

Koyun ve Keçilerde Bulaşıcı Agalaksi Hastalığının Bakteriyolojik ve PCR Metotları ile Araştırılması ^[1]

Hüban GÖÇMEN ¹  Mihriban ÜLGEN ² K.Tayfun ÇARLI ² Kaan ÖNAT ³
Serpil KAHYA ² Ümit ÖZDEMİR ⁴ Burak MAT ⁵

^[1] Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2011/57)

¹ Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner-Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-16059 Nilüfer, Bursa - TÜRKİYE

² Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-16059 Nilüfer, Bursa - TÜRKİYE

³ Manyas İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, TR- 10470 Manyas, Balıkesir - TÜRKİYE

⁴ Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, TR-34890 Pendik, İstanbul - TÜRKİYE

⁵ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvancılık Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı, TR- 42003 Selçuklu, Konya - TÜRKİYE

Article Code: KVFD-2014-11790 Received: 17.06.2014 Accepted: 08.09.2014 Published Online: 22.09.2014

Özet

Bu çalışmada, koyun ve keçilerde Bulaşıcı Agalaksi hastalığının varlığını bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile teşhis etmek amaçlandı. Bursa, Balıkesir, Çanakkale ve Edirne illerine ait koyun ve keçilerden toplanan 339 adet örnek bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle incelendi. Örneklerin 162 adedini süt örneği, 147 adedini göz svabı, 15 adedini eklem sıvısı, 11 adedini burun svabı ve 4 adedini de akciğer dokusu oluşturmuştur. Bakteriyolojik incelemede 29 izolat *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirildi. Uygulanan biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testleri sonucunda, 29 (%8.55) izolatın 25'i (%7.37) *Mycoplasma agalactiae* olarak, 2 (%0.58)'si *Mycoplasma ovipneumoniae* ve 2 (%0.58)'si de *Mycoplasma arginini* olarak identifiye edildi. Moleküler teşhiste ise, *polC*-PCR sonucunda %9.14 oranında *M. agalactiae* pozitif bulundu. PCR bulguları ile bakteriyolojik bulgular karşılaştırıldığında, 5 süt örneği ve 1 akciğer örneği *polC*-PCR ile *M. agalactiae* pozitif bulunurken, kültür ile negatif bulundu. *PolC*-PCR sonuçlarına göre, süt örnekleri %14.19 oranı ile, eklem sıvı örnekleri %13.33 oranı ile, göz svabı örnekleri %2.72 oranı ile ve akciğer örnekleri %50 oranı ile pozitif bulunurken, burun svabı örnekleri negatif bulundu. Bu çalışmada, Bulaşıcı Agalaksi hastalığının varlığı bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılmış ve başlıca hastalığa neden olan etkenin *M. agalactiae* olduğu tespit edilmiştir, hastalığa neden olan diğer mikoplazma etkenlerine rastlanılmamıştır.

Anahtar sözcükler: Bulaşıcı Agalaksi, *Mycoplasma agalactiae*, Bakteriyoloji, PCR, Koyun, Keçi

Investigation of Contagious Agalactia by Bacteriological and PCR Methods in Sheep and Goats

Abstract

The aim of this study was diagnosis that occurrence of Contagious Agalactia by bacteriological and molecular methods in sheep and goats. A total of 339 samples from sheep and goats in Bursa, Balıkesir, Çanakkale and Edirne provinces were examined by bacteriological and molecular methods. The samples were 162 milk samples, 147 eye swabs, 15 joint fluids, 11 nasal swabs and 4 lung tissue. In bacteriological examination, 29 isolates were evaluated as *Mycoplasma* sp.. As a result of biochemical tests and growth inhibition tests, 29 (8.55%) *Mycoplasma* sp. were identified as 25 (7.37%) *Mycoplasma agalactiae*, 2 (0.58%) *Mycoplasma ovipneumoniae* and 2 (0.58%) *Mycoplasma arginini*. In molecular diagnosis, *polC* gene-PCR results could be detected *M. agalactiae* positive with 9.14% rate. As a result of this, 5 milk samples and 1 lung tissue sample were detected positive by *polC*-PCR while negative by bacteriological examination. The results of *polC*-PCR detected *M. agalactiae* positive with 14.19% rate of milk samples, 13.33% rate of joint fluids, 2.72% rate of eye swabs and 50% rate of lung tissue samples but nasal swabs were detected as negative. In this study, presence of Contagious Agalactia were investigated by bacteriological and molecular methods and *M. agalactiae* was detected as a main agent which cause disease however other *Mycoplasma* species which cause disease were not observed.

