

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ATLARDA *Rhodococcus equi*'nin TESPİTİ
ve GENOTİPLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

ZEYNEP YERLİKAYA

2019

ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adile MUZ



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adile MUZ

Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA

Prof. Dr. Banur BOYNUKARA

Prof. Dr. Barış OTLU

Prof. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Zeynep YERLİKAYA

Tarih

03.12.2019

İmza

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Zeynep Yerlikaya".

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimin başından beri beni destekleyen ve yüreklendiren danışman hocam Prof. Dr. Adile MUZ ve eski danışmanım Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ'a, değerli fikirleri ve önerileriyle bana yol gösteren anabilim dalımız öğretim üyelerinden Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA ve Prof. Dr. Hasan ÖNGÖR'e, yakın desteğini gördüğüm çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Burcu KARAGÜLLE'ye en derin teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın yürütülme sürecinde akademik ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan hocalarım Prof. Dr. Barış OTLU ve merhume Öğr. Gör. Dr. Nafia Canan GÜRSOY'a, laboratuvar çalışmalarında büyük oranda katkılarını gördüğüm Özkan YENER'e, çalışmanın istatistiksel değerlendirmesinde büyük katkıları olan Doç. Dr. Cemal ORHAN'a teşekkür ederim.

Saha çalışmalarının yürütülmesinde büyük desteklerini gördüğüm özel ve devlet haralarında çalışan meslektaşlarıma ve yardımcı personele, maddi ve manevi her zaman desteklerini gördüğüm aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. <i>Rhodococcus equi</i> 'nin Genel Özellikleri	7
3.2. <i>R. equi</i> 'nin Tarihçesi ve Filogenetik Sınıflandırılması	9
3.3. <i>R. equi</i> 'nin Virülens Özellikleri	13
3.3.1. Virülensle İlişkili Protein Ailesi (Vaps)	14
3.3.2. Virülensle İlişkili Protein A (VapA)	15
3.4. Patogenez	17
3.5. Klinik Semptomlar	20
3.6. Teşhis	22
3.6.1. Ultrasonografi	22
3.6.2. Serolojik Teşhis	23
3.6.3. Konvensiyonel Yöntemlerle İzolasyon ve İdentifikasyon	24
3.6.4. Bakteriyoskopi ve Biyokimyasal İdentifikasyon	27
3.6.5. Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyon	28
3.7. Tiplendirme Yöntemleri	31
3.8. Tedavi	34

3.9. Korunma ve Kontrol	37
3.9.1. Antimikrobiyal Profilaksi	37
3.9.2. İmmunoprofilaksi	39
3.9.3. Çevresel Faktörlerin Kontrolü	41
3.9.4. Sürü Yönetimi	43
3.10. Hastalığın Türkiye’de ve Dünyadaki Durumu	44
3.11. Amaç	50
4. GEREÇ VE YÖNTEM	51
4.1. Gereç	51
4.1.1. Örneklerin Toplanmasında Kullanılan Malzemeler	51
4.1.2. Kültür Aşamasında Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar	51
4.1.3. DNA İzolasyonu ve PCR Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar	53
4.1.4. Elektroforez İçin Kullanılan Malzemeler	55
4.1.5. PFGE Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar	56
4.1.6. Antibiyogram Aşamasında Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Besiyerleri	58
4.2. Yöntem	59
4.2.1. Çalışma Alanları ve Örneklem	59
4.2.2. Örneklerin Toplanması	61
4.2.3. <i>Rhodococcus equi</i> ’nin Kültür Yöntemiyle İzolasyon ve İdentifikasyonu	65
4.2.4. Kültür Yöntemiyle Elde Edilen <i>Rhodococcus equi</i> İzolatlarının PCR ile Doğrulanması ve <i>vapA</i> geninin Tespiti	67
4.2.5. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Profilleri	71
4.2.6. <i>Rhodococcus equi</i> İzolatlarının Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemiyle Genotiplendirilmesi	71
4.2.7. İstatistiksel Analizler	78

5.BULGULAR	80
5.1. <i>Rhodococcus equi</i> 'nin İzolasyon Bulguları	80
5.2. <i>16S rRNA</i> Geni PCR Amplifikasyon Bulguları	82
5.3. <i>vapA</i> Geni PCR Amplifikasyon Bulguları	89
5.4. Antibiyotik Duyarlılık Bulguları	95
5.5 <i>Rhodococcus equi</i> İzolatlarının PFGE Yöntemi ile Genotiplendirilmesi	97
5.5.1 Kümeler İçinde Yer Alan Suşların Epidemiyolojik İlişkileri	97
5.6. Çiftlik Koşulları ile İlgili Toplanan Bilgilerin Değerlendirmesi	102
6. TARTIŞMA	106
7. SONUÇ ve ÖNERİLER	121
8. KAYNAKLAR	123
9. ÖZGEÇMİŞ	136

