

**KARS YÖRESİNDE SIĞIR PNÖMONİLERİNDEN
MİKOPLAZMALARIN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU
VE ANTİBİYOTİKLERE OLAN DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ (*)**

**THE ISOLATION, IDENTIFICATION AND
DETERMINATION OF SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF
MYCOPLASMAS IN CATTLE PNEUMONIA IN KARS DISTRICT**

Mitat ŞAHİN**

ÖZET

Bu çalışma Kars yöresinde, sığır pnömonilerinden mikoplazmaların izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarını saptamak amacıyla yapıldı.

Araştırmada Kars Belediye Mezbahası'nda kesilen 896 sığıra ait akciğerlerin makroskobik incelenmesi sonucu pnömonili görülen 76 (%8.48) adet, KAÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına teşhis amacıyla getirilen, pnömonili 33 adet akciğer olmak üzere toplam 109 pnömonli akciğer kullanıldı. Pnömonik akciğerlerden, mikoplazmaların izolasyonu amacıyla PPLO agar ve PPLO (Difco) buyyondan yararlanıldı.

Pnömonili akciğerlerden toplam olarak 12 (%11.00) mikoplazma suşu izole edildi. İzole edilen mikoplazma suşları, digitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu, arginin hidrolizi, fosfataz testi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu gibi biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testi ile identifiye edildi. İzole edilen 12 Mikoplazma suşunun 6'sı (%50) *M. bovis*, 4'ü (%33.33) *M. bovirhinitis*, 2'si (%17.67) *M. arginini* olarak identifiye edildi. İzole edilen mikoplazmalardan 7'si *Pasteurella multocida*, *P. haemolytica* ve *Staphylococcus sp.* ile birlikte 5'i de yalnız izole edildi.

İdentifiye edilen mikoplazma suşlarının, yapılan antibiyotik duyarlılık testinde tüm suşların enrofloksasin, danofloksasin, tilmikosin, tetrasiklin ok-

* Aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.

sitetrasiklin'e duyarlı, eritromisin ve gentamisine az duyarlı, streptomisine ise dirençli olduğu saptandı. Araştırmada 109 pnömonili akciğerin 43'ünden (%39.44) rutin yöntemlerle, 15 (%28.30) *E.coli*, 11 (%20.75) *Pasteurella haemolytica*, 8 (%15.09) *P.multocida*, 8 (%15.09) *Staphylococcus sp.*, 7 (%13.20) *Streptococcus sp.*, 3 (%5.66) *Bacillus sp.* ve 1(%1.88) *Actinomyces sp.*, olmak üzere toplam 53 bakteri suşu identifiye edildi.

Sonuç olarak, sığır pnömonilerinde mikoplazmaların primer etkenler arasında olabileceği ve pnömoni olgularında etiyolojik etkenler aranırken mikoplazmalar da göz önünde bulundurulmalıdır.

SUMMARY

In this study, the aim was to isolate and identify and determine the antibiotic sensitivity of mycoplasmas in cattle pneumonia. The total 109 lungs with pneumonia; 33 of them brought to examine into the Microbiology laboratory; 76 of them from 896 cattle slaughtered in the abattoir of Kars Municipality, were used in the research. The species taken from the lungs with pneumonia were cultured for isolation of mycoplasmas into the PPLO agar and broth (Difco).

The mycoplasma species were isolated using with the biochemical test such as digitonine sensitivity, glucose fermentation, arginine hydrolysis, phosphatase test, tetrazolium reduction, film and spot formation, Growth Inhibition Test (GI). The six (50 %) of isolated 12 (11.00%) mycoplasma species as *M.bovis*, four (33.33%) as *M.bovirhinis* and two (17.67%) of them as *M.arginini* were identified. The seven mycoplasmas with *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, and *Staphylococcus sp.* and five of them without any species were isolated.

As a result of antibiotic sensitivity test, all isolated mycoplasma species were found sensitive to enrofloxacin, danofloxacin, tilmicocin, tetracycline, oxytetracycline, less sensitive to erythromycin and gentamycin, resistant to streptomycin.

Total 53 bacteria strains including, 15 *E.coli* (28.30%), 11 *P.haemolytica* (20.75%), 8 *P.multocida* (15.09%), 8 *Staphylococcus sp.* (15.09%), 7 *Streptococcus sp.* (13.20%), 3 *Bacillus sp.* (5.66%), 1 *Actinomyces sp.* (1.88%) from the 43 (39.44%) of 109 pneumonic lungs were isolated by using routine procedures.

nının Mycoplasmatales takımında yer alırlar. Bu takım Mycoplasmataceae, Acholeplasmataceae, Spiroplasmataceae olmak üzere üç familyadan oluşmaktadır. Mycoplasmataceae familyasında, Mycoplasma ve Ureaplasma olmak üzere iki genus yer alır. Bu familyaların üyeleri üremeleri için sterole ihtiyaç duyarlar. Mollicutes sınıfının genel ismini almış olan miko-plazmalar, hücre duvarından yoksun, en küçük, en basit, kendi kendine çoğalabilen ve minimal hücre kavramına en yakın, canlı ve cansız ortamlarda üreyebilen mikroorganizmalardır (3, 10, 12).