Keywords: Contagious Agalactia, *Mycoplasma agalactiae*, Bacteriology, PCR, Sheep, Goat



İletişim (Correspondence)



+90 224 2940818



hubangocmen@gmail.com

GİRİŞ

Bulaşıcı Agalaksi hastalığı halk arasında 'süt kesen hastalığı' olarak bilinmektedir. Koyun ve keçilerde mastitis, süt kesilmesi, keratokonjunktivitis, artritis gibi tipik semptomlara sahiptir ve abort, genital lezyonlar, solunum sistemi rahatsızlıkları gibi atipik bulgularla da karşımıza çıkabilmektedir. Hastalığın başlıca etkeni *Mycoplasma agalactiae* (Ma) olmakla birlikte *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) ve *Mycoplasma putrefaciens* (Mp) türleri de hastalığa neden olmaktadır. Bulaşıcı agalaksi hastalığı, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün (OIE) bildirilmesi zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır ^[1]. Bulaşıcı agalaksi, hayvanlarda süt üretiminde azalmaya, genç hayvanlarda ölüme, gebelerde abortuslara neden olduğu için önemli ekonomik kayıplar meydana getirmektedir ^[2,3]. Bulaşıcı Agalaksi ile enfekte hayvanlardan etken başlıca süt, göz-burun akıntısı, açılmış eklemelerin akıntıları ile saçılmakta ve ayrıca dışkı, idrar ve genital sistem akıntıları da etken kaynağı olabilmektedir. Etken, klinik belirtiler ortadan kalkana kadar sütle minimum 12 ay saçılmakta, hayvanların klinik olarak iyileşmesinden sonra da etken bir yıldan fazla vücutta kalabilmektedir. Sürülerde böyle asemptomatik taşıyıcıların bulunması ciddi bir risk olarak görülmektedir. Bu asemptomatik hayvanlar etkeni genellikle dişilerde erkeklerden daha fazla olmak üzere genital yollarda ve daha az sıklıkla da dış kulak kanalında taşımaktadırlar. Bu olağan dışı bölgelerde konakçı savunma mekanizması iyi çalışmadığı için etkene avantaj sağlamaktadır. Gerek enfekte gerekse taşıyıcı hayvanlardan duyarlı hayvanlara etken meme, konjunktiva, sindirim, solunum, genital ve deri gibi birçok yolla bulaşabilmektedir. Özellikle meme, sindirim ve solunum en önemli bulaşma yollarıdır. İntensif yetiştiricilik yapılan işletmelerde solunum semptomları ile birlikte damlacık infeksiyonu daha fazla önem kazanmaktadır ^[4-7].

Bulaşıcı Agalaksi hastalığının laboratuvar teşhisinde enfekte hayvanlardan alınan süt örneği, göz, kulak ve burun svapları, eklem sıvısı örneklerinin; bakteriyolojik, serolojik ve moleküler metodlar ile incelenmesi sonucu hastalığa neden olan etkenler ortaya konulmaktadır. Türkiye'de mikoplazmaların enfekte hayvanlardan izolasyonu ile ilgili birçok çalışma mevcut olmasına rağmen ^[8-12], Bulaşıcı Agalaksi Hastalığı üzerindeki çalışma sayısı sınırlıdır ^[13-15]. Çetinkaya ve ark. ^[13], Doğu Anadolu bölgesinde yaptıkları çalışmada Bulaşıcı Agalaksi hastalığı etkeni *M. agalactiae*'nin yaygınlığını kültür ve PCR metodları ile %81.7 olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Özdemir ve Türkaslan ^[14] ise Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde Bulaşıcı Agalaksi salgınlarından *M. agalactiae*'yi %36.8 oranında izole etmişler ve ayrıca Bulaşıcı Agalaksi hastalığına sebep olan diğer türlerden Mmc (%4.16) ve Mcc (%3.47)'un da düşük oranlarda izole edildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, Marmara bölgesinde Bulaşıcı Agalaksi

hastalığının varlığını bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile araştırmak ve hastalığa neden olan mikoplazma türlerinin saha suşlarını ortaya koymak amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal Toplanması ve Örnekleme

Sunulan çalışma sırasında hayvanlardan alınan süt, eklem sıvısı ve göz ve burun svap örnekleri için gerekli izin Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 10.05.2011 tarihli ve 2011-05/03 no'lu karar ile onaylandı.

2010 ve 2012 yılları arasında Bursa, Balıkesir, Çanakkale ve Edirne illerinde Bulaşıcı Agalaksi semptomları gösteren ve semptom göstermediği halde anemneze göre şüphe edilen koyun ve keçilerden 335 adet örnek toplandı. Ayrıca Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilen pnömoni bulgusu taşıyan 4 adet akciğer örneği de incelemeye alındı. Buna göre toplam 339 örneğin; 190'ı keçi, 57'si koyun, 19'u oğlak, 6'sı teke, 27'si kuzu ve 6'sı koç'a ait numunelerdir. Toplanan örneklerin 162 adedi süt, 147'si göz svabı, 11'i burun svabı, 15'i eklem sıvısı ve 4 adedi ise akciğer örneğidir (Tablo 1). Tüm örnekler asepti antisepti kurallarına uyularak alındı ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı.