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: <i>R.equi</i> elektron mikroskop görüntüsü	8
Şekil 2: <i>R.equi</i> 'nin filogenetik kümesi	12
Şekil 3: Örneklerin toplandığı çalışma alanları ve haraların konumları	60
Şekil 4: Ziyaret edilen haralardaki, taylı kısrakların bulunduğu ahırlardan bir görüntü	63
Şekil 5: Tayların nazal boşluğundan örnek alınırken çekilmiş bir görüntü	63
Şekil 6: Toprak örneklerinin alındığı padokların görüntüsü	63
Şekil 7: (A) NANAT besiyerinde nazal svaptan üreyen saf <i>R.equi</i> kolonileri, (B-C) Toprak örneğinden izole edilmiş kontaminant bakteriler ve <i>R.equi</i> kolonileri	80
Şekil 8: <i>R. equi</i> 'nin kanlı agardaki koloni görüntüsü	81
Şekil 9: <i>R.equi</i> 'nin 24 saatlik kültüründen Gram boyama sonucu görülen kokobasil görüntüsü	81
Şekil 10: <i>R.equi</i> 'nin 48 saatlik kültüründen Gram boyama sonucu görülen kok görüntüsü	82
Şekil 11: Kültürlerden ekstrakte edilen DNA'ların <i>R. equi</i> 16S rRNA genine spesifik primerlerin kullanıldığı yapılan PCR ile analizi sonucunda oluşan 450 bp büyüklüğündeki ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü	83
Şekil 12: Atlardan alınan nazal ve fekal örneklerde <i>R. equi</i> pozitiflik durumunun incelenmesi	84
Şekil 13: Farklı illerde yetiştirilen atlardan alınan toplam numunelerin <i>R. equi</i> yönünden pozitiflik durumu	85
Şekil 14: Farklı illerde yetiştirilen atlardan alınan fekal numunelerin <i>R. equi</i> yönünden pozitiflik durumu	86

Şekil 15: Farklı illerde yetiştirilen atlardan alınan nazal numunelerin <i>R. equi</i> yönünden pozitiflik durumu	87
Şekil 16: Farklı illerde yetiştirilen atların <i>R. equi</i> yönünden pozitiflik durumu	88
Şekil 17: PCR ile <i>R. equi</i> olduğu doğrulanan kültürlerden elde edilen DNA'ların <i>vapA</i> genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunda oluşan 563 bp büyüklüğündeki ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü	90
Şekil 18: Atlardan alınan nazal ve fekal örneklerde <i>R. equi</i> yönünden pozitiflik bulunan örneklerin <i>vapA</i> geni yönünden incelenmesi	91
Şekil 19: <i>R. equi</i> izolatlarında <i>vapA</i> geni pozitiflik durumunun illere göre dağılımı	92
Şekil 20: Farklı illerde yetiştirilen atlarda <i>R. equi</i> yönünden pozitiflik bulunan fekal örneklerin <i>vapA</i> geni yönünden incelenmesi	93
Şekil 21: Farklı illerde yetiştirilen <i>R. equi</i> yönünden pozitif bulunan hayvanların <i>vapA</i> geni yönünden incelenmesi	94
Şekil 22: Rifampisin dirençli bir <i>R. equi</i> izolatına uygulanan antibiyotik duyarlılık test sonucu	96
Şekil 23: <i>AseI(VspI)</i> enzimi ile kesilen <i>R. equi</i> saf izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü	100
Şekil 24: PFGE yöntemi sonucu <i>R. equi</i> izolatlarına uygulanan dendogram grafiği	101

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: <i>R. equi</i> 'nin biyokimyasal özellikleri	28
Tablo 2: Dünyada bildirilen <i>R. equi</i> plazmid tipleri ve restriksiyon endonükleaz kalıpları	32
Tablo 3: Örnek alınan haraların illere göre dağılımı	61
Tablo 4: Alınan örneklerin ve hayvan sayılarının illere göre dağılımı	62
Tablo 5: Örnek alınan hayvan sayılarının illere ve çiftliklere göre dağılımı.	64
Tablo 6: Çiftlik koşulları ile ilgili bilgi formu	65
Tablo 7: PCR analizlerinde kullanılan primer çiftleri	70
Tablo 8: <i>R. equi</i> için CHEF DR II sistemi ile uygulanan elektroforez koşulları	77
Tablo 9: Nazal ve fekal örneklerin <i>R. equi</i> yönünden pozitiflik durumları.	84
Tablo 10: Farklı illerde yetiştirilen atlardan ve haralardan alınan numunelerin <i>R. equi</i> yönünden pozitiflik durumu	85
Tablo 11: <i>R. equi</i> pozitif bulunan hayvanların illere göre dağılımı	88
Tablo 12: Şüpheli taylardan ve annelerinden alınan nazal ve fekal numunelerin <i>R. equi</i> yönünden incelenmesi	89
Tablo 13: <i>R. equi</i> izole edilen nazal ve fekal örneklerde <i>vapA</i> geni yönünden pozitiflik durumu	91
Tablo 14: <i>R. equi</i> izolatlarında <i>vapA</i> geni pozitiflik durumunun illere göre dağılımı	92
Tablo 15: <i>R. equi</i> izolatlarının test edilen antibiyotiklere karşı direnç profilleri.	96
Tablo 16: <i>R. equi</i> izolatlarının test edilen antibiyotiklere duyarlılıkları	96
Tablo 17: <i>R. equi</i> suşlarının izole edildiği haralardan alınan bilgilerin çiftliklere göre yüzdeleri	102
Tablo 18: Örnek alınan haralardaki pozitif hayvanların oranları ve sorulan sorulara verilen cevaplar	104
Tablo 19: Verilen cevapların istatistiksel olarak birbirleri ile ilişkileri	105

