

Pnömonili Sığırlarda *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* ve *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi)'in PZR ile Belirlenerek Patolojik Bulguların İncelenmesi ¹

Hasan ÖZEN *  Musa KARAMAN * Mitat ŞAHİN ** Kadir ÖZCAN *

[1] Bu çalışma DPT (Proje No: 2003K-120710) ve TÜBİTAK (Proje No: 106O798) tarafından desteklenmiştir
* Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Kars - TURKEY
** Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Kars - TURKEY

Yayın Kodu (Article Code): 2008/108-A

Özet

Bu çalışma ile Kars ilinde pnömonili sığırlarda *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* ve *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi)'in insidensleri belirlenerek pnömonili akciğerlerde gözlenen histopatolojik değişiklikler değerlendirildi. Bu amaçla, kesimi takiben makroskopik olarak akciğerlerinde lezyon tespit edilen 100 adet sığırdan elde edilen doku örnekleri rutin olarak işlenerek mikroskopta incelendi. Bakteriyolojik incelemeler için alınan dokular *Mycoplasma* agar ve brothda ekimleri yapılarak "L" koloni formları arandı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amacıyla alınan doku parçalarından elde edilen total DNA örneklerinde belirtilen *Mycoplasma* etkenlerine spesifik oligoprimere çiftleri kullanılarak DNA amplifikasyonları yapıldı ve %1.5'lük agaroz jelde elektroforetik olarak koşuldu. Histopatolojik incelemelerde kataraldan granülomatöze kadar değişen tiplerde pnömonilere rastlandı. Özellikle *Mycoplasma* etkenleri tarafından oluşturulan fibrinöz tabiattaki pnömonilerde değişen derecelerde olmak üzere koagülasyon nekrozuna, bu nekroza eşlik eden nötrofil lökosit ve mononükleer hücre infiltrasyonları ile ödem, fibrin, yer yer tromboz ve plörada kalınlaşmalara rastlandı. PZR analizlerinde *M. bovis*, *M. dispar* ve *M. bovirhinis*'e spesifik sırasıyla 400, 433 ve 316 baz çifti uzunluğunda bantlar tespit edildi. Fibrinöz pnömonili vakalarda olmak üzere *M. bovis* ve *M. dispar* sırasıyla 4 ve 6 vakada belirlendi. *M. bovirhinis* toplam 11 vakada tespit edilirken bunların 7'si fibrinöz pnömonili hayvanlarda gözlemlendi. *M. bovirhinis* 1'er vakada olmak üzere *M. bovis* ve *M. dispar* ile beraber belirlendi. Bakteriyolojik ekimler sonucunda hiçbir vakada *Mycoplasma* izolasyonu gerçekleştirilmedi.

Anahtar sözcükler: *Mycoplasma*, Sığır, Pnömoni


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

Summary

In this study, incidence of *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* and *M. mycoides subsp. mycoides* (small colony type) was determined, and the histopathological changes in the lungs were investigated in the pneumonic cattle living in Kars. For this purpose, lung samples were collected from 100 pneumonic cattle that were grossly detected after slaughter, and processed routinely for histopathological examination. Bacteriological investigations were performed by inoculating the tissue samples onto *Mycoplasma* agar and broth, and searching for "L" colony type. Using specific oligoprimere pairs for the *Mycoplasma* species, DNA amplifications were carried out by polymerase chain reaction (PCR) and the amplicons were electrophoretically run in 1.5% agarose gel. In histopathological examinations, pneumonias ranging from catharal to granulomatous were determined. Microscopic observations of fibrinous pneumonias, which are caused by *Mycoplasmas*, revealed coagulation necrosis, accompanying neutrophile and mononuclear cell infiltration, edema, fibrin, occasional thrombosis and thickening of pleura. In PCR analysis, 400, 433 and 316 base pair long bands representative of *M. bovis*, *M. dispar* and *M. bovirhinis* were detected, respectively. *M. bovis* and *M. dispar* were detected, only in animals with fibrinous pneumonia, in 4 and 6 animals, respectively. *M. bovirhinis* was determined in 11 animals of which 7 were in animals with fibrinous pneumonia. *M. bovirhinis* was found as a mix agent in 1 animal each with *M. bovis* and *M. dispar*. Isolation of *Mycoplasma* was not accomplished in any of the animals by bacteriological culture technique.

Keywords: *Mycoplasma*, Cattle, Pneumonia

 **İletişim (Correspondence)**

 +90 474 242 68 07/1152

 hasanozen@hotmail.com

GİRİŞ

Sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonları tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de sıklıkla rastlanan ve dikkate değer ekonomik zararlara yol açan, bu nedenle de üzerinde önemle durulması gereken hastalıklardır. Bu enfeksiyonların ağır ekonomik kayıplara neden olmasının altında hastalığın tüm cins ve yaş grubundan hayvanları etkilemesi, sıklıkla nüks etmesi ile koruyucu ve tedavi edici yöntemlere karşı yeterli cevap vermemeleri gibi nedenler yatmaktadır ¹⁻³. Epizootik özelliklerinin yeterince bilinmemeleri bu hastalıkların kontrol altına alınması için gerekli olan önlemlerin oluşturulmasını kısıtlamakta ve güçleştirmektedir.

Solunum sistemi enfeksiyonları bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler tarafından oluşturulabildikleri gibi bu etkenlerin kombine olarak etkilemeleri sonucu da gelişebilir ³. Bakteriyel etkenler arasında yer alan Mycoplasmalar, özellikle viral etkenlerle birlikte enfeksiyonlara neden olmakla beraber bazı türleri tek başına da solunum sistemi hastalıklarına yol açabilmektedir ⁴.

Mycoplasmalar en küçük serbest yaşayan prokaryotlardır. Bu mikroorganizmalar hücre duvarları olmamaları nedeniyle Mollicute grubu içinde tanımlanırlar ⁵. Aşırı bir pleomorfizme sahip olan bu mikroorganizmalardan pek çok tür insan, hayvan, insekt ve bitkilerde tespit edilmiştir ⁶. Hayvanlarda bulunan yaklaşık 200 kadar Mollicute arasından sadece çok azı, ki bunların çoğunu *Mycoplasma* türleri oluşturur, patojendir. Ancak bu *Mycoplasma* türlerinin 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.

Bu çalışmanın amacı solunum yolu enfeksiyonlarına sebep oldukları bildirilen *Mycoplasma* türlerinden *M. bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* ve *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi)’in Kars ilinde kesime sevk edilen ve makroskopik olarak pnömoni teşhisi konulan sığırlar arasındaki insidenslerini belirlemek ve oluşan histopatolojik değişikliklerin karakterlerini araştırmaktır.