Mikoplazmaların konakçı dışı yaşam sürdürmeleri çok sınırlıdır (15, 16). Konakçıya spesifik (sığır, koyun, keçi, kanatlı, insan) olan bu mikroorganizmalar mukozal yüzeylerde (16), saprofit ve patojen (1) olarak yaşarlar ve genellikle konjunktiva (2), nazal kavite (15), orofaringial kavite (19), larinks (2), bağırsak ve genital sistemlerden (22) sıklıkla izole edilirler. İnfeksiyonun mekanizmasında konakçı, mikoplazma ve çevre epidemiyolojik üçgeni arasında sıkı bir ilişki vardır (5, 26, 33). Buzağı ve ergin sığırların pnömonik ve nonpnömonik akciğerlerinden çok sayıda (*M. bovis*, *M. dispar*, *M. arginini*, *M. bovis genitalium* gibi) mikoplazma türü izole edilmiştir (2, 6, 26). Sığırlarda hafif subklinik pnömoni oluşturan mikoplazmalar, infeksiyonun ilerlemesiyle kronik interstisyel pnömoni oluştururlar. (26, 33). Allen ve ark. (2), üst ve alt solunum yollarında klinik bulgular görülen 59 besi buzağısından aldıkları nazofaringial sıvı ve bronşoalveolar yıkantı sıvısının bakteriyolojik yoklamasında nazofaringial sıvıaplardan 21 (%26) *M. bovis*, 13 (%21) *M. bovirhinis*, bronşoalveolar yıkantı sıvısından ise 24 (%36) *M. bovis*, 14 (%19) *M. bovirhinis* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar diğer bakteriyel etkenlerden *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida*, *Haemophilus somnus*, *Streptomyces spp.*, *Neisseria spp.* ve *Bacillus spp.* izole ettiklerini pnömoninin hafif seyrettiğini ve ölüme sebep olmadığını, izolatlardan *M. bovis*'le *P. multocida*'nın prevalansının sık olduğunu belirtmişlerdir. Kim ve ark. (19), mezahada kesilen 871 sığırın 178'inden pnömoni lezyonları tesbit etmişler ve infekte lezyonlardan 17 *M. bovirhinis* ve 2 *M. dispar* izole etmişlerdir. Umlauf ve ark. (34), Almanya'da sığır pnömonilerinin etiyojisi ile ilgili yaptıkları bir araştırmada, üç yetiştirme ünitesinde bulunan 2000 buzağıdan rasgele faringial sıvıaplar almışlar ve bunların % 7.9'undan *P. haemolytica*, % 5'inden *P. multocida*, % 7.9'undan *M. bovis* izole ve identifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Jasper (18), 264 bronkopnömonili sığır akciğerinden 32 (%12)

mikoplazma suşu izole etmiş, bunların 18'i *M.bovirhinis*, 3'ü *M.bovis* 2'si *M.bovigenitalium*, 3'ü de *Acholeplasma laidlawii* olarak tanımlanmıştır. Altı suşu da klasifiye edememiştir. Araştırmacı mikoplazmaların sığırların solunum sistemi infeksiyonlarında etiyolojik etken olabileceğini belirtmiştir. Erdağı ve ark. (10), Trakya ve Marmara Bölgesinde, buzağı ve dana pnömonilerinde bakteriyel ve mikoplazmal etkenlerin izolasyonu amacıyla yaptıkları çalışmada 80 pnömonili akciğerden 6 (%7.5) *M. bovis*, 56 (%70) *P.haemolytica*, 24 (%30) *E.coli*, 34 (%42.5) *Str. pnömonia*, 24 (%30) *Corynebacterium pyogenes* ve 9 (% 11.5) *Staph. aureus* izole etmişlerdir. Mikoplazmal infeksiyonların başlıca yayılma yolu aktif veya portör hastalardan inhalasyon yoluyla olmaktadır. Doğal koşullar altında bulaşma direkt temas veya ot, yem, suluk gibi cansız vasıtalarla indirekt olarak meydana gelmektedir (3, 10, 21, 33).

Kars yöresinde ilk kez yapılan bu çalışma ile, sığır pnömonilerinden, mikoplazmaların izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarını saptamak amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Pnömonik Akciğer Örnekleri: Bu çalışmada, Ocak-Aralık 1995 tarihleri arasında Kars Belediye Mezbahası'nda kesilen 896 adet, 1-3 yaşları arasındaki sığırlara ait akciğerlerin, makroskopik olarak incelenmesi sonucu pnömonik bulunan (verminöz pnömoni hariç) 76 adet akciğer ile, KAÜ. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına teşhis amacıyla getirilen 33 adet olmak üzere toplam 109 adet sığır akciğer örneği araştırmanın materyalini oluşturmuştur.

Standart suşlar: Araştırmada kullanılan *M. bovis* (PG45), *M. bovirhinis* (PG43) ve *M. arginini* (G230) standart suşları, Dr. J.G. TULLY'den (Mycoplasma Section, Frederick Cancer Res. Dev. Center, Frederick, USA) temin edildi. Bu standart suşlar üreme inhibisyon testi antijeninin hazırlanmasında kullanıldı.

Besiyerler: Pnömonik akciğerlerden mikoplazmaların izolasyonu amacıyla PPLO Agar ve PPLO Broth (Difco), diğer bakterilerin izolasyonu için kanlı agar (% 7 defibrine koyun kanlı, Blood Agar Base - Oxoid). MacConkey Agar (Oxoid), EMBAgar (Oxoid), Nutrient buyyon ve Serumlu buyyon kullanıldı.

Antibiyotik Diskleri: Patolojik materyallerden izole edilen mikoplazma suşlarının antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesinde Enrofloxacin (5 mcg) (Bayer), Danofloxacin (5 mcg) (Difco), Tilmycocin (10 mcg) (DİF) oxytetracycline (30 mcg), Tetracycline (10 mcg), Streptomycine (10 mcg), Gentamicin (10 mcg) ve Erithromycine (15 mcg) (Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü) diskleri kullanıldı.

Antijen hazırlanması: Çalışmada kullanılan *M. bovis* (PG45), *M. bovirhinis* (PG43) ve *M. arginini* (G230) standart suşları, PPLO katı besiyerinde üretildikten sonra tek koloni alınarak PPLO sıvı besiyerine ekildi ve 37 °C'de 48-72 saat inkübe edildi. Daha sonra kültür 10.000 g de 60 dakika santirifüje edildikten sonra üst kısım atılıp dipteki tortu PBS ile üç kez yıkayıp 1/100 oranında distile su ile sulandırılarak antijen hazırlandı.

Antiserum elde edilmesi: Bu amaçla Senterfit (31)'in bildirdiği yöntem kullanıldı.

Antiserum disklerinin hazırlanması: Disklerin hazırlanmasında Clyde (7) in bildirdiği yöntem kullanıldı. Tavşanlardan elde edilen immün serumlar, 0.2 um'lik milipor filtrelerle sterilize edilerek 6 mm çapındaki Whatman (No: 40) filtre kağıdından hazırlanan disklere emdirilerek kurutuldu. Üreme inhibisyon testinde kullanılan bu diskler +4 °C'de saklandı (16,32).