Bakteriyolojik İncelemeler

İzolasyon amacıyla laboratuvara getirilen süt örnekleri 3.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı besiyerine ekim için kullanıldı. Süt örnekleri, eklem sıvıları 10⁻¹'lik dilüsyonları hazırlanarak, akciğer örnekleri, göz ve burun svapları ise direkt olarak sıvı ve katı besiyerlerine ekildi. Katı besiyeri olarak *Mycoplasma Selective Supplement* (Oxoid SR0059) eklenmiş *Mycoplasma Agar Base* (Oxoid CM0401), sıvı besiyeri olarak ise yine *Mycoplasma Selective Supplement* eklenmiş *Mycoplasma Broth Base* (Oxoid CM0403) kullanıldı. İnoküle edilen sıvı besiyerleri ve agarlar 37°C'de %5 CO₂'li nemli ortamda 5-7 gün inkübe edildi. Bu süre sonunda stereomikroskopta x 35 büyütme ile incelenen katı besiyerlerinde mikoplazma şüpheli koloniler 3 kez pasajlandı ve ayrıca L formlarından ayırımı amacıyla kanlı agara (%5 koyun kanlı) pasajlandı ^[14].

Mycoplasma sp. şüpheli izolatları *Acholeplasma* sp.'den ayırmak için dijitonin duyarlılık testi, *Ureaplasma* sp.'den ayırmak için de üreaz testi yapıldı. Üç kez pasajlanarak saf kültürü hazırlanan ve *Mycoplasma* sp. olarak değerlendirilen izolatların tür identifikasyonu için glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi, tetrazolium redüksiyon testleri ve film ve spot oluşumu gibi biyokimyasal testler ve ayrıca Üreme İnhibisyon testi uygulandı ^[1]. Üreme İnhibisyon testinde kullanılan Ma, Mmc, Mcc, Mp antiserumları Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Moleküler İncelemeler

DNA Ekstraksiyonunda Roche High Pure PCR Template Preparation Kit, DNA Ekstraksiyon Kiti olarak kullanıldı. Kitin kullanma kılavuzunda belirtilen sıvı kültür ve örneklerden DNA ekstraksiyon yöntemi prosedürlerine göre *M. agalactiae* AIK suşunun DNA'sı ve direk olarak 339 adet şüpheli örnekten etken DNA'ları ekstrakte edildi. Şüpheli örnekler, PCR metodu ile sadece *M. agalactiae* yönünden test edildi.

Mycoplasma agalactiae spesifik primerleri, *poIC* geninden (MAPol-1F: 5-CAT TGA ACC TCT TAT GTC ATT TAC TTT G-3; MAPol-5R: 5-CTA TGT CAT CAG CTT TTG GGT GA-3) seçildi ve 265 baz çifti büyüklüğündeki ürünlerin amplifikasyonu hedeflendi. Toplam 25 µl'lik miktarlarda hazırlanan reaksiyon için; 2.5 µl 10X PCR Reaksiyon Buffer, 5 U/ µl *Taq* DNA polimeraz, dNTP'ler (300 µM dATP, dTTP; 150 µM dGTP, dCTP), 2 mM MgCl₂, 10 pmol primerlerden konuldu [17]. Tüm reaktifler Roche FastStart *Taq* DNA Polymerase, dNTPack paketinden kullanıldı. Negatif kontrol olarak *M. putrefaciens* (NCTC 10155) ve deiyonize su, pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan *M. agalactiae* AIK suşunun ekstrakte edilen DNA'ları kullanıldı. Tüm örneklerin amplifikasyonu Gradient Thermal cycler (Techne TC-3000G, Bibby Scientific, UK) cihazında gerçekleştirildi.

Reaksiyonda kullanılan DNA amplifikasyon parametreleri ise; 94°C'de 2 dakika ön ısıtmayı takiben 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 49°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzama (sentez) olmak üzere 30 döngü olarak gerçekleştirildi ve son sentezleme 72°C'de 5 dk. olarak tamamlandı [17]. Elde edilen PCR amplikonları, %2 agaroz jel kullanılarak 110 voltta 60 dk elektroforezde (Thermo Scientific Owl Easycast B2) yürütüldü. Süre sonunda agaroz jel, etidyum bromür ile 15 dk süre ile boyandı ve Vilber Lourmat Quantum 1100 marka Jel Görüntüleme ve Dökümantasyon Sistemi ile beyaz ışık ve UV ışığı altında DNA'ların görüntülenmesi sağlandı ve kayıtları alındı.