MATERYAL ve METOT

Materyal Toplanması

Çalışma materyalini, Kars ilinde yer alan Kars Belediye Mezbahası ve özel bir işletmeye ait Et Kombinasında 2005-2007 yılları arasında kesime gönderilen, yaşları 1 ile 8 yıl arasında değişen toplam 2565 sığırdan kesimi takiben makroskopik incelemede pnömoni teşhisi konulan 100 adet hayvana ait akciğer doku örnekleri oluşturdu. Alınan numuneler üç parçaya ayrılarak bir kısmı histopatolojik incelemeler amacıyla %10’luk fosfat tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edilirken diğer kısımlar moleküler ve bakteriyolojik incelemeler yapılması amacıyla steril poşetlere alınarak laboratuara ulaştırılmaya kadar buz tankı içerisinde muhafaza edildi. Daha sonra moleküler ve bakteriyolojik incelemeler yapılmaya kadar doku örnekleri -20°C’de saklandı.

Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik incelemeler amacıyla toplanan ve formaldehit solüsyonunda tespit edilen akciğer doku örnekleri rutin işlemlerden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı ve 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındıktan sonra hematoksilin ve eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Bakteriyolojik İncelemeler

Yaklaşık 1 gr ağırlığında alınan akciğer doku örnekleri 10 ml *Mycoplasma* broth içerisinde stomacherde homojenize edildikten sonra *Mycoplasma* agar ve brothda ekimleri yapılarak %5 CO₂’li etüvde 37°C’de 10 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresince katı besi yeri günlük olarak stereo mikroskopta incelenerek *Mycoplasmaların* oluşturduğu “L” koloni formları arandı.

DNA İzolasyonu

Total DNA izolasyonu yapılması amacıyla akciğerlerden alınan doku numuneleri homojenizatör vasıtasıyla homojenize edildi. Homejanatlar Tris EDTA (TE) tampon solüsyonu ile süspanse edildikten sonra 10 dakika 8760 x g’de santrifüj edildi ve oluşan pelet tekrar TE solüsyonu ile süspanse edilerek yukarıdaki işlemler tekrarlandı. Sonrasında peletler, lizis solüsyonu (10 mg/ml Proteinase K, 1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, %10 SDS) eklenerek 55°C’de bir gece boyunca inkübe edildi. DNA izolasyonu fenol-kloroform-isoamyl alkol

(25:24:1) kullanılarak gerçekleştirildi. DNA'nın presipitasyonu amacıyla 3 M sodyum asetat ve soğuk %100'lük etanol ilave edilen örnekler -20°C'de bir gece boyunca bekletildi. Son olarak 5400 x g'de 30 dakika santrifüj edilen örneklerden elde edilen pelletler 50 µl distile su ile sulandırıldı. DNA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, örnekler 260 nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Elde edilen total DNA örneklerinden *M. bovis* VspA genine spesifik primer çifti kullanıldı. *M. dispar* ve *M. bovirhinis* 16S rRNA nükleotid sekanslarına spesifik primer çiftleri kullanılırken *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi) için IS1296 sekansı ile Afrika, Avustralya ve Avrupa suşlarının hepsini tespit edebilen primer çiftlerinden yararlanıldı. Çalışmada kullanılan oligoprimere çiftleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Polimeraz zincir reaksiyonunda *Mycoplasma* türleri için kullanılan oligoprimere çiftleri

Table 1. Oligoprimere pairs used for the detection of *Mycoplasma* species in polymerase chain reaction

Mycoplasma Türü	Oligoprimere Çiftleri
<i>M. bovis</i> (Alberti ve ark. ⁷)	F: 5'-CTT GGA TCA GTG GCT TCA TTA GC-3' R: 5'-GTC ATC ATG CGG AAT TCT TGG GT-3'
<i>M. dispar</i> (Marques ve ark. ⁸)	F: 5'-TTA AAG CTC CAC CAA AAA-3' R: 5'-GTA TCT AAA GCG GAC TAA-3'
<i>M. bovirhinis</i> (Kobayashi ve ark. ⁹)	F: 5'-GCT GAT AGA GAG GTC TAT CG-3' R: 5'-ATT ACT CGG GCA GTC TCC-3'
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i> (küçük koloni tipi) (Miles ve ark. ¹⁰)	F: 5'-CTA AAG AGC TTG GAG TTC AGT G-3' R: 5'-CCA GCT CAA CCA GCT CCA G-3'

M. bovis için, toplam 50 µl'lik miktarlarda hazırlanan örneklere 10x PZR tampon solüsyonu (100 mM Tris-HCl, %0.8 Nonidet P40; Fermentes), 200 µM her bir deoksiniükleotid trifosfattan, 1.5 mM MgCl₂, ~100-150 ng hedef DNA numunesi, 0.1 µM miktarındaki her bir primer çiftinden ve 2.5U *Taq* DNA polimeraz (Fermentes) konuldu. *M. dispar* için, toplam 50 µl'lik miktarlarda hazırlanan örneklere 10x PZR tampon solüsyonu (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, %0.8 Nonidet P40; Fermentes), 200 µM her bir deoksiniükleotid trifosfattan, 2 mM MgCl₂, ~100-150 ng hedef DNA numunesi, 0.1 µM her bir primer çiftinden ve 2.5U *Taq* DNA polimeraz konuldu. *M. bovirhinis* için, 50 µl'lik miktarlarda

hazırlanan örneklere 10x PZR tampon solüsyonu (100 mM Tris-HCl, %0.8 Nonidet P40; Fermentes), 200 µM her bir deoksiniükleotid trifosfattan, 1 mM MgCl₂, ~100-150 ng hedef DNA numunesi, 0.1 µM her bir primer çiftinden ve 2.5U *Taq* DNA polimeraz konuldu. Son olarak *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi) için de toplam 50 µl'lik miktarlarda hazırlanan örneklere 10x PZR tampon solüsyonu (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, %0.8 Nonidet P40; Fermentes), 200 µM her bir deoksiniükleotid trifosfattan, 1.5 mM MgCl₂, ~100-150 ng hedef DNA numunesi, 0.1 µM her bir primer çiftinden ve 2.5 U *Taq* DNA polimeraz (Fermentes) konuldu. Tüm örnekler MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad)'da her bir *Mycoplasma* türü için belirtilen koşullarda olmak üzere reaksiyona sokuldu. DNA amplifikasyonu *M. bovis* için; 94°C'de 10 dakika ön ısıtmayı takiben 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72°C'de 1.5 dakika sentez olmak üzere 32 döngü halinde gerçekleştirildi. Son olarak 72°C'de 7 dakika son sentezlenme tamamlandı. PZR koşulları *M. dispar* için; 94°C'de 5 dakika ön ısıtmayı takiben 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 53.6°C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72°C'de 1 dakika sentez olmak üzere 35 döngü ve 72°C'de 5 dakika son sentezleme olarak tamamlandı. *M. bovirhinis* için DNA amplifikasyon koşulları; 94°C'de 10 dakika ön ısıtmayı takiben 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 60°C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72°C'de 1.5 dakika sentez olmak üzere 35 döngü ve 72°C'de 5 dakika son sentezleme olarak gerçekleştirildi. *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi) için kullanılan PZR koşulları; 95°C'de 10 dakika ön ısıtmayı takiben 95°C'de 1 dakika denatürasyon, 62°C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72°C'de 1 dakika 20 saniye sentez olmak üzere 35 döngü ve 72°C'de 5 dakika son sentezleme olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PZR amplikonları etidiyum bromit içeren %1.5'lük agaroz jelde Mini-Sub Cell GT Cell marka (BioRad) elektroforez kullanılarak 50 voltta koşuturuldu. Elektroforez işleminden sonra oluşan bantlar ultraviyole transilluminatörde gözlenerek dijital olarak fotoğraflandı.