KISALTMALAR LİSTESİ

AGID	: Agar Gel Immunodiffusion
AMP	: Ampisilin
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
BHIB	: Brain Heart Infusion Broth
bp	: Baz çifti
CLSI	: Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü
CLR	: Klaritromisin
CN	: Gentamisin
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
E	: Eritromisin
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünosorban Test
HIP	: Hiperimmün Plazma
HST	: Hücre Süspansiyon Tamponu
HPT	: Hücre Parçalama Tamponu
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
Mb	: Megabaz
NANAT	: Nalidiksik asit-novabiosin-sikloheksimid-potasyum tellürit Besiyeri
NRAMP1	: Doğal Direnç İlişkili Makrofaj Protein 1
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	: Pulse Field Gel Electrophoresis
RE	: Restriksiyon Endonükleaz Enzimi

ReqLAM	: <i>R. equi</i> Lipoarabinomannan
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribo Nükleik Asit
<i>R. equi</i>	: <i>Rhodococcus equi</i>
RD	: Rifampisin
S	: Streptomisin
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SHI	: Sinerjistik Hemoliz İnhibisyon
SUSS	: Steril ultra saf su
TBA	: Trakeobronşial Aspirasyon
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA Tampon Solüsyonu
TE	: Tetrasiklin
VA	: Vankomisin
VapA	: Virulence Associated Protein A

1. ÖZET

Bir toprak saprofiti olan *Rhodococcus equi*'den kaynaklanan pnömoniler; dünya genelinde özellikle tayar için mortalite oranının yüksek olması, tedavi, korunma ve kontrol metotlarının yetersizliği ve buna bağlı olarak ekonomik düzeyde ciddi kayıplara yol açması sebebi ile baş edilmesi gereken önemli enfeksiyonlar arasındadır.

Çalışmamızda yarış atı yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Malatya, Şanlıurfa, Bursa, Eskişehir ve İzmit şehirlerinde bulunan kurumsal işletmelere bağlı haralarda ve özel çiftliklerdeki taylorndan alınan nazal ve fekal svaplar ile bu çiftliklerden toplanan toprak ve su örnekleri kullanıldı. Örneklerde *R.equi*'nin varlığının bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve hastalığın muhtemel risk faktörlerinin belirlenmesinin yanı sıra, elde edilen izolatlar arasındaki genetik ilişkinin Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemiyle ortaya konması ve izolatların çeşitli antibiyotiklere (ampisilin, vankomisin, eritromisin, rifampisin, klaritromisin, tetrasiklin, streptomisin ve gentamisin) duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

Yapılan bakteriyolojik ve moleküler analizler neticesinde nazal svap örneklerinde %10,04 (43/428), fekal svap örneklerinde %22,9 (98/428), toprak örneklerinde %29,4 (5/17), su örneklerinde %5,8 (1/17) oranlarında *R.equi* izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi. *R.equi* olarak doğrulanan toplam 147 izolatın *vapA* genine spesifik primerlerin kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile incelenmesi sonucunda %46,2'si (68/147) virulent olarak tanımlandı. Saha izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri incelendiğinde ise

izolatların %43,5 (64/147)'inin test edilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu, buna karşılık %2,72 (4/147) 'sinin üç veya daha fazla antibiyotiğe karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edildi. PFGE uygulanan toplam 65 adet virulent *R.equi* izolatında 29 farklı genotip belirlendi ve bu genotipleri içinde bulunduran 12 küme saptandı. Çalışmamızda çiftlik bilgileri ile ilgili yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda padokların mekanik temizliğinin yapılma sıklığı ile *R.equi* enfeksiyonlarından kaynaklı ölümlerin görülmemesi arasında pozitif korelasyon bulundu. Önceki yıllarda enfeksiyonun bildirildiği çiftliklerde virulent *R.equi* tespit edilirken, enfeksiyon bildirilmeyen çiftliklerden elde edilen izolatların avirulent olduğu saptandı.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *R.equi* izolatlarının PFGE profilleri ortaya konuldu. Özellikle virulent *R.equi* suşlarının izole edildiği çiftliklerde farklı genotiplerin saptanması nedeniyle bulaş kaynakları ve risk faktörlerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılmasına, dirençli suşların genotipik karakterlerinin ayrıntılı olarak ortaya konmasına ve taylarda bağışıklık sisteminin yetişkin atlara göre daha az gelişmiş olması nedeniyle immunizasyon tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu minvalde elde edilecek verilerin *R. equi* enfeksiyonlarına karşı daha etkin kontrol ve korunma stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Pnömoni, *Rhodococcus equi*, *vapA*, PFGE, PCR, antimikrobiyal duyarlılık.