Taze maya ekstraktının hazırlanması: Bu amaçla hazırlanan maya ekstraktı 0.2 um'lik milipor filtrelerden geçirilerek sterilize edildikten sonra 10'ar ml olarak steril şişelere taksim edildi. Kullanılncaya kadar -20 °C'de saklandı (16, 32).

At serumunun hazırlanması: At serumu su banyosunda 56 °C'de 30 dakika tutularak inaktive edildi (29). İnaktive edilen serum 0.2 um'lik milipor filtrelerden geçirilerek sterilize edildikten sonra 20 ml'lik steril şişelere bölünerek -20 °C'de saklandı (27, 30).

Talyum asetat solüsyonunun hazırlanması: Bir gram talyum asetat 80 ml distile suyla kaynayan su içerisinde çözüldürüldükten sonra 2 ml'lik şişelere bölünüp 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilerek +4 °C'de saklandı (21).

Besiyerlerinin hazırlanması: Mikoplazmaları üretmek amacıyla 1000 ml katıbesiyeri hazırlamak için 35 g PPLO Agar (Difco) tartılarak 680 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Otoklavda sterilize edildi. Daha sonra besiyerine aseptik şartlarda, 200 ml steril at serumu, 100 ml steril taze maya ekstraktı, 500 IU/ml penisilin G, 20 ml talyum asetat (1/80) ilave edilip pH 7.6 - 7.8'e ayarlanarak 9 cm çapında petri kutularına döküldü.

Mikoplazma sıvı besileri hazırlamak amacıyla 2.1 g PPLO Broth (Difco) 70 ml distile suda çözdürülerek otoklavda steril edildi. Besiyerine aseptik şartlarda steril at serumu 20 ml, taze maya ekstraktı 10 ml, penisilin G 500 IU/ml, talyum asetat 2 ml aseptik şartlarda katılarak pH'sı 7.6-7.8'e ayarlanıp steril tüplere 5'er ml miktarında taksim edildi.

Mikoplazmalar dışındaki diğer bakterilerin izolasyonu amacıyla kullanılan katı ve sıvı besi yerleri bilinen rutin yöntemlerle hazırlandı.

Ekimler ve izolasyon çalışmaları: Pnömonik akciğerlerden bir parça (1gram) alınarak steril havanda steril kum yardımıyla 10 ml sıvı besiyerinde (PPLO buyyon) iyice ezilerek süspanse edildi. Hazırlanan bu süspansiyondan 0.1 ml alınarak PPLO katı ve sıvı besiyerine ve ayrıca kanlı agara ekimleri yapıldı. Ekim yapılan mikoplazma besiyerleri 2.5 litrelik jarlarda (Merck), nemli ve mikroaerofilik ortamda (Anaerocult C, Merck) 37 °C'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Mikoplazmalar dışındaki bakterilerin izolasyonları amacıyla ekim yapılan besiyerleri, 37 °C'de 3 gün süreyle aerobik ortamda inkübe edilerek değerlendirildi.

İdentifikasyon çalışmaları: İzole edilen mikoplazma suşlarının identifikasyonu amacıyla, dijitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu, fosfataz testi ile üreme inhibisyon testinden yararlanıldı (27, 29).

Dijitonine duyarlılık: Bu test Tully (32)nin bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu amaçla 30 mg dijitonin 2 ml % 95'lik etil alkol içerisinde çözdürülerek % 1.5'lik dijitonin solüsyonu hazırlandı. Solüsyon, Whatman (No: 40) filtre kağıdından hazırlanan 6 mm çapındaki disklere her bir diske 0.025 ml dijitonin emdirildi. Diskler kullanılmaya kadar +4 °C'de saklandı.

Glikoz fermentasyonu: Bu test, Razin ve Cirillo (28)nun bildirdiği yöntemle göre % 10'luk glikoz solüsyonundan 5 ml'lik PPLO buyyonlara 0.5 ml ilave edilerek % 1 glikoz içeren sıvı besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerine indikatör olarak % 0.02 oranında fenol red katıldı.

Anjinin hidrolizi: Bu test Razin (27)nin bildirdiği yönteme göre, %2'lik arginin solüsyonundan 5 ml'lik PPLO buyyonlara 0.01 ml ilave edilerek % 0.2 arginin içeren ve pH'sı 7 olan sıvı besiyerleri hazırlandı. İndikatör olarak da bu besiyerine % 0.02 Oranında fenol red ilave edildi.

Tetrazolium redüksiyonu: PPLO agara steril 2,3,5 -triphenyltetrazolium chlorid'in % 0.02 oranında katılmasıyla hazırlandı (30).

Film ve spot oluşumu: PPLO buyyon ve agara ekimi yapılan suşların 37 °C'de, nemli ve mikroaerofilik ortamda 7 gün süreyle inkübasyonu sonucu, buyyonun üst kısmında ince bir tabakanın (film), agarda ise siyah beneklerin (spot) oluşması pozitif olarak oluşmaması ise negatif olarak kabul edildi (33, 40).

Fosfataz testi: Katı PPLO besiyerine steril phenolftalein diphosphat'tan % 0.1 oranında katılarak hazırlandı. Ayıraç olarak 5 N NaOH kullanıldı (27).

Üreme İnhibisyon Testi: Bu test, Clyde (7)ın bildirdiği yönteme göre yapıldı. Sıvı besiyerinde hazırlanan mikoplazma kültürlerinden 0.1 ml alınarak PPLO katı besiyerine silme ekimi yapıldı. Daha sonra standart antijenlerden hazırlanan immun serum diskleri ekim yapılan besiyeri üzerine kondu ve 37 °C'de, nemli ve mikroaerofilik ortamda 5 gün süreyle inkübe edildi.

Antibiyoik duyarlılık testi: Çalışmada izolasyonu yapılan mikoplazma suşlarının antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesinde Kirby-Bauer (4) disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Test edilecek kültürden 0.1 ml alınarak steril bir baget yardımıyla PPLO Agar yüzeyine silme ekimi yapıldı. Besiyeri nemli ve mikroaerofilik ortamda 37 °C'de 5 gün süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda diskler etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek değerlendirildi.