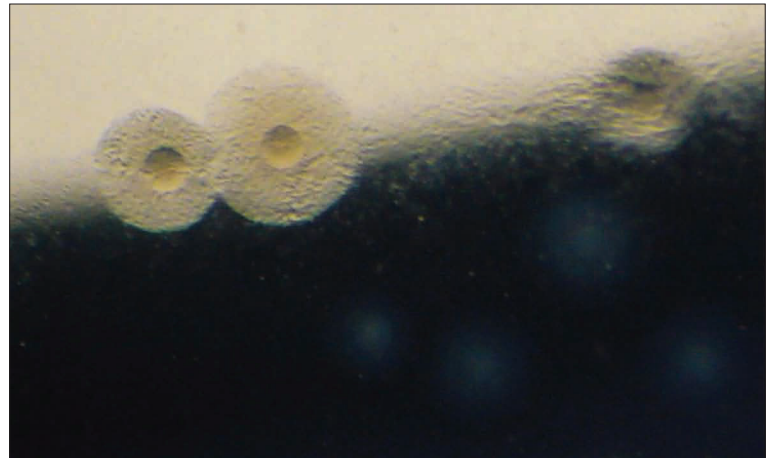
BULGULAR

Bakteriyolojik Bulgular

Toplanan 339 örneğin 29 (%8.55)'undan *Mycoplasma* sp. izole edildi. Mikoplazma kolonilerinin stereomikroskopta (x35) tipik sahanda yumurta görünümünde ortası düğmeli, kenarları yuvarlak ve küçük oldukları görüldü (Şekil 1). Yirmidokuz *Mycoplasma* sp.'nin 18 (%11.11)'i süt örneğinden, 4 (%2.72)'ü göz svablarından, 2 (%13.33)'si eklem sıvılarından, 3 (%27.27)'ü burun svablarından ve 2 (%50)'si akciğer örneklerinden izole edildi (Tablo 1).

Şekil 1. *Mycoplasma* sp.'nin koloni morfolojisi

Fig 1. Colony morphology of *Mycoplasma* sp.



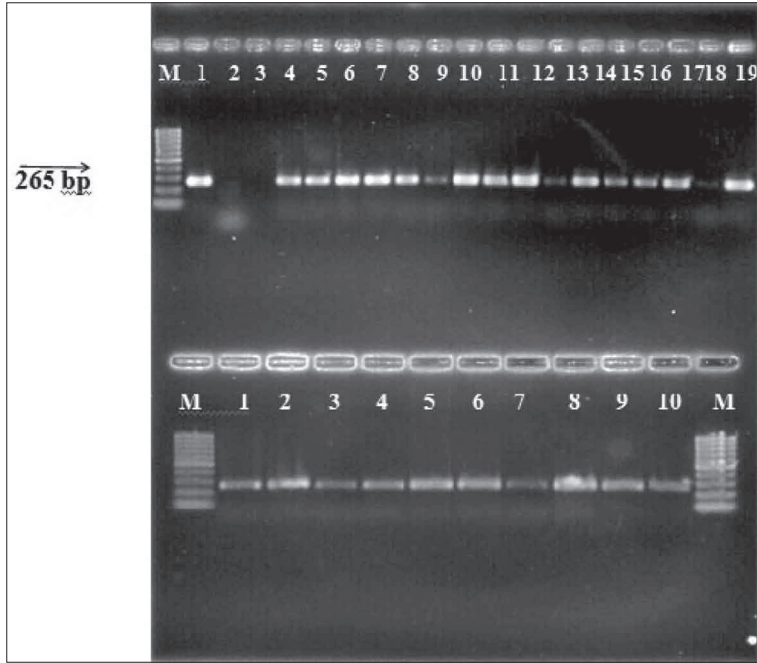
Tablo 1. Koyun ve keçilerden toplanan örneklerden elde edilen bakteriyolojik bulgular ve *M. agalactiae* *poIC*-PCR sonuçları

Table 1. Bacteriological findings and *M. agalactiae*-*poIC*-PCR results obtained from samples of goats and sheep

| Örnek Türü | Örnek Sayısı | <i>Mycoplasma</i> sp.-Bakteriyolojik Bulgular | | <i>M. agalactiae</i> - Kültür Bulguları | | <i>poIC</i> -PCR Bulguları | |
|--------------|--------------|---|----------|---|----------|----------------------------|----------|
| | | + Örnek Sayısı | Oran (%) | + Örnek Sayısı | Oran (%) | + Örnek Sayısı | Oran (%) |
| Süt | 162 | 18 | 11.11 | 18 | 11.11 | 23 | 14.19 |
| Göz svabı | 147 | 4 | 2.72 | 4 | 2.72 | 4 | 2.72 |
| Eklem sıvısı | 15 | 2 | 13.33 | 2 | 13.33 | 2 | 13.33 |
| Burun svabı | 11 | 3 | 27.27 | - | - | - | - |
| Akciğer | 4 | 2 | 50 | 1 | 25 | 2 | 50 |
| Toplam | 339 | 29 | 8.55 | 25 | 7.37 | 31 | 9.14 |