2. ABSTRACT

DETECTION AND GENOTYPING OF *RHODOCOCCLUS EQUI* IN HORSES

Pneumonia caused by a soil saprophyte *Rhodococcus equi* is considered as one of the most important infections with high mortality rate in foals worldwide. The lack of effective treatment, control and prevention measures results in significant economical losses, and therefore urgent action is needed to overcome this infection.

In this study, nasal and fecal swab samples were collected from foals reared at the state and private horse farms located in Malatya, Şanlıurfa, Bursa, Eskişehir and İzmit provinces where racehorse breeding is common. In addition, soil and water samples were taken from these enterprises. This study was carried out to investigate the presence and frequency of *R. equi* by bacteriological and molecular methods, and to determine genetical relationship between the field isolates by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Also, possible risk factors of the infection and *in vitro* sensitivity of the isolates to various antibiotics including ampicillin, vancomycin, erythromycin, rifampicin, clarithromycin, tetracycline, streptomycin, gentamicin were determined.

Following bacteriological and molecular analyses, 10.04% (43/428) of nasal swab samples, 22.9% (98/428) of fecal swab samples, 29.4% (6/17) of soil samples and 5.8% (1/17) of water samples were confirmed as *R.equi*. Of the total 147 isolates confirmed *R.equi*, 46.2% (68/147) were identified as virulent by the

PCR using *vapA* gene specific primers. When the antibiotic susceptibility profiles of the isolates were examined, it was found that 43.5% (64/147) of the strains were sensitive to all tested antibiotics while 2.72% (4/147) showed multiple resistance to three or more antibiotics. PFGE analyses of 65 virulent *R. equi* isolates produced 29 different genotype patterns within 12 clusters. In the statistical analyses of farm parameters, a positive correlation was found between the frequency of mechanical cleansing of paddocks and the absence of deaths due to *R. equi* infection. While virulent *R. equi* isolates were detected in farms with previous history of infection, the isolates obtained from farms without previous infection history were determined to be avirulent.

In conclusion, the present study revealed PFGE profiles of *R. equi* field isolates for the first time in Turkey. As a remarkable finding, the detection of different genotypes in farms where virulent *R. equi* isolates were obtained necessitates comprehensive investigation of transmission sources and risk factors of the infection in addition to elucidation of genotypic features of resistant strains. It is also required to develop immunization techniques due to the fact that immune systems of foals are less improved when compared to horses. It is suggested that such data will enable the development of more effective control and prevention strategies against *R. equi* infections.

Key words: Pneumonia, *Rhodococcus equi*, *vapA*, PFGE, PCR, antimicrobial susceptibility.

3. GİRİŞ

Atlar, tarih boyunca evcilleştirildikleri ilk andan itibaren çeşitli amaçlarla yetiştirilmişlerdir. Günümüzde en çok yarış sektöründe kullanılmakta olup, milyar dolarlık bütçeye sahiptirler. At yetiştiriciliğinde, bakım besleme ve hastalıklarla mücadele önemli yer tutar. Hastalıklar arasında pnömoniler, tayların performansını en çok etkileyen faktörlerdendir. Önemli bir pnömoni etkeni olarak bilinen bakteriyel bir patojen olan *Rhodococcus equi*'den kaynaklanan enfeksiyonlar; ölümlere yol açmasının yanı sıra, uzun süreli masraflı tedavi gerektirmesi ve tedavi edilse bile tayların geri kalan hayatında performansını olumsuz etkileyeceğinden büyük maddi kayıplara yol açmaktadır.

İlk kez 1923 yılında Magnusson tarafından tayların suppuratif bronkopnömoni vakalarından izole edilen *Rhodococcus equi* (*R.equi*); Gram pozitif, fakültatif ve hücre içi üreme özelliği gösteren bir toprak saprofitidir. 1960'larda özellikle immun sistemi baskılanmış insanlarda rapor edilmiştir. Daha sonra domuz, sığır koyun keçi bufalo ve diğer hayvanlarda da bildirilmiştir. Etken, taksonomideki yeni adıyla *Rhodococcus hoagii* olarak isimlendirilmiştir (1, 2).