Diğer bakterilerin identifikasyonu: Patolojik materyallerden mikoplazmalar dışında izole edilen diğer bakterilerin identifikasyonları, makroskopik ve mikroskopik görünüm, karbonhidrat fermentasyon testleri, hareket, hemoliz, oksidaz, katalaz, H₂S testi gibi rutin yöntemlerle yapıldı.

BULGULAR

Mikoplazmaların izolasyon ve identifikasyonu

Bu çalışmada Kars Belediye Mezbahası'nda Ocak - Aralık 1995 tarihleri arasında kesilen, 1-3 yaşlı 896 sığıra ait akciğerlerin makroskopik incelenmesi yapılarak, pnömonik bulunan (paraziter pnömoniler hariç) 76 (%)

8.48) akciğer örneği ile Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına teşhis amacıyla getirilen 33 pnömonili sığır akciğeri olmak üzere toplam 109 pnömonili sığır akciğerinin 12'sinden (%11.00) mikoplazma izole edildi. Kalan 97 örnekten mikoplazma izolasyonu yapılamadı. Pnömonili akciğerlerden izole edilen mikoplazma suşları glikoz fermentasyonu, arginin hidrolizi, fosfataz testi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu gibi biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon (Growth Inhibisyon GI) testi yardımıyla 6'sı (% 50) *M. bovis*, 4'ü (% 33.33) *M. bovirhinitis* ve 2'si (% 16.66) *M. arginini* olarak tanımlandı. İzole edilen 12 mikoplazma suşunun 5'i (% 41.66) tek başına, 7'si (%58.34) diğer bakterilerle birlikte izole edildi. (Tablo-1).

Tablo-1. Araştırmaya tabi tutulan pnömonik akciğer örneklerinin kaynaklarına göre dağılımı ve etken izolasyonu

Örneklerin alındığı yer	Kontrol edilen akciğer sayısı	Pnömonik akciğer sayısı %	Mikoplazma izole edilen örnek sayısı %	Bakteri izole edilen örnek sayısı %	Toplam izolasyon %
Kars Belediye Mezbahası	896	76 (8.48)	7 (%9.21)	28 (%36.84)	35 (%46.05)
KAÜ. Veteriner Fakültesi	33	33	5 (%15.15)	15 (%45.45)	20 (%60.60)
TOPLAM	929	109 (%)	12 (%11.00)	43 (%39.44)	55 (%50.45)

Kars Belediye Mezbahasından sağlanan 76 pnömonik sığır akciğerinin 7'sinden (%9.21) mikoplazma suşu izole edildi. İzole edilen bu suşların yukarıda bildirilen temel biyokimyasal testlerle yapılan identifikasyonlarında 4'ünün (%57.14) *M. bovis*, 2'sinin (%28.57) *M. bovirhinitis* ve 1'inin (14.28) *M. arginini* olduğu belirlendi. Laboratuvara teşhis amacıyla getirilen 33 pnömonik akciğerin ise, 5'inden (%15.15) mikoplazma suşu izole edildi. İzole edilen suşların, 2'si (%40) *M. bovis*, 2'si (%40) *M. bovirhinitis* ve 1'i (%20)de *M. arginini* olarak identifiye edildi.

Kars Belediye Mezbahası'ndan alınan 76 pnömonik sığır akciğerinden izole edilen 7 mikoplazma suşunun 3'ü (%42.85) tek başına, 4'ü (%57.15) diğer bakterilerle birlikte, laboratuvara teşhis amacıyla getirilen 33 pnömonik akciğerden izole edilen 5 mikoplazma suşunun 2'si (%40) tek başına, 3'ü de (%60) diğer bakterilerle birlikte izole edildi.

Koloni Morfolojileri: Pnömonik akciğerlerden izole edilen *M.bovis*, *M. bovirhinis*, *M. arginini* suşlarının PPLO agarda, nemli ve mikroaerofilik ortamda 5 gün inkübe edildikten sonra steromikroskopla yapılan incelemelerinde (X40) “fried egg” diye tanımlanan tipik sahanda yumurta görünümünde, ortası düğmeli, kenarları yuvarlak 1 mm’den küçük koloniler meydana getirdikleri gözlemlendi. *M.bovis* suşlarının kolonileri nispeten küçük ortası düğmeli ve kenarları düzgün, *M. bovirhinis* suşlarının kolonileri biraz daha geniş merkezleri küçük, *M.arginini* suşlarının kolonileri ise orta büyüklükte ve merkezlerinin belirgin olduğu görüldü. İzole edilen tüm suşların PPLO buyyonda 37 °C’de nemli ve mikroaerofilik ortamda 5 günlük inkübasyon sonucunda çok hafif bir bulanıklık oluşturarak ürediği, inkübasyon süresi uzadıkça çalkalandığında helezon şeklinde dipten yukarı yükselen az bir tortu oluştuğu görüldü. İzole edilen mikoplazma suşlarının, katı ortamda oluşturdukları koloni morfolojileri ve sıvı ortamdaki üreme özelliklerinin birbirinden çok farklı olmadığı gözlemlendi.

Biyokimyasal test sonuçları

Digitonin duyarlılık testi: PPLO agarda yapılan digitonin duyarlılık testinde, izole edilen tüm suşların, digitonin emdirilmiş disk etrafında 3-5 mm arasında duyarlılık zonu oluşturduğundan dolayı digitonine duyarlı olarak belirlendi.

Glikoz fermantasyonu: Glikozlu PPLO buyyonda yapılan glikoz fermentasyon testinde *M.bovirhinis* suşlarının buyyonun rengini kırmızıdan sarıya dönüştürüldüğü halde, *M.bovis* ve *M. arginini* suşlarında ve kontrol tüplerinde renk değişimi gözlenmedi.

Arginin hidrolizi: İzole edilen suşlarla PPLO buyyonda yapılan arginin hidrolizi testinde *M.argininini* suşları inkübasyondan 2gün sonra buyyonun rengini koyu pembe renge dönüştürdüğüden pozitif olarak değerlendirildi. *M. bovis* ve *M. bovirhinis* suşları ile yapılan testte ise bu süre sonunda renk değişikliği olmadığından dolayı bu suşların arginin hidrolizi negatif olarak belirlendi.