Tablo 2. İzole edilen mikoplazma suşlarının biyokimyasal özellikleri**Table 2.** Biochemical properties of mycoplasma strains as isolated

| İzole Edilen Suşlar (N) | Glikoz Fermentasyonu | Arjinin Hidrolizi | Fosfataz Aktivitesi | Tetrazolium Redüksiyonu (aerob/anaerob) | Film/Spot Oluşumu |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|---------------------|---|-------------------|
| <i>M. agalactiae</i> (25) | - | - | + | +/+ | Değişken |
| <i>M. ovipneumoniae</i> (2) | + | - | - | +/+ | - |
| <i>M. arginini</i> (2) | - | + | - | -/+ | - |



Şekil 2. *M. agalactiae* *polC*-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez (%2) görüntüsü. Üst sıradan M: Markır (100 baz çifti) (Thermo Scientific, SM0242), 1. kuyucuk: *M. agalactiae* pozitif kontrol (AIK suşu, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü), 2. kuyucuk: negatif kontrol- (*M. putrefaciens*-NCTC 10155 suşu), 3. kuyucuk: negatif kontrol (deiyonize su), 4-19 arası kuyucuklar: pozitif örnekler. Alt sıradan; M: Markır, 1-10 arası kuyucuklar; pozitif örnekler

Fig 2. Agarose gel electrophoresis (2%) image of *M. agalactiae* *polC*-PCR products. From top; M: Marker (100 base pair) (Thermo Scientific, SM0242), Lane 1: *M. agalactiae* positive control (AIK strain from Pendik Veterinary Control Institute), Lane 2 negative control: (*M. putrefaciens*-NCTC 10155 strain), Lane 3: negative control (PCR grade), Lane 4 to 19: positive samples. From bottom; M: Marker, Lane 1 to 10; positive samples

Biyokimyasal testler ve Üreme İnhibisyon testi sonucunda izolatların 25 (%7.37)'i *M. agalactiae* olarak tanımlandı. Ayrıca sadece biyokimyasal test sonuçlarına göre Bulaşıcı Agalaksi hastalığı etkeni olmayan 2 izolat *M. ovipneumoniae* ve diğer 2 izolat da *M. arginini* olarak tanımlandı (Tablo 2). *M. agalactiae* izolatlarının 18'i süt örneğinden, 2'si eklem sıvısı örneğinden, 1'i akciğer örneğinden ve 4'ü de göz svabından izole edildi. *M. ovipneumoniae* izolatlarının 1'i akciğer örneğinden ve 1'i burun svabından izole edilirken; *M. arginini* izolatlarının 2'si de burun svabından izole edildi (Tablo 1).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bulguları

PolC-PCR sonucunda %9.14 oranında *M. agalactiae* pozitif bulundu (Şekil 2). *PolC* -PCR sonuçlarına göre, 162 süt örneğinden 23 (%14.19)'ü, 15 eklem sıvı örneğinden 2 (%13.33)'si, 147 göz svabı örneğinden 4 (%2.72)'ü ve 4 akciğer örneğinden 2 (%50)'si *M. agalactiae* pozitif bulundu. Şüpheli örneklerin amplifiye DNA'larına uygulanan PCR sonucunda, PCR ürünleri 265 baz çifti olarak hesaplandı ve *M. agalactiae* pozitif kabul edildi. Burun svabı örneklerinden *polC*-PCR ile *M. agalactiae* saptanmadı. PCR bulguları ile bakteriyolojik bulgular karşılaştırıldığında, 5 süt örneği ve 1 akciğer örneği *polC*-PCR ile Ma pozitif bulunurken, kültür ile negatif bulundu (Tablo 1).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bulaşıcı agalaksi, hayvanlarda süt üretiminde azalmaya, genç hayvanlarda ölüme, gebelerde abortuslara neden olarak önemli ekonomik kayıplar meydana getirir [2,3]. Bulaşıcı Agalaksi, Akdeniz ülkeleri, Asya ve Afrika'da endemik, Amerika'da sporadik olarak seyretmekte ülkemizde ise endemilerle kendini göstermektedir. Abtin ve ark.^[18], İran'da Bulaşıcı Agalaksi semptomları gösteren hayvanlardan topladıkları örnekleri bakteriyolojik ve PCR metodları ile incelemiş ve sonucunda 102 örneğin 19 (%32.2)'unda *M. agalactiae* tanımlanmıştır. De La Fe ve ark.^[19] ise, İspanya'da süt, eklem ve kulak svabı örnekleri topladıkları 28 adet keçi sürüsünün %40'unda *M. agalactiae* saptamışlardır.

