Ardahan ili ıldır ilçesi'nde 1977 yılında doğdum. İlk ve orta öğrenimimi bu ilçede tamamladım. 1994 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesine girerek 1999 yılında mezun oldum. Kars'ta Serbest Veteriner Hekim olarak çalışmakta ve Ekim 2000 tarihinden itibaren Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