Fosfataz testi: Fenolfitalein difosfat ilave edilmiş selektif katı besiyerine, suşların ekimi yapıp 37 °C’de 5 gün inkübe edildikten, sonra üreyen kolonilerin üzerini kaplayacak kadar 5N NaOH döküldü. *M.bovis* suşları birkaç dakikada kırmızı renk meydana getirdiğinden fosfataz pozitif, *M. bovirhinis* ve *M. arginini* suşları ise renk değişimi oluşturmadığından, fosfataz negatif olarak değerlendirildi.

Tetrazolium redüksiyonu: İzole edilen mikoplazma suşları ile yapılan tetrazolium redüksiyonu testinde, *M.bovis* ve *M. bovirhinis* suşlarının üreme hattında kırmızı renk oluşumu ile tetrazoliumu redükte ettiği, *M. arginini* suşlarının ise selektif besiyerinde tetrazoliumu redükte etmediği belirlendi.

Film ve spot oluşumu: İzole edilen suşlar PPLO agar ve buyyona ekilip bir hafta 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda *M. bovis* suşlarının sıvı ortamda film katı ortamda spot oluşturduğu *M. arginini* ve *M. bovis* suşlarının ise film ve spot oluşturmadığı gözlemlendi.

Tablo-3 İzole edilen mikoplazma suşlarının biyokimyasal özellikleri.

İzole edilen suşlar	Digitonin duyarlılığı	Glikoz femantasyonu	Arginin hidrolizi	Fosfataz testi	Tetrazolium redüksiyonu	Film ve spot oluşumu
<i>M. bovis</i> (6)*	D	-	+	+	+	+
<i>M.bovirhinis</i> (4) *	D	+	-	-	+	-
<i>M.arginini</i> (2) *	D	-	+	-	-	-

*: Test edilen suş sayısı D : duyarlı + : Pozitif - : Neatif

Üreme inhibisyon testi: İzole edilen *M.bovis*, *M. bovirhinis* ve *M. arginini* suşlarının PPLO agar da yapılan üreme inhibisyon testinde, standart antijenlere karşı tavşanlardan elde edilen hiperimmün serumlarla inhibe oldukları saptandı. Disk etrafında meydana gelen üreme inhibisyon zonunun 4-6 mm arasında olduğu belirlendi.

Antibiyotik duyarlılık testi: İzole edilen suşlar Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile yapılan antibiyotik duyarlılık testinde *M.bovis* ve *M.arginini* suşlarının tamamının enrofloksasin (% 100), danofloksasin (%100), tilmikosin (% 100), oksitetrasiklin (%100) ve tetrasikline (100), 4 *M.bovis* (%66.66), 3 *M.bovirhinis* (%75), *M. arginini* (%50) suşunun gentamisine duyarlı olduğu saptandı. *M. bovirhinis* suşlarının 1'i tetrasikline (%25), 3'üde eritromisine (%75) dirençli iken, *M. bovis*, *M. bovirhinis* ve *M. arginini* suşlarının tamamının streptomisine (%100) dirençli olduğu belirlendi. (Tablo-4).

Tablo-4. İzole edilen mikoplazma suşlarının antibiyotiklere olan duyarlılıkları
STANDART ANTİBİYOTİK DİSKLERİ

SUŞLAR	En		Dn		T		O		Tc		E		G		S						
	D	R (%D)	D	R (%D)	D	R (%D)	D	R (%D)	D	R (%D)	D	R (%D)	D	R (%D)	D	R (%D)					
M. bovis (6)*	6	0	100	6	0	100	6	0	100	6	0	100	3	3	50	4	2	66.6	0	6	0
M.bovirhinitis (4) *	4	0	100	4	0	100	4	0	100	3	1	100	1	3	25	3	1	75	0	4	0
M.arginini (2) *	2	0	100	2	0	100	2	0	100	2	0	100	1	1	50	0	2	0	0	2	0

*: Suş sayısı **D**: Duyarlı suş sayısı **R**: Rezistans suş sayısı **%D**: Duyarlılık oranı **En**: Enrofloksasin **Te**: Tetrasiklin **Dn**: Danofloksasin **E**: Eritromisin **T**: Tilmikosin **G**: Gentamisin **O**: Oksitetrasiklin **S**: Streptomisin

Diğer Bakteriyel Etkenlerin İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

Bu araştırmada kullanılan 109 pnömonili sığır akciğerinin 43'ünden (%39.44) rutin yöntemler kullanılarak 15 (%28.30) *E.coli*, 11 (%20.75) *P. haemolytica*, 8 (%15.09) *Staphylococcus sp.* 8 (%15.09) *P.asteurella multocida*, 7 (%13.20) *Streptococcus spp.*, 3(%5.66) *Bacillus sp.*, 1 (%1.88) *Antinomyces sp.* olmak üzere toplam 53 bakteri izole ve identifiye edildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığır yetiştiriciliğinin önemli problemlerinden biri olan pnömoniler; mikoplazmal, bakteriyel ve viral etkenler tarafından oluşturulan polifaktöriyel etiyojolojiye sahip mikoplazmal enfeksiyonlardır (2, 6, 10, 19). Sığır pnömonilerinin önemli etiyojolojik etkenlerinden olan mikoplazmalardan ileri gelen pnömoniler genellikle sığır ve buzağılarda solunum sayısında artış, iştahsızlık, sık olmayan öksürük, vücut ısısında artış, durgunluk gibi genelde hafif klinik belirtilerle kronik olarak seyretmektedir (12, 20). Sığırlarda mikoplazmalardan ileri gelen enfeksiyonlar üzerine yapılan araştırmalar daha çok 1960'lı yıllarda yoğunluk kazanmış ve günümüze kadar artarak süregelmiştir (15, 17, 21). Yapılan araştırmalar sığırlarda mikoplazmal enfeksiyonların bütün dünyada yaygın olduğunu göstermektedir (2, 4, 20). Sığır yetiştiriciliğinde ciddi sorunlar yaratan ve önemli verim kayıplarına neden olan pnömonilerle müca-

dele etmek amacıyla araştırmaların bu yöne de kaydırılması ve pnömoni etkenleri aranırken mikoplazmaların da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Mikoplazmalardan ileri gelen infeksiyonlar sığırlarda sadece pnömoni ile sınırlı olmayıp, mastitis, artrit ve diğer sistemik infeksiyonları da kapsamakta (24) süt ve besi sığırcılığını olumsuz yönde etkilemektedir (2,23,24).