Türkiye'de en güncel koyun ve keçi mikoplazmaları üzerine araştırmaları Çetinkaya ve ark.^[12], öncelikle Keçilerin Bulaşıcı Plöropnömonisi hastalığının etkeni olan *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* 'nin Türkiye'deki yaygınlığı üzerine yapmıştır. Aynı araştırmacılar daha sonra mikoplazma aşı stratejileri geliştirmek amacıyla Bulaşıcı Agalaksi hastalık etkenlerinin Doğu Anadolu bölgesindeki illerde yaygınlığını araştırmışlardır. Süt örneklerinin bakteriyolojik ve Ma spesifik PCR

ile incelenmesi neticesinde %81.7'sinde *M. agalactiae* saptamışlardır [13]. Özdemir ve Türkaslan [14] ise yaptıkları çalışmada, Bulaşıcı Agalaksi'den şüpheli 22 adet koyun ve keçi sürüsünden toplam 144 örnek üzerinde çalışmışlar ve 53 (%36.8) örnekten *M. agalactiae*, 6 örnekten *Mmc* (%4.16) ve 5 örnekten de *Mcc* (%3.47) izole edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca coğrafik olarak, Marmara bölgesinde hastalığın Ege ve Akdeniz bölgelerine göre daha yoğun olduğu da aynı çalışmada vurgulanmıştır. Bu çalışmada ise Marmara bölgesindeki çeşitli illerden toplanan 339 örnekten 25 (%7.37) *M. agalactiae*, 2 (%0.58) *M. ovipneumoniae* ve 2 (%0.58) *M. arginini* izole edilmiştir. Buna göre Marmara Bölgesindeki koyun ve keçilerde Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan mikoplazma türü olarak *M. agalactiae* belirlenmiş, Bulaşıcı Agalaksi'nin diğer etkenleri olan *Mmc*, *Mcc* ve *Mp* türlerine rastlanmamıştır. Koyun ve keçilerde yapılan çalışmalarda Bulaşıcı Agalaksi Hastalığına neden olan mikoplazma türleri dışında, *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini* türleri de dikkat çekmektedir [10,20-22]. Türkiye'de Bulaşıcı Agalaksi hastalığına yönelik spesifik çalışma sayısı çok az olmakla birlikte mevcut çalışmalar ile karşılaştırıldığında çalışmamızdaki etken izolasyon oranının düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedeni örnekleme zamanı veya sürülerde uygulanan tedaviler olabilir [9]. Nitekim sürü sahiplerinden sürülerde uygulanan antibiyotik tedavileri ile ilgili net yanıtlar alınamamıştır.

Mikoplazmaların identifikasyonunda glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi ve tetrazolium redüksiyonu gibi biyokimyasal testlerden yararlanılır [7,23-25]. Bu çalışmada izole edilen mikoplazma suşları digitonin duyarlılığı, glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu özellikleri yönünden incelenmiş. Tüm *Mycoplasma* sp. izolatlarının digitonine duyarlılığı olduğu ve üreaz aktivitesi testinin negatif olduğu belirlenmiştir. *M. agalactiae* izolatlarının hepsinin glikoz ve arjinin testlerine negatif, fosfataz ve tetrazolium testlerine pozitif yanıt verdiği ancak film ve spot oluşumunda değişkenlik olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda uygulanan Üreme İnhibisyon testinde, 25 izolatın üremesi *M. agalactiae* antiserumları ile inhibe olmuş ve inhibisyon alanları net olarak gözlenmiştir. Çalışmalarımız sonucunda identifiye edilen *M. agalactiae* saha suşlarının literatürlerde belirtilen biyokimyasal özellikleri ile uyumluluk gösterdiği, atipik biyokimyasal veri gösteren izolat bulunmadığı gözlenmiştir [5,6].

Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan *M. agalactiae* etkeninin bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu zaman alıcı prosedürler olduğu için daha hızlı teşhis ve identifikasyon aracı olan moleküler metotlara başvurulmaktadır. Özellikle mikoplazmaların kültürde nazlı ve yavaş üremeleri, serolojik teşhislerde erken infeksiyondan 10-14 gün sonra sonuç vermesi, kronik vakalarda yetersiz sensitivite ile karşılaşılmaması ve yanlış pozitifliklerin meydana gelmesi, immunosupresyon ve

antibiyotik tedavileri geleneksel diyagnostik mikrobiyolojik analizlerde önemli sorunları ortaya çıkartmaktadır.