BULGULAR

Makroskobik Bulgular

Çalışmada makroskobik olarak incelenen 2565 hayvanın 100'ünde (%3.89) pnömoni lezyonları belirlendi. Bu lezyonların 86 vakada unilateral

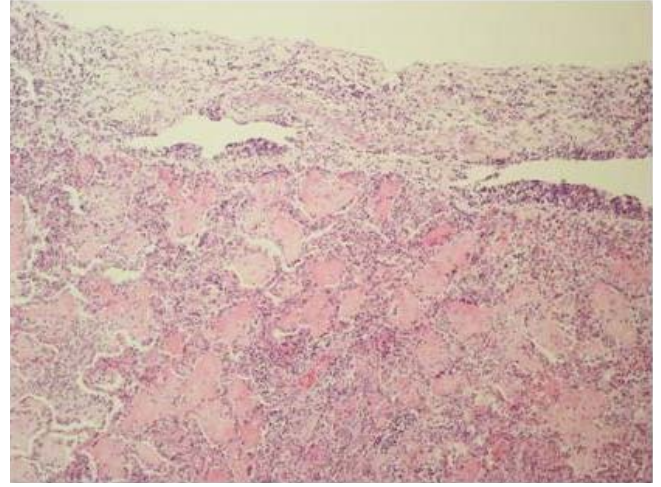
yerleşim gösterdiği ve daha çok kranial loplarda yer aldığı tespit edildi. Konsolide alanların koyu kırmızıdan sarıya kadar değişen renklerde, bazen ise boz beyaz renklerde oldukları gözlemlendi. Beş vakada lezyonların kanamalı seyrettiği, iki hayvanda ise nodüler lezyonların olduğu belirlendi. Pnömonili bölgelerin üzerini örten plörada değişen derecelerde kalınlaşma ve/veya lopların yer yer birbirleri ve perikardla yapıştığı 7 vaka belirlendi. Pnömonik akciğerlerin büyük çoğunluğunda mediastinal ve peribronşiyol lenf düğümlerinde büyümeler tespit edildi. İki adet vakada interlobüler septumların belirgin olarak genişlediği, 3 olguda değişen derecelerde olmak üzere bazı bölgelerde koyu kırmızı renkli, bazılarında ise boz gri renkli nekroz alanlarının bulunduğu görüldü.

Histopatolojik Bulgular

Mikroskopik incelemeler sonucunda çalışmadaki pnömoni tipleri; kataral bronkopnömoni (43 olgu), purulent bronkopnömoni (37 olgu), fibrinöz pnömoni (18 olgu) ve granülomatöz pnömoni (2 olgu) olarak tespit edildi. Ayrıca 8'i kataral bronkopnömonilerle ve 3'ü de purulent bronkopnömonilerle birlikte olmak üzere 11 olguda intersitisyel pnömoniyeye rastlandı.

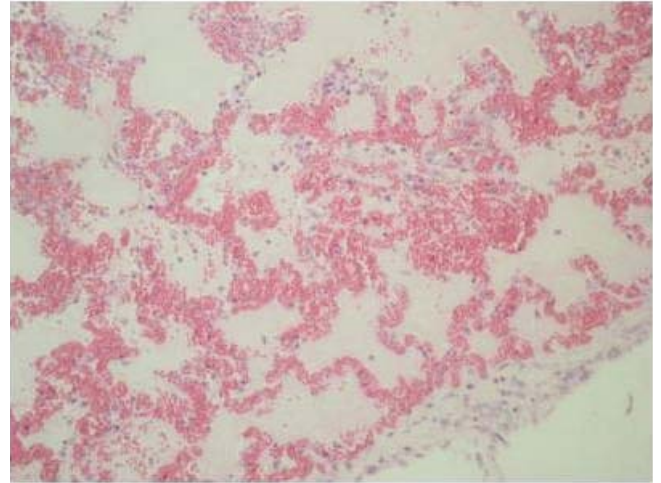
Çalışmada belirlenen 18 adet fibrinöz (fibrinli ve fibrino-nekrotik) pnömoni olgusu, çalışmamızın temel hedefini oluşturan *Mycoplasma* türleri tarafından meydana getirilen klasik pnömoni tipi olması sebebiyle detaylı olarak incelendi. Fibrinöz pnömoni olarak tanımlanan örneklerde genel olarak alveol lumenlerinde ödem, fibrin, nötrofil lökosit, makrofaj infiltrasyonu ve eritrosit ile interalveolar septumlarda ödem, hiperemi ve plörada kalınlaşma görüldü (Şekil 1). Belirtilen bu değişikliklerin vakalar arasında derece ve yaygınlık bakımından çeşitlilik gösterdiği, bazı hayvanlarda alveol lumenlerinin homojen bir sıvı ile birlikte az sayıda nötrofil lökosit ve eritrosit içerdiği (Şekil 2), diğerlerinde ise söz konusu bu değişikliklerin yanı sıra kimi alveol lumenlerinin fibrin, alveolar makrofaj ve nötrofil lökositler ile dolu olduğu tespit edildi (Şekil 3-4). Fibrinöz pnömoni saptanan vakaların ikisinde eozinofilik görünümde nekroz alanları görüldü. Bu nekrotik alanları sınırlandıran ve çoğunluğunu nötrofil lökosit ve makrofajların oluşturduğu yangısal hücre infiltrasyonlarından oluşan belirgin demarkasyon sahası ile bu bölgeye bitişik dokularda ödem, fibrin ve eritrositlere rastlandı (Şekil 5).