Sığır yetiştiriciliğinin yoğun olduğu İskoçya, Almanya, İrlanda, İngiltere gibi ülkelerde (2,6,8,22), sık rastlanan mikoplazmal pnömoniler, İç Anadolu (12), Trakya ve Marmara Bölgesinde (10), buzağı ve danalar üzerinde yapılan araştırmalar ile ülkemizde de bildirilmiştir. Bu çalışmada Kars yöresinde oldukça yoğun olarak yapılan sığır yetiştiriciliğinin önemli problemlerinden olan pnömonilerde, mikoplazmaların ve diğer bakteriyel etkenlerin önemi araştırılmıştır.

Mikoplazmaların izolasyonu diğer bakterilerden farklı ve güç olup. bu etkenler üretilmeleri için kompleks ve zenginleştirilmiş besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Mikoplazma türlerini diğer bakteri türlerinden ayırt eden en önemli üreme gereksinimi kolesteroldür (8, 27, 33).

Mikoplazmaların katı besiyerlerinde üreyerek meydana getirdiği koloniler, L formuyla karışabilmektedir (17, 19, 26, 34). Fakat L formları, daha büyük ve kenarları düzgün olmayan koloniler oluşturmaktadır. Sık olarak ürediklerinde mikoplazmalarla kolayca karışabilmektedir (10, 30, 34). Sıvı besiyerlerinde ise mikoplazmalar hafif bir bulanıklık oluşturmalarına rağmen, L formları daha fazla bulanıklık ve tortu oluşturduğu bilinmektedir (16, 18). Bu nedenle çalışmada, şüpheli kültürlerin antibiyotik ve talyum asetat katılmayan katı besiyerlerine 3 kez pasajı yapıldıktan sonra, koloni formu değişmeyenler mikoplazma olarak kabul edildi.

Bu araştırmada pnömonik sığır akciğerlerinden izole edilen mikoplazmaların identifikasyonunda yaygın olarak kullanılan biyokimyasal testlerden; digitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu, arginin hidrolizi, fosfataz testi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu testleri uygulanmış ve suşlar identifiye edilmiştir. İzole edilen tüm mikoplazma suşlarının standart suşlarla karışılaştırılmal olarak yapılan biyokimyasal özellikleri yönünden homojen oldukları gözlemlendi. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların (1, 10, 12, 15) sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, izole edilen suşların identifikasyonunda, duyarlı ve uygulama kolaylığı olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan Üreme İnhibisyon Testi de kullanıldı. İdentifiye edilen suşların üreme inhibisyon testinde pozitif serumlarla kontrolünde diğer mikoplazma türleriyle kros reaksiyon vermediği ve mikoplazma türlerinin identifikasyonunda, biyokimyasal testleri doğrulayıcı nitelikte olduğu kanısına varıldı.

Sığır pnömonilerinin etiyojilerine yönelik olarak yurdumuzda (10,12) ve diğer ülkelerde (2,5, 13, 15) yapılan araştırmalarda pnömonili sığır akciğerlerinden mikoplazmaların tek başına (12, 19, 34) veya diğer bakteriyel etkenlerle (2, 5, 14) birlikte izole edildikleri bildirilmiştir. Gourlay ve ark. (13), İngiltere’de 1981-1985 yılları arasında sığırların pnömoni olgularında yıllara göre ortalama % 9.7-%36.5 oranında *M.bovis* ayırmışlardır. Araştırmacılar toplam 102 pnömonik akciğerden 37 (%36) *M.bovis*, 31 (%30) *M.bovirhinis*, 14 (%14) *M. dispar* ve 1 (%1) *M. arginini*, %27 *P. multocida*, %12 *P. haemolytica*, %5 *Corynebacterium pyogenes* ve % 5 *Streptobacillus actinoides* izole ettiklerini, özellikle akut ve kronik solunum sistemi hastalıklarında *M.bovis*’le *P.haemolytica*’nın birlikte izole edildiğini bildirmişlerdir. Sığırlarda *M.bovis*’den ileri gelen pnömonilerde bu etkenin patojen olduğu ve diğer bakteriyel ve viral etkenlerin de olaya karışmasıyla hastalığın şiddetinin arttığı ve önemli kayıplara neden olduğu belirtilmiştir (5, 18, 23).

Bu çalışmada Kars Belediye Mezbahası’nda Ocak-Aralık 1995 tarihleri arasında kesilen, 1-3 yaşları arasında 896 sığıra ait akciğerin makroskopik incelenmesi sonucu pnömonili olduğu saptanan 76 (%8.48) akciğer örneği ile, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında teşhis amacıyla getirilen 33 pnömonili sığır akciğeri olmak üzere toplam 109 pnömonik sığır akciğerinden 12 (%11.00) mikoplazma suşu izole edildi. İzole edilen suşların digitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu, arginin hidrolizi, fosfataz testi ve tetrazolium redüksiyonu gibi biyokimyasal testlerle ve üreme inhibisyon testi ile yapılan identifikasyonlarında, 6’sı (%50) *M.bovis*, 4’ü (%33.33) *M. bovirhinis*, 2’si (%16.66) *M. arginini* olarak tanımlandı. Bu araştırmada infeksiyonun başlangıcı, sahada meydana gelişi, hasta hayvanlara yapılan klinik uygulamalar hakkında fazla bilgiye sahip olunamaması, özellikle yetiştiriciler tarafından antibiyotiklerin bilinçsizce kullanılması, izolasyon oranlarını etkileyen faktörler olarak düşünülmektedir. Pnömonik akciğerlerden izole edilen mikoplazmaların yüzde olarak dağılımı,