R. equi toprakta ve gübrede fazlaca bulunmaktadır. Etkenin konantrasyonu padokların atlar tarafından kullanımına bağlı olarak değişiklik gösterir. *R. equi*'den kaynaklanan enfeksiyonların daha önce çıktığı haralar ve tayların üretim bölgelerinde fazlaca bulunur. Özellikle sıcak iklimlerin de etkisiyle gübre ile kolaylıkla yayılır ve toprakta uzun zaman kalabilir. Patogeneizde çevresel faktörler, konakçı ve konakçının diğer faktörlerle olan

ilişkileri önemli rol oynar. Bulaşma; enfekte hayvanların burun ve nazal akıntıları ile direkt temas, inhalasyon ve sindirim yolu ile şekillenir. Hastalığın en çok görüldüğü zamanlar ilkbahar ve yaz aylarıdır (3, 4).

R. equi'nin hastalık oluşturma mekanizmasında çeşitli faktörlerin rolü olup bunların arasında en önemlisi 85-90 kilobazlık (kb) plazmidinde bulunan *vapA* geninin kodladığı yüzey proteinidir. 15-17 kilodalton (kDA) ağırlığında olan bu protein, virülensle ilişkili protein (VapA) olarak adlandırılır ve etkenin fagositik hücreler içerisinde sindirilmesine mani olur (5).

Etken özellikle 2-6 aylık taylarda, şiddetli bronkopnömonilere ve suppuratif lenfadenitislere sebep olabilen bakteriyel bir patojendir. Klinik belirtiler; enfekte taylarda en çok pyogranulamatöz pnömoni ile ilişkili olmakla birlikte, intestinal enfeksiyonlar, non septik polisiynovitis, septik artrit ve osteomyelit şeklinde de gelişebilmektedir. Etkilenen primer organlar akciğerler olmasına rağmen, bu bakteri böbrek, dalak ve testis dokularında da bulunabilmektedir (6, 7).

Çoğunlukla yaşamlarının ilk haftalarında olan genç taylar, immun sistemlerinin yetersizliklerinden dolayı *R. equi* pnömonilerine karşı oldukça savunmasız olmaktadır. Etkene karşı oluşan bağışıklık mekanizmasında doğal ve kazanılmış immun cevabın rolü olduğu düşünülmektedir. Etken; hem hücresel hem de humoral bağışıklığı uyarmaktadır. 3 aylıktan büyük taylar genelde enfeksiyona daha dirençlidir ve yetişkin atlar çok nadir enfekte olmaktadır (8).

Tipik olarak *R. equi* pnömonilerinin klinik belirtileri tayların 4-12 haftalık yaşlarında iken ortaya çıkmaktadır ve teşhis genelde bu zamanlarda yapılmaktadır. Fakat enfeksiyonun aslında daha erken dönemlerde oluştuğu

düşünülmektedir. Enfeksiyonu takiben lezyonlar genellikle birkaç hafta veya birkaç ay boyunca gizli seyretmekte ve bunun sonucunda taylor klinik belirtiyi göstermektedir. Erken dönemlerde oldukça zor fark edilmesinden dolayı hastalık yüksek mortalite oranları ile seyretmektedir.

Antibiyotik tedavisi bilinçli bir şekilde yapılırsa başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Özellikle lipofilik makrolidlere yapılan tedaviler olumlu sonuçlar verebilmektedir. Yapılan çalışmalarda etkenin eritromisin ve rifampine oldukça duyarlı olduğu görülmüştür. Yaklaşık 20 yıldır lipofilik antibiyotiklerin kombinasyonu uygulanmaktadır. Yeni makrolidlerin (azitromisin, klaritromisin, tulatromisin) eritromisin ile kombinasyonları pratikte oldukça başarılı sonuçlar vermiştir (9, 10).

3.1. *Rhodococcus equi*'nin Genel Özellikleri

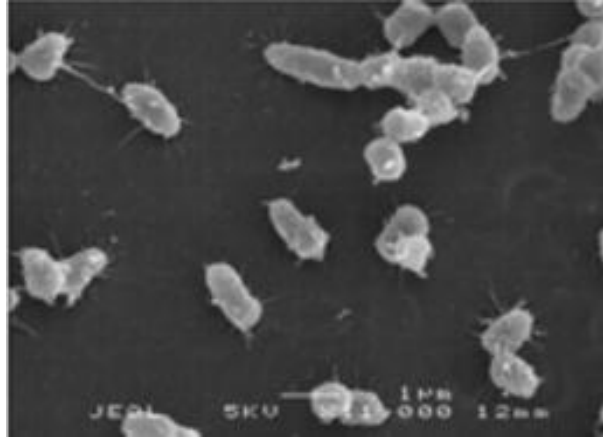
R. equi, Actinomycetales takımında yer alan gram pozitif fakültatif, hücre içi üreme özelliği gösteren hareketsiz sporsuz, polisakkarit yapıda kapsüllü ve pleomorfik bir toprak saprofitidir. Çoğunlukla taylorların en önemli pnömoni etkeni olarak bilinirken domuz sığır koyun keçi bufalolarda ve immun sistemi baskılanmış insanlarda da hastalık yaptığı bildirilmiştir. Doğada toprakta, tatlı ve tuzlu sularda ve yaygın olarak at yetiştiriciliği yapılan bölgelerde özellikle otçul hayvanların dışkılarında fazlaca bulunur (3, 4).