Akciğer parankim dokusunda tarif edilen lezyonların yanı sıra çoğu vakada interlobüler septumlarda ödem, fibrin ve az sayıda yangısal hücre infiltrasyonu nedeniyle genişlemeler belirlendi. Bazı olgularda interlobüler septumda yer alan lenf damarları başta olmak üzere damarların fibrin ile tıkandığı görüldü (Şekil 6). Yangısal değişikliklerin şekillendiği bölgelerde plöranın, çoğunluğu mononükleer hücre ile az sayıda nötrofil lökositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu, fibrin ve ödem nedeniyle kalınlaştığı gözlemlendi.



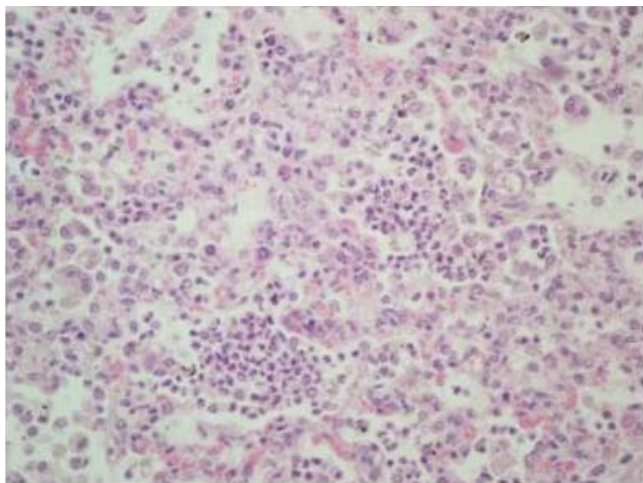
Şekil 1. Alveol lumenlerinde ödem, fibrin, nötrofil lökosit, makrofaj ve eritrositler ile birlikte interalveolar septumlarda ve plörada kalınlaşma, HE x 92

Fig 1. Edema, fibrin, neutrophile leukocyte, macrophage and erythrocyte in the alveolar lumens as well as thickening of the interalveolar septa and pleura, HE x 92



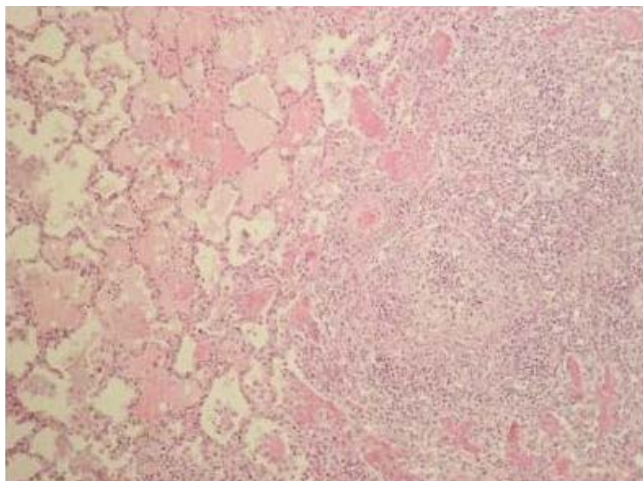
Şekil 2. Alveolar kapillarlarda şiddetli derecede hiperemi, alveol lumenlerinde pembe renkte homojen eksudat ve bu eksudat içerisinde az miktarda nötrofil lökosit, alveolar makrofaj ve dökülmüş nekrotik epitel hücreleri, HE x 185

Fig 2. Severe hyperemia in alveolar capillaries and pink homogenous exudate in the alveolar lumens, containing few neutrophile leukocytes, alveolar macrophages and sloughed necrotic epithelial cells, HE x 185



Şekil 3. Alveol lumenlerinde çok sayıda nötrofil lökosit ve makrofaj ile hafif derecede kapillar hiperemi, HE x 370

Fig 3. Many neutrophile leukocytes and macrophages as well as light capillary hyperemia in the alveolar lumens, HE x 370



Şekil 4. Solda alveol lumenlerinde şiddetli sıvı eksudasyonu ve alveolar kapillarlarda hiperemi, sağda ise yoğun nötrofil lökosit ve makrofaj infiltrasyonları, HE x 92

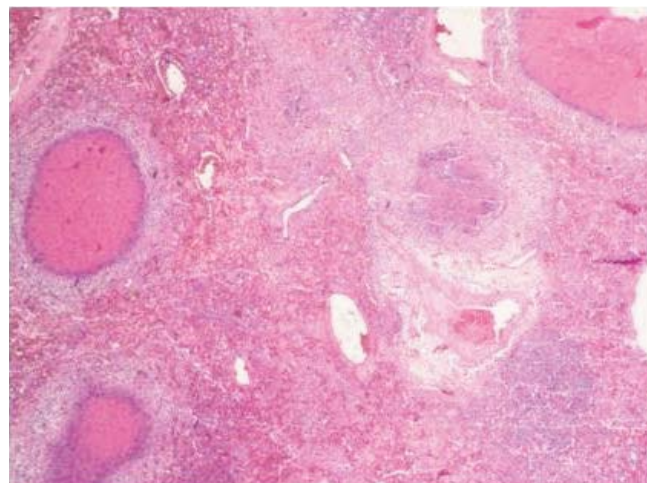
Fig 4. On the left side, severe liquor exudation in the alveolar lumens and hyperemia in the alveolar capillaries, and on the right side heavy infiltration of neutrophile leukocytes and macrophages, HE x 92

Bakteriyolojik Bulgular

Bakteriyolojik ekimler neticesinde, çalışmanın yapıldığı 100 adet akciğerin hiç birinden Mycoplasma izolasyonu gerçekleştirilemedi.

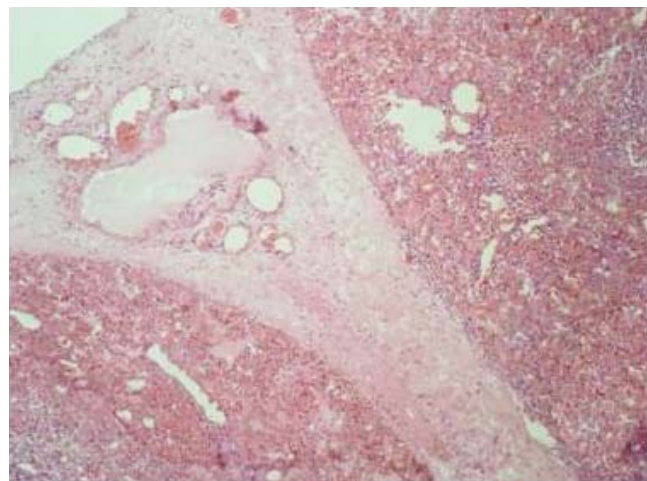
PZR Analiz Bulguları

Yapılan PZR analizleri sonucunda, incelenen 100 akciğerin toplam 19'unda *M. bovis*, *M. dispar* ve *M. bovirhinis* belirlenirken, *M. mycoides subsp. mycoides*