Mikoplazmaların hızlı teşhisi ve identifikasyonu için PCR tabanlı teşhis analizleri geliştirilmiş olup, amplifikasyon analizlerinde hedef gen, hem korunan hem de değişken sekansları içeren 16 S rRNA (*rrs*) genleri olmuştur [26]. PCR ile yakın türler arasında ya da alt tipler arasında ayırım yapılabilir ve direkt klinik örneklerden hızlı teşhis mümkün olmaktadır. PCR metodunda örneklerin kültürlerinden ya da direkt klinik örnekten DNA ekstraksiyonları yapılabilir. Tola ve ark. [27] direkt koyun sütlerinden guanidium thiocyanate [28] ekstraksiyon metodunu uygulamış ve 357 örnekten 153'ünde *M. agalactiae*-PCR pozitif bulmuştur. Direkt ekstraksiyon yöntemi kullanılan diğer bir çalışmada 58 koyun ve keçi süt örneğinde %81.7 oranı ile *M. agalactiae* identifiye edilmiştir ve kültür sonuçları ile uyumlu sonuç alınmıştır [13]. Çalışmamızda ise direkt örneklerden uygulanan ekstraksiyon metodu sonucunda elde edilen PCR pozitiflik oranı diğer çalışmalara göre daha düşüktür. Ancak çalışmamızda kültür sonuçları (%7.37) ile karşılaştırıldığında PCR da elde edilen *M. agalactiae* pozitiflik oranının (%9.14) yüksek olduğu gözlenmiştir.

M. agalactiae'nin moleküler teşhisinde kullanılan farklı hedef gen bölgelerini baz alan spesifik primerler ile PCR metotları uygulanmıştır [12,29,30]. Marena ve ark. [17] yaptığı çalışma ile *uvrC*-PCR amplifikasyonunda bağlanma sıcaklıklarındaki farklılıkların yanında her iki metotta da *M. agalactiae* ve *M. bovis* suşları arasındaki filogenetik yakınlığa rağmen aynı duyarlılıkta saptama oranını sağlayabilmişlerdir. Fakat standart şartlar altındaki laboratuvarlar arasında uygulanan *uvrC*-PCR metodunun sonuçları uyumluluk göstermezken, *polC*-PCR metodunun sonuçları açık ve kesin şekilde uyumluluk göstermiştir. Yaptığımız çalışmada, *M. agalactiae* *polC* geni ile yapılan PCR sonucunda %9.14 oranında *M. agalactiae* pozitif bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada, Bulaşıcı Agalaksi hastalığının varlığı bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılmış ve bölgemizde hastalığa neden olan başlıca etkenin *M. agalactiae* olduğu saptanmıştır. Koyun ve keçilerden toplanan 162 adet süt örneği, 147 adet göz ve 11 adet burun svabı, 15 adet eklem sıvısı ve 4 adet akciğer örnekleri olmak üzere toplam 339 örneğin 29'undan *Mycoplasma* sp. izole edilmiş ve izolatların 25 (%7.37)'i *M. agalactiae*, 2 (%0.58)'si *M. ovipneumoniae* ve 2 (%0.58)'si *M. arginini* olarak identifiye edilmiştir. PCR sonucunda ise *M. agalactiae*'nin *polC*-PCR metodu uygulanarak %9.14 saptama oranı sağlanmıştır.