R. equi'ler kanlı agar, Luria-Bertani (LB) broth veya agar, triptik soy broth ve agar, ve brain-heart infusion broth (BHIB) gibi standart temel besiyerlerinde ve aerobik ortamda kolayca ürerler. Selektif olmayan besiyerlerinde ve özellikle

kanlı agarda 37°C’de 48 saatlik inkübasyondan sonra düzensiz şekilli, çapları 3 ve 5 µm arasında, somon rengi mukoid koloniler oluştururlar (11).

Hareketsiz, flagellasız, karbonu kullanabilme özelliği olan ve zorunlu aerob bir bakteri olan *R.equi*’nin optimum üreme sıcaklığı 30 °C’dir. 10 ila 40 °C arasında üreme özelliği gösterir. 37 °C’de üreme hızı, 30 °C’de üremesi ile karşılaştırıldığında daha yavaştır (12).

Pleomorfik kokobasil bir bakteri olan *R.equi*’nin taze kültürlerinde ve sıvı besiyerinde üretildiklerinde mikroskop sahasında çomak formları daha baskındır. Kültürler eskidikçe bakteri mikroskop sahasında kok formu ile daha baskın bir görünüm verir.



Şekil 1: *R.equi* elektron mikroskop görüntüsü (13).

Karbon kaynağı olarak organik asitler ve lipidleri kullanırlar (1, 14). Aside dirençli olarak tanımlanmalarından dolayı pH'nın düşük olduğu ortamlarda canlılıklarını sürdürebilirler (15). Hücre duvarları lipidden zengin, kalın bir polisakkarid kapsüle sahip olmakla birlikte mikolik asit içermektedir (16).

3.2. *R. equi*'nin Tarihçesi ve Filogenetik Sınıflandırılması

R. equi ilk olarak 1923 yılında İsveçli bilim adamı Magnusson tarafından tayların purulent bronkopnömoni vakalarından primer hastalık etkeni olarak izole edilmiş olup *Corynebacterium equi* olarak isimlendirilmiştir (17). Daha sonra 1924 yılında Avusturalya'da, 1932 yılında Amerika'da ve 1937 yılında Hindistan'da taylarda pnömoni vakalarından bildirilmiştir. 1940 yılında hem domuzların lenf nodüllerinden hem de piyometralı iki inekten izole edilmiştir (18).

R. equi'nin taksonomisi tarihsel olarak biraz karışık durumdadır. Fenotipik ve genotipik olarak bazı *Corynebacterium*, *Nocardia* ve *Mycobacterium* türleri ile kendi bulunduğu cinsten daha yakın ilişki içerisinde olmasından dolayı keşfedildiğinden beri bakterinin taksonomisi terminolojide sık sık değişiklikler ile gündeme gelmiştir ve gelmeye devam etmektedir (19, 20).

Rhodococcus cinsi bakteriler ilk olarak Wilhelm Friedrich Zopf tarafından 1891 yılında gram pozitif, hareketsiz ve sporsuz bakteriler olarak tanımlanmıştır (21) Aslında ilk olarak 1912 yılında Morse; yaptığı taksonomik çalışma ile bakteriyi *Corynebacterium hoagii* olarak isimlendirmiştir (22). Magnusson; 1923 yılında tayların pnömoni vakalarından izole ettiği hastalık etkeninin *Corynebacterium equi* olarak isimlendirilmesi gerektiğini önermiştir (23). Bu tarihten sonra yapılan çalışmalarda bazı araştırmacılar bakterinin asit-fast bir mikroorganizma olduğunu bildirmişlerdir. Mikolik asit içeren ve lipidden zengin hücre duvarı yapısı, ve karakteristik olarak yüksek moleküler ağırlıkları nedeni ile *Nocardialar* ve *Mycobacteriler*'e çok benzeyen bu bakterinin 1930 ve 1940'lı

yıllar arasında *Mycobacterium equi* olarak tekrar isimlendirilmesi gerektiği gündeme gelmiştir (24). 1944 yılında Turfitt; bakterinin *Nocardia restricta* olarak isimlendirilmesi gerektiğini öne sürmüştür (25). Bu adlandırmalar taksonomide kabul görmemiş ve bakteri uzun yıllar *Corynebacterium equi* olarak isimlendirilmeye devam etmiştir. 1977’de Goodfellow ve Alderson; bakterinin *Corynebacterium equi* olarak isimlendirilmesinin doğruluğundan şüphe etmişler ve *Rhodococcus* genusu içerisinde bakterinin *R. equi* olarak adlandırılması gerektiğini öne sürmüşlerdir (19).

Son yıllarda bakterinin *Prescotella equi* olarak yeni bir genus içerisinde adlandırılması önerilmiştir (26). Fakat önerilen bu çalışma; diğer türlerin; *Rhodococcus* genusundan ayrımını destekleyici nitelikte bulunmamıştır (22).