Şekil 5. İyi sınırlanmış multifokal koagülasyon nekroz alanları, bu alanları çevreleyen yangısal hücre infiltrasyonları, damarlarda tromboz ile alveol lumenlerinde sıvı ve hücre eksudasyonu, HE x 36

Fig 5. Well demarcated areas of multifocal coagulation necrosis, and inflammatory cell infiltrations surrounding these necrotic areas. Thrombosis in the vessels and liquor and cellular exudation in the alveolar lumens, HE x 36



Şekil 6. İnterlobüler septumda genişleme ve damarların fibrin ile tıkanması, HE x 92

Fig 6. Widening of the interlobular septum and obstruction of the vessels by fibrin, HE x 92

(küçük koloni tipi) tespit edilmedi (*Tablo 2*). Agaroz jel elektroforezinde *M. bovis*'in varlığını kanıtlayan 400 baz çifti uzunluğundaki bantlar gözlemlendi (*Şekil 7*). *M. bovis* histopatolojik incelemeyle fibrinöz pnömoni tanısı konulan toplam 4 olguda belirlendi. *M. dispar*'ın belirlenmesi amacıyla yapılan elektroforetik analizlerde 433 baz çifti uzunluğunda bantlar tespit edildi (*Şekil 8*). *M. dispar* da *M. bovis* gibi sadece fibrinöz pnömonili hayvanlarda olmak üzere toplam 6 vakada belirlendi. *M. bovirhinis* için ise 316 baz çifti uzunluğunda bantlar gözlemlendi (*Şekil 9*).

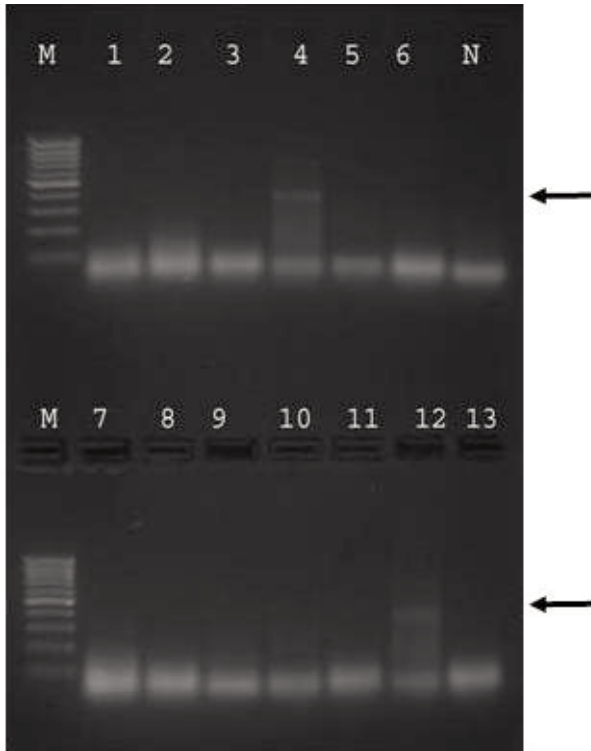
Tablo 2. PZR sonuçlarına göre belirlenen *Mycoplasma* türleri ve bunların pnömoni tiplerine dağılımı.

Table 2. According to PCR results, *Mycoplasma* species and their incidence regarding to the pneumonia types

Mycoplasma türleri	Pnömoni tipi			
	KBP	PBP	FP	GrP
<i>M. bovis</i>	-	-	4	-
<i>M. dispar</i>	-	-	6	-
<i>M. bovirhinis</i>	3	1	7*	-
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i> (küçük koloni tipi)	-	-	-	-

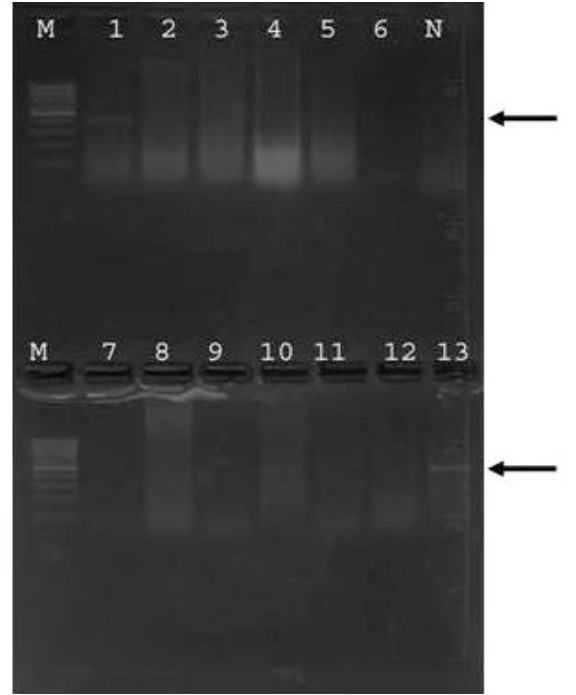
* *M. bovirhinis*, 1'er olguda *M. bovis* ve *M. dispar* ile birlikte belirlenmiştir
KBP - Kataral bronkopnömoni, **PBP** - Purulent bronkopnömoni,
FP - Fibrinöz pnömoni, **GrP** - Granulomatöz pnömoni

Pnömonili hayvanlar arasında toplam 11 olguda *M. bovirhinis* belirlenirken bunların 7'si fibrinöz pnömonilerde, 3'ü kataral bronkopnömonilerde ve 1'i de purulent bronkopnömonide tespit edildi. *M. bovirhinis* 1'er vakada *M. bovis* ve *M. dispar* ile birlikte bulundu.



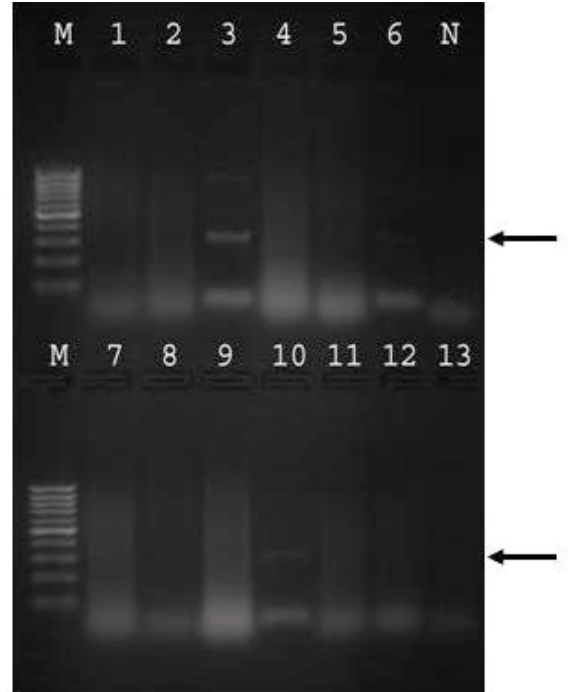
Şekil 7. *M. bovis*'e spesifik 400 baz çifti uzunluğundaki bantları (oklar) gösteren PZR ve agaroz jel elektroforez sonuçları. M; Moleküler belirteç (100-1000 baz çifti), N; Negatif kontrol, 1-13; Pnömonili vakalar