yurdumuzda (10, 12) ve diğer ülkelerde (2, 5, 23, 26, 34) yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ancak Almanya, İngiltere, Kuzey İrlanda, ABD gibi bazı ülkelerde (5, 20, 22, 23) sığır pnömonilerinden daha yüksek oranda mikoplazma izole edilmiştir. Mikoplazmal pnömonilerin yayılışının genel olarak ülkeler veya bölgeler bazında farklılıklar gösterebileceği bildirilmiştir (2, 23). Bu farklılıklar coğrafi şartlara, hayvanların yaşına, cinsiyetine, ırklarına, bireysel dirençlerine, besleme durumlarına, buldukları yerin hijyenik şartlarının farklılığına bağlıdır. Bu çalışmada pnömonik akciğerlerden izole edilen 12 mikoplazma suşunun 7'si (%58.33) diğer bakteriyel (4'ü *P. haemolytica*, 2'si *P. multocida*, 1'i *Staphylococcus sp.*) etkenlerle, 5'i de (%41.67) tek başına izole edilmiştir. Mikoplazmaların dışında diğer bakteriyel etkenlerin izolasyonu için yapılan çalışmada 109 pnömonik akciğerin 43'ünden (%39.44) rutin yöntemlerle 15 (%28.30) *E.coli*, 11 (%20.75) *P. haemolytica*, 8 (%15.09) *P. multocida*, 8 (%15.09) *Staph. sp.*, 7 (%13.20) *Strep.sp.*, 3 (%5.66) *Bacillus sp.* ve 1 (%1.88) *Actinomyces sp.* olmak üzere toplam 53 bakteri izole ve identifiye edildi.

Sığır pnömonilerine sığır yitiştiriciliğinin yapıldığı bir çok ülkede yaygın olarak raslanmaktadır. Yapılan deneysel (13,14) çalışmalarla sığır pnömonilerinin oluşumunda mikoplazmalar içinde önemli türler olarak *M. bovis*, *M. dispar* ve *Ureaplasma diversum* bildirilmiş ve bu türlerin en patojeni olarak da *M. bovis* tanımlanmıştır. Değişik araştırmacılar (2, 17, 19, 21), bronkopnömonili ve pnömonili sığır ve buzağuların akciğerlerinden sıklıkla *M. bovis* ve *P. haemolytica*'yı birlikte izole ettiklerini ve bu iki mikroorganizma arasında bir sinerjizm olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada 12 mikoplazma suşunun 7'si (% 58.33) *Pasteurella sp.* ile birlikte izole edildi. Bu sonuç diğer araştırmacıların (17, 19, 22) yaptıkları çalışmalarla paralellik göstermektedir ve *M.bovis*'le *P. haemolytica* arasında sinerjizm oluşunu doğrular niteliktedir.

Sığırlarda değişik sistemik infeksiyon olgularından izole edilen mikoplazma suşlarının in vitro olarak antibiyotiklere olan duyarlılıkları ile ilgili olarak çeşitli araştırmalar yapılmıştır (8, 10, 14, 20). Devrise ve ark. (8), 16 *M.bovis* suşuyla yaptıkları antibiyotik duyarlılık testinde, test edilen suşların tylosin, linkomisin, enrofloksasin ve oksitetrasikline duyarlı, eritromisin ve gentamisine dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Erdağ ve ark. (10), buzağı ve

danalardan izole ettikleri 6 *M.bovis* suşunun, enrofloksasin, gentamisin, eritromisin ve danofloksasine % 95 oranında duyarlı, linkospektin, ampisilin ve oksitetraksikline ise daha az oranda duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada pnömonik sığır akciğerlerinden izole edilen 12 mikoplazma suşunun değişik antibiyotiklere karşı olan duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapıldı. Antibiyogram testinde kullanılan diskler dikkate alındığında sonuçların, Kudu ve ark. (20), ve Devrise ve ark. (8) bildirdikleri sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada sığır pnömonilerinden mikoplazmalar % 11,00 oranında tek başına veya diğer bakteriyel etkenlerle birlikte izole ve tanımlanmıştır. İleride yapılacak çalışmalarda pnömoni olguları görülen odaklarda etiyolojik etkenler aranırken mikoplazmalarında primer etken olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. AK, S., AK, K., BEŞE, M., İLERİ, K.K., HASÖKSÜZ, M. (1992): Marmara Bölgesinde Kesime Gönderilen Boğaların Genital Sistemlerinde Mycoplasmosis. Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg. 23(2): 155-163.
2. ALLEN, J.W., VIEL, L., BATEMAN, K.G., ROSENDAL, S., SHEWEN, P.E., PHYSICK-SHEARD, P. (1991): The Microbial Flora of the Respiratory Tract in Fedlot Calves Associations Between Nasopharyngeal and Bronchoalveolar Lavage Cultures. Can. J. Vet. Res., 55(4): 341-346.
3. ARDA, M., MİNBAŞ, A., LELOĞLU, N., AYDIN, N., AKAY, Ö. (1992): Özel Mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Basımevi, no: 742, Erzurum.
4. BEŞE, M. (1989): Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri. Kardeşler Basımevi, İstanbul.
5. BOIS, J.M., ROY, R.S., ELHAZARY, Y. (1993): Importance of Mycoplasmas in Calves with Respiratory Problems in Quebec. Med. Vet. Quebec., 23(2): 60 - 63.
6. BRYE, A., PFUNTZER, H., BOCKLICH, H. (1992): Mycoplasma bovis free Breeding of Cattle. Berl. Münch. Tierarztl. Wochenshr., 105 (7): 230-231.
7. CYLDE, W.A. (1983): Growth Inhibition Tests. In:Ed. RAZIN, S., TULLY, J.G.: Methods in Mycoplasmaology. Vol 1, Academic Press. pp. 405-410.
8. DEVRİE, L.A. and HAESEBROUCK, F. (1991): Antibiotic Susceptibility Testing of Mycoplasma bovis Using Twen 80 Hydrolysis as An Indicator of Growth. J. Vet. Med., B.38: 781-783.
9. DOHERTY, M.L. ETROY, M.C., MARKEY, B.K. CARTER, M.E., BALL, H.J. (1994): Isolation of Mycoplasma bovis from A calf Imported into the Republic Ireland. Vet. Rec., 135 (11): 259-260.
10. ERDAĞ, O., ERDOĞAN, İ., TÜRKASLAN, J. ve GÜREL, A. (1995): Buzağı ve Dana Pnevmonilerinde Mikoplasma ve Bakteriyel Etkenlerin İzolasyon, İdentifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılıkları. Animal İnfomasyon, 112:115-119.