2014 yılında yapılan bir çalışmada; Morse tarafından bildirilen *Corynebacterium hoagii* ile *R. equi* arasındaki suş tiplerinin 16S rRNA sekansları ile özdeş oldukları görülmüş ve DNA-DNA hibridizasyon değerleri %70’in üzerinde bulunmuştur. Bundan dolayı literatürde bu her iki bakterinin de yeni bir tür adı olan *Rhodococcus hoagii* olarak isimlendirilmesi gerektiği gündeme gelmiş ve kabul edilmiştir (2, 27).

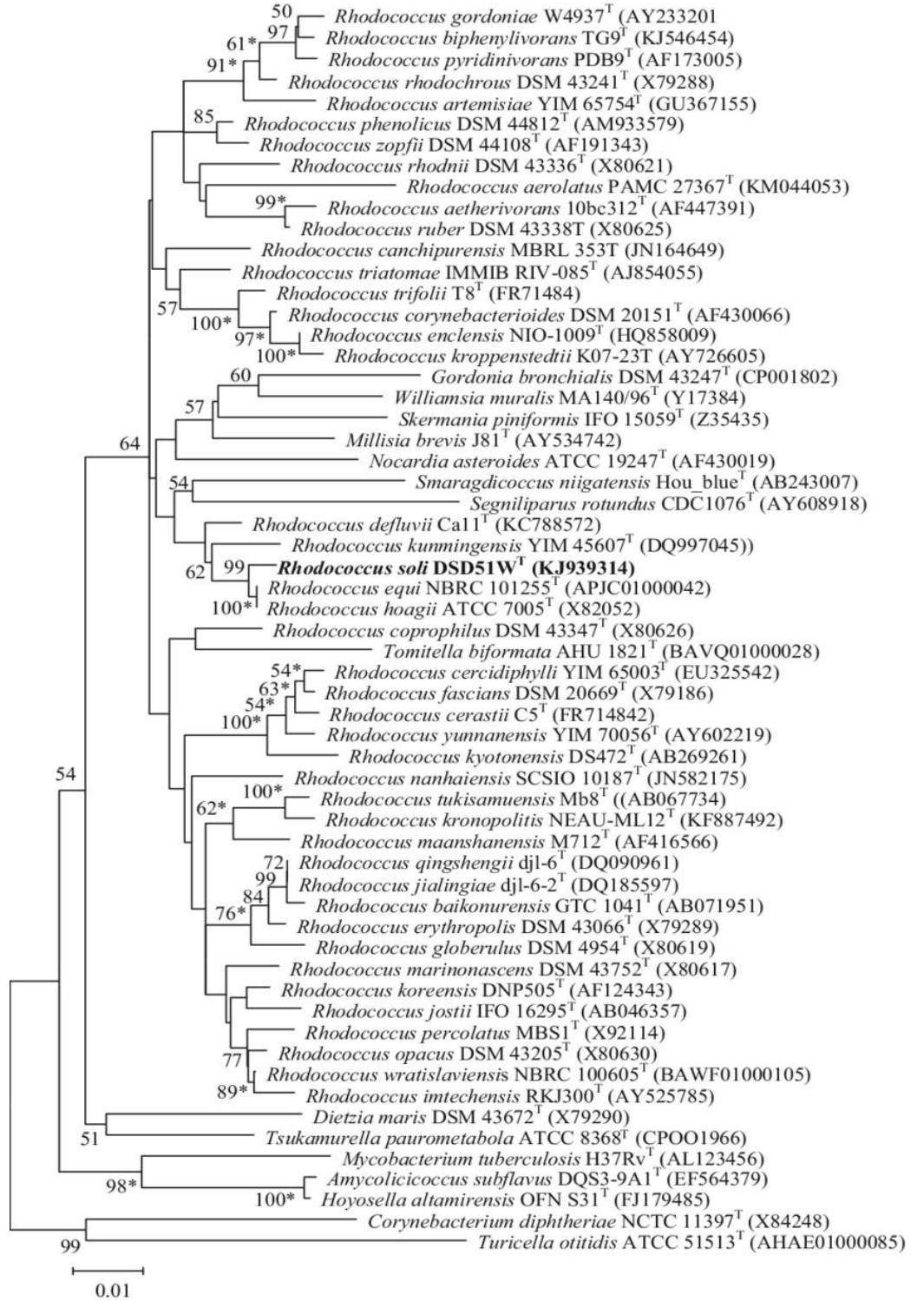
Günümüzde bu bakteri hala Actinomycetales takımında, Corynebacterineae familyasında, Nocardiaceae ailesine mensup ve *Rhodococcus* cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır (28).