Fig 7. *M. bovis* specific PCR and agarose gel electrophoresis results showing 400 bp long bands (arrows). M; Molecular marker (100-1000 bp), N; Negative control, 1-13; Pneumonic animals



Şekil 8. *M. dispar*'a spesifik 433 baz çifti uzunluğundaki bantları (oklar) gösteren PZR ve agaroz jel elektroforez sonuçları. M; Moleküler belirteç (100-1000 baz çifti), N; Negatif kontrol, 1-13; Pnömonili vakalar

Fig 8. *M. dispar* specific PCR and agarose gel electrophoresis results showing 433 bp long bands (arrows). M; Molecular marker (100-1000 bp), N; Negative control, 1-13; Pneumonic animals



Şekil 9. *M. bovirhinis*'e spesifik 316 baz çifti uzunluğundaki bantları (oklar) gösteren PZR ve agaroz jel elektroforez sonuçları. M; Moleküler belirteç (100-1000 baz çifti), N; Negatif kontrol, 1-13; Pnömonili vakalar

Fig 9. *M. bovirhinis* specific PCR and agarose gel electrophoresis results showing 316 bp long bands (arrows). M; Molecular marker (100-1000 bp), N; Negative control, 1-13; Pneumonic animals

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalıklar arasında pnömoniler ilk sıralarda yer alır. Bunlardan da, ağır seyretmesi ve tedavi imkanlarının yetersizliği veya güçlüğü nedeniyle fibrinli pnömoniler ve bu tür pnömonilere neden olan Mycoplasmalar ayrı bir öneme sahiptir. Bu çalışma ile, Kars ilinde kesim sonrası makroskopik olarak pnömoni tespit edilen sığır akciğerlerinde Mycoplasma türlerinden *M. bovis*, *M. dispar* ve *M. bovirhinis*'in varlığı ortaya konularak insidensleri belirlenmiş ve akciğer dokusunda oluşan lezyonlar tanımlanmaya çalışılmıştır.

Sığır pnömonilerinin epidemiyolojik insidensini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda pnömoni oranının %3.6 ile %65.83 arasında değiştiği bildirilmiştir¹¹⁻²¹. İnsidens oranlarında gözlenen bu büyük ayrımların oluşmasında bölgesel farklılıkların yanı sıra işletme şekillerinin değişkenliği, kullanılan hayvan ırklarının ve yaşlarının çeşitliliği, beslenme düzeylerindeki farklılıklar gibi etmenler ile çalışmalarda taranan toplam hayvan sayısı ve sınırlı işletmelerden örneklemelerin yapılması gibi bir çok faktörlerin rol oynadığı gözlemlenmektedir. Mycoplasmaların pnömoni olgularında insidenslerini belirlemek amacıyla yapmış olduğumuz bu çalışmada incelenen 100 adet pnömoni vakasına 2565 hayvan arasında rastlanmıştır (%3.89). Belirlenen düşük oranın sebebi olarak, bu çalışmanın yapıldığı bölgede yetiştirilen hayvanların çoğunlukla yerli ırktan olmaları ve hastalıklara karşı diğer ırklardan daha dayanıklı olmaları düşünülebilir. Ayrıca, araştırmada incelenen hayvanların tümünün besi sığırı olması ve süt ineklerindeki tablonun araştırmaya dahil edilmemesi de diğer bir faktör olarak değerlendirilebilir.

Bakteriyel pnömoni etkenleri arasında *Pasteurella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. ve *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalar sıklıkla tanımlanmaktadır^{12,18,20}. Ancak çoğu çalışmada Mycoplasmaların varlığı göz ardı edilmektedir. Bunun başlıca sebepleri arasında, Mycoplasmaların bakteriyolojik izolasyonundaki zorluklar ile bu etkene karşı gerekli olan spesifik yöntemlerin uygulanmamış olması yer almaktadır.

M. bovis'in tek başına sığırlarda şiddetli mastitis ve artritis ile gnotobiotik buzağılarda subklinik ve nadiren de klinik pnömoniyeye neden olduğu

gösterilmiştir^{22,23}. *M. bovis* ile doğal enfekte pnömonili 1-6 aylık buzağılarda *P. multocida* ve *H. somnus* etkenlerinin aynı hayvanlardan izolasyonu bildirilmiştir²⁴. Gnotobiotik buzağılarda *M. bovis*'in *P. haemolytica*'dan daha önce inokulasyonu ile daha şiddetli pnömonilerin oluştuğu ve böylece pnömonilerin gelişmesinde bakteriler arasında sinerjik etkinin varlığı da kaydedilmiştir²⁵.

Sunulan çalışmada, PZR sonuçlarına göre toplam 19 adet pnömonili hayvanda Mycoplasma etkenlerinden *M. bovis*, *M. dispar* ve *M. bovirhinis* tespit edilmiştir. Histopatolojik sınıflandırmaya göre bu etkenlerin pnömoni tiplerine göre dağılımları incelendiğinde, 18 adet fibrinöz pnömoninin 15'inde Mycoplasma etkenlerinin bulunduğu dikkati çekmiştir. Bu sonuç, Mycoplasmaların daha çok fibrinli pnömonilerin etiolojisinde yer aldığı ve primer bir etken olarak bu tür pnömonilere neden olabileceği gibi, diğer bakterilerle sinerjik olarak da işe karışabileceği bilgisiyle^{2,3} uyumluluk göstermiştir. Çalışmanın esas amacı Mycoplasmaların insidensini ve hangi yöntemin daha üstün olduğunu belirlemek olduğundan, burada diğer muhtemel etkenlerin tayini ve tüm pnömoni tiplerinin sebeplerinin ayrıntılı araştırılması yapılmamıştır. Fibrinöz pnömonilerin etiolojisindeki bu yüksek Mycoplasma orantısından hareketle, çalışmanın yapıldığı Kars ilindeki sığırlarda fibrinöz pnömoni olgularında ilk aşamada Mycoplasma yönünden tedavi seçeneklerinin düşünülmesinin uygun olacağı söylenebilir.