11. ESENDAL, Ö. (1991): Tavuklarda Mycoplasma Gallisepticum'a Karşı Oluşan Antikorların Çeşitli Serolojik Yöntemlerle (Lam Aglutinasyon, Hemaglutinasyon İnhibisyon, Agar Jel Presipitasyon, ELISA) Saptanması ve Sonuçların Karşılaştırılması. A.Ü.Sağlık. Bil. Enst. Doktora Tezi, Ankara.

12. GİRGİN, H., AYDIN, N., CANBAZOĞLU, M., AKSOY, E. (1992): İçanadolu Bölgesinde Buzağı Pnömonisinde Rol Oynayan Bakteriler ile Bunların Meydana Getirdiği Lezyonların Patolojik Özellikleri. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg., s.51-71.

13. GOURLAY, R.N., HOWARD, C.J., THOMAS, L. H. (1979): Pathogenicity of Same Mycoplasma and Acholeplasma species in the Lung of Gnotobiotic Calves. Res. Vet. Sci., 21: 233-237.

14. GOURLAY, R.N., THOMAS, L.H., WYLD, S.G., SMITH, C.J. (1989): Effect of A New Macrolide Antibiotic (tilmicosin) on Pneumonia Experimentally Induced in Calves by Mycoplasma bovis and Pasteurella haemolytica. J.Vet. Res., B.56 (5): 457-464.

15. GRUNAERT, E. BOLTING, D., STACKHOFE, N. und PICKER, M. (1992): Zur Symptomatik der Mycoplasma bovis Infektion bei Neugeborenen Kalbern. Tierarzt. Umschau., 47 (2): 99-104.

16. GÜLER, L. (1994): Pnömonili Koyun ve Keçilerden Mikoplazmaların İzolasyonu ve Antibiyotiklere olan Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Selçuk Üniv. Sağ. Bil. Est., Doktora Tezi, Konya.

17. 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., Baltimore, pp. 705-717.

18. JASPER, D.E. (1982): Identification of Mycoplasmas Isolated from Cattle. Rev. Sci. Tech. Epiz., 68 (3): 801-807.

19. KIM, SY., CHO, S.M., PARK, S.M. (1989): Studies on Mycoplasma pneumoniae of Cattle. Research Report of to Develop. Administ. Vet. 31 (1): 30-35.

20. KUDUO, R., HIROSHIMA, S., TUKAHARA, K., SAKAMATO, T., HIRANO, T., NAKATA, Y. (1994): Isolation of Mycoplasma alkalascens and Mycoplasma bovis from the Nasal Swabs of Calves with Pneumonia. J.Vet. Med. Assoc. 47 (5): 311-314.

21. LAAK, E.A. AND RUHUNKE, H. L. (1995): Mycoplasma Infections of Cattle. In: *Molecular and Procedures in Mycoplasmaology*. Vol 2., Academic press. New York. 255-264.

22. LAAK, E.A., WENTINK, G., ZIMMER, G.M. (1992): Increased Prevalence of Mycoplasma bovis in the Netherlands *Vet. Q.*, 14 (3): 100-104.

23. LIBERAL, M.H.T., HALFEN, T., LIBERAL, M. (1989): Detection of Cattle Herds Harboring Mycoplasmas by Isolation Mycoplasma bovis from Nasal Exudate of Calves. *Rev. Microbiol.*, 20 (3): 296-302.

24. PFUNTZER, H. (1984): Die Mycoplasma bovis Infektion des Rindes. *Mh. Vet.Med.*, 39:217-220.

25. PIRIE, H.M., ALLAN, E.M. (1975): Mycoplasmas and Cuffing Pneumonia in A Group of Calves. *Vet. Rec.*, 97 (18): 34-39.

26. POUMARAT, F., PERRIN, M., MARTEL, J.L. (1986): Epidemiologie De L'Infectiona Mycoplasma bovis in France. *Rec. Med. Vet.*, 162(11): 1181-1187.

27. RAZIN, S. (1983): Identification of Mycoplasma Colonies. In: RAZIN, S. and TULLY, J.G.: *Methods in Mycoplasmaology* Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 337-343.

28. RAZIN S., CIRILLO, V.P. (1983): Sugar Fermentation. In: RAZIN, S. and TULLY, J.G.: *Methods in Mycoplasmaology* Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 337-343.

29. RAZIN, S., FREUNDT, E.A. (1983): The Mycoplasmas. In: KREIG, N.R., HOLT, J.G. (1983): *Bergey's Manual of Systematik Bacteriology*. Baltimore Tindall, pp. 740-780.

30. SACHSE, K., PFUNTZER, H., HOTZEL, H., DEMUTH, B., HELLS, M., BERTHOLD, E. (1993): Corporation of Various Diagnostic Methods for the Detection of Mycoplasma bovis. *Rev. Sci. Tec.* 12 (2): 571-580.

31. SETERFIT, L.B. (1983): Preparation of Antigen and Antisera. In: Ed. RAZIN, S. and TULLY, J.G.: *Methods in Mycoplasmaology* Vol. 1., Academic Press. New York pp. 401.

32. TULLY, J.G. (1983): Tests for Digitonin Sensivity and Sterol Requirement. In: Ed. RAZIN, S. and TULLY, J.G.: Methods in Mycoplasmaology Vol. 1, Academic Press. New York, pp 355.

33. TÜRKAŞLAN, J. (1989): Mikoplasma Kùltürlerinin Üreme İnhibisyon Testi İle İdentifikasyonu. Pendik Hayv. Hast. Merk. Arařt. Enst. Derg. 20 (2): 60-64.

34. UMLAUFT, K.D., SCHULZ, G., FRANZE, F., UTE, S.S., PANNWITZ, S., BLOHM, H., CLAUS, D. und LIEBEG, F. (1987): Infektions Diagnostik bei Kalbern Pnömonien. Mh. Vet. Med., 42: 583-588.

TEŞEKKÜR

Bu doktora tez çalışmasının yürütülmesinde yardım ve ilgilerini gördüğüm doktora yöneticim ve KAÜ Veteriner Fakùltesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Fuat AYDIN'a çalışmalarım esnasında ilgi ve desteğini gördüğüm, Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Mikoplazma Ünitesi'nden Uz. Vet. Hekim Jale TÜRKAŞLAN'a, Konya Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nden Dr. Leyla GÜLER'e teşekkür ederim.