Türkiye'de Bulaşıcı Agalaksi hastalığına neden olan tüm etkenlerin yaygınlığı ve dağılımının tespit edilmesine, saha suşlarının ortaya konulmasına ve varsa diğer ülkelerdeki suşlar ile genetik yakınlıklarının belirlenmesine, aşılardan bu yerel suşları içerecek şekilde üretilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. **Office International des Epizooties (OIE):** Contagious agalactia. In, Terrestrial Manual, 992-997, 2008.
2. **Bergonier D, Berthelot X, Poumarat F:** Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev Sci Tech*, 16, 848-873, 1997.
3. **Lambert M:** Contagious agalactia in sheep and goats. *Rev Sci Tech*, 6, 699-711, 1987.
4. **Nicholas RAJ:** Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin Res*, 45, 145-149, 2002.
5. **Madanat M, Zendulkova D, Pospisil Z:** Contagious Agalactia of sheep and goats. *Acta Vet Brno*, 70, 403-412, 2001.
6. **Corrales JC, Esnal A, Fe C, Sanchez A, Assunção P:** Contagious agalactia in small ruminants. *Small Rumin Res*, 68, 156-166, 2007.
7. **Nicholas RAJ, Ayling R, McAuliffe A:** Contagious Agalactia. In, *Mycoplasma Diseases of Ruminants* 98-113, Cabi Publishing, UK, 2008.
8. **Özen H, Kahraman M, Şahin M, Özcan K:** Pnömonili Sığırlarda *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* ve *M. mycoides* subsp. *mycoides* (küçük koloni tipi)'in PZR ile belirlenerek patolojik bulguların incelenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (1): 125-133, 2009.
9. **Akan M, Babacan O, Torun E, Müştak HK, Öncel T:** Diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle by ELISA and PCR. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20 (2): 249-252, 2014. DOI: 10.9775/kvfd.2013.9959
10. **Kılıç 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, 1525-1531, 2013.
11. **Kahya S, Temelli S, Eyigor A, Carli KT:** Real-Time PCR, bacteriology and serology for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken breeder flocks. *Vet Microbiol*, 144 (3-4): 319-324, 2010.
12. **Cetinkaya B, Kalın R, Karahan M, Atıl E, Manso-Silvan L, Thiaucourt F:** Detection of contagious caprine pleuropneumonia in East Turkey. *Rev Sci Tech*, 28, 1037-1044, 2009.
13. **Çetinkaya B, Karahan M, Kalın R, Atıl E:** Türkiye'nin doğusundaki ruminant mikoplazmalarının biyoçeşitliliği: Aşı ve kontrol stratejileri için uygulamalar. IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 05-07 Ekim, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 9-12, 2010.
14. **Özdemir Ü, Türkaslan J:** Bulaşıcı Agalaksi salgınlarından izole edilen *Mycoplasma* türleri. *Pendik Vet Mikrobiol Derg*, 34, 1-2, 2003.
15. **Önat K, Temizel EM, Göçmen H, Mecitoğlu Z, Kasap S, Ülgen M:** *Mycoplasma agalactiae* ile doğal enfekte bir keçi işletmesinde Tylosinin etkilerinin değerlendirilmesi. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg*, 30, 13-16, 2011.
16. **Nicholas R, Baker S:** Recovery of Mycoplasmas from animals. In, Miles R, Nicholas R (Eds): *Methods in Molecular Medicine, Mycoplasma Protocols*. 37-50, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
17. **Marenda MS, Sagne E, Poumarat F, Citti C:** Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiology*, 151, 475-489, 2005.
18. **Abtin AR, Pourbakhsh SA, Ashtari A, Bayatzadeh MA, Barani SM, Ahangaran S:** Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and polymerase chain reaction (PCR) from sheep of Qom province. *Arch Razi Inst*, 68 (1) :11-16, 2013.
19. **De la Fe C, Assuncao P, Antunes T, Rosales RS, Poveda JB:** Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *The Vet J*, 170, 257-259, 2005.
20. **Ongor H, Kalin R, Acik MN:** Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* from goats with nasal discharge by culture and polymerase chain reaction. *Pak Vet J*, 31, 244-248, 2011.
21. **Goltz JP, Rosendal S, McCraw BM, Ruhne HL:** Experimental studies on the pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* fort he respiratory tract of goats. *Can J Vet Res*, 50, 59-67, 1986.
22. **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.
23. **İzgür M:** Mycoplasma, Ureaplasma, Acheloplasma, Spiroplasma ve Erysipelothrix enfeksiyonları. In, Aydın N, Paracıkoğlu J (Eds): *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. 293-304, İlke-Emek Yayınları Ankara, 2006.
24. **Walker RL:** Mollicutes. In, Hirsh DC, Zee YC (Eds): *Veterinary Microbiology*. 3rd ed., 165-172, Blackwell Publishing, Iowa, 1999.
25. **Poveda JB:** Biochemical characteristics in Mycoplasma identification. In, Miles RJ, Nicholas RAJ (Eds): *Methods in Molecular Biology, Vol. 104: Mycoplasma Protocols*. 69-78, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1998.
26. **Johansson KE, Heldtander MUK, Pettersson B:** Characterization of Mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. In, Miles RJ, Nicholas RAJ (Eds): *Methods in Molecular Medicine, Vol 104, Mycoplasma Protocols*. 145-163, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
27. **Tola S, Angio A, Rocchigiani A, Idini G, Manunta D, Galleri G, Leori G:** Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 54, 17-22, 1997.
28. **Bashiruddin JB:** Extraction of DNA from Mycoplasmas. In, Miles RJ, Nicholas RAJ (Eds): *Methods in Molecular Medicine, Vol 104, Mycoplasma Protocols*. 141-144, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
29. **Subramaniam S, Bergoiner 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 and Cell Probes*, 12, 161-169, 1998.
30. **Bashiruddin JB, Frey J, Königsson MH, Johansson KE, Hotzel H, Diller R, Santis DP, Botelho A, Ayling RD, Nicholas RAJ, Thiaucourt F, Sachse K:** Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. *Vet J*, 169, 268-275, 2005.