Mycoplasma türlerine yönelik insidens çalışmalarında çok değişik oranların ortaya çıktığı gözlemlenmektedir. Tenk²¹, rastgele seçilmiş 595 adet pnömonili ve pnömonili olmayan sığırdaki kültür yöntemiyle %37 oranında *M. bovis* izole edildiğini, serum örneklerinde ise %11.3 oranında *M. bovis* antikorunu bulunduğunu bildirmektedir. Kültür yönteminin kullanıldığı bir başka çalışmada pnömonili ergin sığırlar arasında *M. bovis*'in %1.6 oranında bulunduğu kaydedilmektedir¹⁸. Diğer Mycoplasma etkenleri arasında *M. dispar* özellikle solunum sistemi hastalıklı sığırlarda tespit edilirken sığırlarda yaygın olarak bulunan *M. bovirhinis*'in ise patojen olmaktan daha ziyade fırsatçı bir mikroorganizma olduğu düşünülmektedir²⁶. Afrika ülkelerinden Benin'de yapılan bir çalışmada, *M. bovirhinis* 320 adet sığırın 7'sinde (%2.19) rapor edilmiştir²⁷. Yapılan bu çalışmada ise *M. bovis* pnömonili hayvanlar arasında %4, *M. dispar* %6 ve *M. bovirhinis* %11 oranında tespit edilmiştir.

M. bovirhinis'in sağlam hayvanlarda da rastlantısal olarak bulunabileceği bilgisi doğrultusunda ²⁶, çalışmadaki kataral ve purulent pnömonilerden izole edilen *M. bovirhinis*'in bu pnömonilere direkt neden olmadığı, ancak predispoze bir faktör olarak işe karıştığı veya rastlantısal olarak bulunduğu düşüncesi ön plana çıkmaktadır. Öte yandan, çalışmalar arasındaki büyük farklar, Mycoplasmaların insidenslerini belirlerken özellikle dikkatli olunması gerektiğini ve belirlenen etkenlerin hastalığın etiolojisinde gerçekten bir faktör olup olmadığının yorumu yapılırken de ayrıca özen göstermek gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu yorumun sağlıklı bir şekilde yapılabilmesi için de, histopatolojik muayenelerin gerekliliği ve patolojik olarak belirlenen lezyonlar ışığında muhtemel etiolojinin düşünülmesi fikri ağırlık kazanmaktadır. Bölgesel, sürüsel ve hayvansal faktörlerin, aynı zamanda etkeni belirleme yönteminin ve hassasiyetliklerinin, çalışmalarda söz konusu insidens farklarının ortaya çıkmasında önemli etkenler olabileceği düşünülmektedir.

Mycoplasmaların teşhisine yönelik çeşitli teknikler uygulanabilmektedir. Ancak özellikle kronik olarak hasta olan hayvanların akciğer dokusundan etken teşhisi, antibiyotik tedavisi ve bakterinin otolizinden dolayı zaman zaman zor olabilmektedir ²⁸. Pnömonik akciğer dokularından *M. bovis*'in belirlenmesine yönelik PZR ve kültür tekniklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada PZR tekniğinin %96.6 oranında hassaslıkta ve %100 oranında spesifik sonuç verdiği bildirilmiştir ²⁹. *M. bovis*'in varlığını kanıtlamak amacıyla 6 adet tanı yönteminin (kültür, ELISA, SDS-PAGE, dot blot, solusyonda nükleik asit hibridizasyon teknikleri ve PZR) kullanıldığı bir çalışmada da PZR tekniği diğer tüm tekniklerden daha üstün olarak nitelendirilmiştir ³⁰. Tanı amacıyla sınırlı olarak immunohistokimyasal yöntemler de kullanılmıştır ³¹. Immunohistokimya, etkeni lezyonlu bölge içerisinde gösterebilmesi açısından oldukça faydalı olmakla beraber oldukça zaman alıcı olması, kısıtlı sayıdaki örnekte uygulanabilmesi ve tekniksel güçlükler nedeniyle çok sayıda örneğin incelendiği çalışmalarda tercih edilmemektedir. Kültür yöntemi hem zaman alması hem de uygulanmasının güç olması nedeniyle pratik değildir. Ayrıca örneklerin bakteriyel kontaminasyonu önemli bir sorun olarak ortaya çıkabilmektedir. Ancak yöntem, sağladığı yüksek hassasiyet ve spesifiklik ve ayrıca çok çeşitli örneklerle uygulanabilirliği ile faydalı olabilmektedir. PZR tekniği sağladığı yüksek hassasiyet, spesifiklik

ve hız nedeniyle Mycoplasma etkenlerinin teşhisinde en başarılı şekilde kullanılan yöntemdir. Ancak tekniğin yaygın olarak kullanılması, standardizasyonu sağlama yönünden belirli ön çalışmaları gerektirmektedir. Bu çalışmada da PZR tekniği sağladığı yüksek hassasiyetlik ile etken izolasyonunda başarısız kalan kültür yöntemine göre çok daha üstündü. PZR tekniği ile spesifik primer çiftleri kullanılmak suretiyle hem Mycoplasmaların varlığı ortaya konulabilmiş hem de tür tayini yapılarak daha başarılı insidens sonuçları elde edilmiştir.

Fibrinöz pnömonilerde Mycoplasmaların harcinde *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Ureaplasma* ve *Mannheimia* gibi etkenlerin bulunabileceği akıldan çıkarılmamalıdır ³²⁻³⁴. Ayrıca bu bakterilere ya da viral pnömoni etkenlerine eşlik eder konumda *M. bovirhinis*'in bulunabileceği de unutulmamalıdır. Bunlara ek olarak, *M. bovirhinis*'in sağlıklı hayvanlarda da bulunabileceği ve bu nedenle araştırmaya dahil edilmediğinden dolayı incelenmeyen diğer hayvanlarda da mevcut olabileceği düşünülmelidir. Bu çalışmada, *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi)'e hem PZR hem de bakteriyolojik incelemelerle, araştırmanın yapıldığı 100 adet pnömonili hayvan arasında rastlanmamıştır. Bu bulgu, bu etken tarafından oluşturulan Sığırların Bulaşıcı Plöropnömonisi hastalığının bilğimiz dahilinde çalışmanın yapıldığı Kars ilinde daha önceden rapor edilmemesiyle uyusmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada Kars ilinde kesime sevk edilen sığırlar arasında *M. bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* ve *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi) etkenleri PZR ve kültür yöntemleri kullanılarak akciğer dokusundan tespit edilmeye çalışılmıştır. Kesimi takiben pnömoni tanısı konulan toplam 100 adet hayvan arasında PZR sonuçlarına göre bu etkenlerden *M. bovis*, *M. dispar* ve *M. bovirhinis* sırasıyla %4, %6 ve %11 oranlarında belirlenirken *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi)'e rastlanmamıştır. *M. bovirhinis* 1'er olguda *M. bovis* ve *M. dispar* ile birlikte bulunmuştur. Mycoplasmaların tespitinde PZR tekniğinin kültür yönteminden çok daha başarılı ve güvenli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, fibrinöz pnömoniler başta olmak üzere purulent ve kataral pnömonilerde Mycoplasmaların var olabileceği, bu nedenle tedavi metotları arasında bu etkenlere yönelik uygulamaların da düşünülmesi gerekliliği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Aytuğ CN:** Solunum sistemi hatalıkları. **In,** Aytuğ CN, Alaçam E, Görgül S (Eds): Sığır Hastalıkları. 109-127. TÜM-VET Hayvancılık Hizmetleri Yayını. İstanbul, Türkiye, 1989.
2. **Jones TC, Hunt RD, King NW:** The Respiratory System. **In,** Cann C (Ed): Veterinary Pathology, 6th ed. 947-973. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA, 1997.
3. **Hazıroğlu R:** Solunum Sistemi. **In,** Hazıroğlu R, Milli ÜH (Eds): Veteriner Patoloji, II. cilt. 1-130. Tamer Matbaacılık, Yayıncılık, Tan. Hiz. Tic. ve Paz. Ltd. Şti. Ankara, Türkiye, 1998.
4. **Egwu GO, Nicholas RAJ, Ameh JA, Bashiruddin JB:** Contagious bovine pleuropneumonia: An update. *Vet Bull*, 66, 875-888, 1996.
5. **Razin S, Freundt EA:** The mycoplasmas. **In,** Tansill B (Ed): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. 740-741. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA, 1984.
6. **Razin S, Yogev D, Naot Y:** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Mic Mol Biol Rev*, 62, 1094-1156, 1998.
7. **Alberti A, Addis MF, Chessa B, Cubeddu T, Profiti M, Rosati S, Ruiu A, Pittau M:** Molecular and antigenic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. *J Vet Diagn Invest*, 18, 41-51, 2006.
8. **Marques LM, Buzinhani M, Yamaguti M, Oliveira RC, Ferreira JB, Mettifofo E, Timenetsky J:** Use of a polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma dispar* in the nasal mucus of calves. *J Vet Diagn Invest*, 19, 103-106, 2007.
9. **Kobayashi H, Hirose K, Worarach A, Paugtes P, Ito N, Morozumi T, Yamamoto K:** In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. *J Vet Med Sci*, 60, 1299-1303, 1998.
10. **Miles K, Churchward CP, McAuliffe L, Ayling RD, Nicholas RAJ:** 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.
11. **Thomas LH, Swann RG:** Influence of colostrum on the incidence of calf pneumonia. *Vet Rec*, 92, 454-455, 1973.
12. **Özer H:** Besi danalarında eksudative pneumonilerin yayılışı. *Elazığ Bölgesi Vet Hek Od Derg*, 3, 63-70, 1985.
13. **Özer H:** Besi sığırlarında atipik interstitial pneumonielerin yayılışı. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg*, 1, 27-34, 1987.
14. **Caldow GL, Edwards S, Nixon P, Peters AR:** Associations between viral infection and respiratory disease in young beef bulls. *Vet Rec*, 122, 529-531, 1988.
15. **Haritani M, Nakazawa M, Hashimoto K, Narita M, Tagawa I, Nakagawa M:** Immunoperoxidase evaluation of the relationship between necrotic lesions and causative bacteria in lungs of calves with naturally acquired pneumonia. *Am J Vet Res*, 51, 1975-1979, 1990.
16. **Maity B, Deb P:** Seasonal variation in incidence of pneumonia in cattle. *Ind J Anim Sci*, 61, 261-262, 1991.
17. **Aytuğ N, Tavukçuoğlu F, Çöven F:** Bursa yöresindeki enzootik buzağlarında PI-3 virüsünün insidensi ve aşılamanın klinik pnömonilerin önlenmesindeki etkinliği üzerine bir araştırma. *Pendik Hayv Hast Merk Araşt Enst Derg*, 23, 51-57, 1992.
18. **Öztürk G, Özcan C, Kalender H:** Elazığ et ve balık kurumu mezbahasında kesilen sığırlarda rastlanan pnömonilerin patolojik ve bakteriyolojik olarak incelenmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 27, 163-174, 1996.
19. **Ortatatlı M, Çiftçi MK:** Konya bölgesi mezbahalarında kesilen besi danalarında pnömonilerin insidensi ve patolojisi. *Veterinarium*, 16, 24-35, 2005.
20. **Kılıç A, Muz A:** Pnömonili sığır akciğerlerinden bakteri izolasyonları ve izole Pasteurella'ların polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 217-223, 2002.
21. **Tenk M:** Examination of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *PhD Dissertation*, Szent István University, Budapest, Hungary, 2005.
22. **Gourlay RN, Thomas LH, Howard CJ:** Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with *Mycoplasma agalactiae subsp bovis*. *Vet Rec*, 98, 506-507 (1976).
23. **Thomas LH, Howard CJ, Stott EJ, Parsons KR:** *Mycoplasma bovis* infection in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. *Vet Pathol*, 23, 571-578, 1986.
24. **Buchvarova Y, Vesselinova A:** On the aetiopathogenesis of *Mycoplasma pneumonia* in calf. *Arch Exper Vet Med Leipzig*, 43, 685-689, 1989.
25. **Gourlay RN, Houghton SB:** Experimental pneumonia in conventionally reared and gnotobiotic calves by dual infection with *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci*, 38, 377-382, 1985.
26. **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.
27. **Adehan R, Youssao Abdou Karim I:** Epizootiology of pulmonary mycoplasmosis of domestic ruminants in Benin. *Revue Med Vet*, 153, 415-418, 2002.
28. **Nicholas RA, Ayling RD:** *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci*, 74, 105-112, 2003.
29. **Cai HY, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott JF:** Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *J Vet Diagn Invest*, 17, 537-545, 2005.
30. **Sachse K, Pfützner H, Hotzel H, Demuth B, Heller M, Berthold E:** Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Rev Sci Tech*, 12, 571-580, 1993.
31. **Gourlay RN, Thomas LH, Wyld SG:** Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Vet Rec*, 124, 420-422, 1989.
32. **Schiefer B, Ward GE, Moffatt RE:** Correlations of microbiological and histological findings in bovine fibrinous pneumonia. *Vet Pathol*, 15, 313-321, 1978.
33. **Gagea MI, Bateman KG, Dreumel TV, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA, Caswell JL:** Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest*, 18, 18-28, 2006.
34. **Tegtmeier C, Uttenthal A, Friis NF, Jensen NE, Jensen HE:** Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Zentralbl Veterinarmed B*, 46, 693-700, 1999.