R.equi’nin genom büyüklüğü yaklaşık 4.4 megabase (Mb) olarak tahmin edilmektedir. DNA’sı yaklaşık %67-73 oranında ve yüksek oranda G+C içermektedir (29, 30). *R.equi* suşlarının Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

yöntemiyle kapsamlı tiplendirilmesi sonucu umulmadık şekilde taksonomide genomik olarak yüksek oranda heterojenite görülmüştür. Kromozomal varyasyonların bu kapsamlı kanıtlarına rağmen hiçbirisi direkt olarak virülensle ilişkili bulunmamıştır (31, 32).

R.equi'nin virülensi ile ilişkili Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemi ile tanımlanmış farklı plazmidleri mevcuttur. Şu ana kadar 85 kilobaz (kb) Tip I-IV, 87 kb Tip I-III, ve 90 kb Tip I-V plazmidleri tanımlanmıştır ve özellikle virulent ATCC 33701 suşunda 85kb Tip I plazmidin olduğu bildirilmiştir (33-38).

85 kb Tip I plazmidin sekans çalışmaları sonucunda 80610 bp uzunluğunda olduğu ve tahmini olarak 64 adet açık okuma çerçevesi (ORF) kodladığı görülmüştür. Bunların 22'si diğer bakteri türlerinde de tanımlanan fonksiyonu bilinen genlere benzerken, 7 tanesinin yine benzer olarak bilinmeyen fonksiyonları mevcuttur. 33 adet ORF'nin diğer diğer bakteri türlerinde bulunan genlere benzerlik göstermeyen ve bilinmeyen fonksiyonları mevcutken bir tanesi diğer bakteri türlerinde de tanımlanan RP4 plazmidinde bulunan gen transferi kompleksine benzerlik göstermektedir. Bir tanesi ise replikasyon proteini olarak bilinmektedir. Nükleotid sekansı yapılmış olan virülens plazmidin bilinen en önemli özelliği 7 adet *vap* geni içeren ve patojenite adası olarak bilinen 27.5 kb'lık bölgesidir. Bu bölgede *vapA*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapG* ve *vapH* genleri bulunmaktadır. Tekrarlayan bölgelerin termoregülatif fonksiyonda olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu plazmidin konjugasyon, replikasyon ve bölünmeden sorumlu bölgeleri bulunmaktadır (39).



Şekil 2: *R. equi*'nin filogenetik kümesi (40).

3.3. *R. equi*'nin Virölens Özellikleri

Gram pozitif bakterilerin birçoğunda hücre duvarı proteinleri virölens ve patojenite üzerinde belirleyici özelliklere sahiptirler. Prescott tarafından yedi, Nakazawa tarafından yirmi yedi kapsüler serotip belirlenmiştir fakat bunun virölensle bir ilişkisinin olmadığı görülmüştür (1). Bu tarihlerden sonra *R. equi*'nin virölensi ile alakalı ilk çalışma hücre duvarı yapısına odaklanarak yapılmıştır (41). Bunun yanında bakterinin virülensten sorumlu kolesterol oksidaz enzimi, hücre duvarındaki mikolik asitleri, lipoarabinomannan (ReqLAM), fosfolipaz C bölgesi ve virölens plazmidleri bulunmaktadır (8, 42).

R. equi'nin lipidden zengin hücre duvarında bulunan uzun karbon zincirli mikolik asitlerin konakçıdaki granülamatöz cevabın başlatılmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir (43). Hücre duvarından elde edilen glikolipidlerin farelere verilmesi ile gerçekleşen granülamatöz cevabın, hastalıklı lenf nodülünden elde edilen *R. equi*'lerin farelere verilmesi ile görülen granülamatöz cevapla benzer olduğu görülmüştür. Sağlıklı görünen bir domuzun tonsilinden elde edilen *R. equi*'ler deney hayvanlarına verildiğinde lezyonlar daha geç oluşmuştur ve mikolik asitte bulunan karbon zincirleri diğer gruba nazaran daha kısa bulunmuştur (44, 45). Bu durumda virü lent suşlardaki mikolik asite ait karbon zincirlerinin avirü lent suşlara nazaran daha uzun zincirli olduğu söylenebilmektedir.

Hücre duvarında bulunan lipoglikan ve lipoarabinomannan, makrofaj reseptörlerine bağlanarak makrofaj içine alınmadan önce IL-10 ve IL-1'i

aktifleştirerek Th2 cevabının oluşmasına sebep olmaktadır ve hastalığın patogenezi üzerinde önemli rol oynamaktadır (46, 47).

Virülens üzerinde rol oynayan bazı gen bölgeleri bildirilmiştir. Bunlar izositrat liyaz geni (*aceA*), nitrat redüktaz geni (*narG*), *HtrA* geni ve *phoPR* operonudur. Bu genlerdeki mutasyonlar ya tamamen virülensin kaybolmasına ya da *phoPR* operonunun bulunması durumunda virülensin artmasına sebep olmaktadır (48).

R.equi'ye belki de virulent olma özelliğini en çok kazandıran 80-90 kilobazlık virülens plazmidleri bulunmaktadır. İşlevsel olarak üç bölgesi bulunan bu plazmidin ikisi konjugasyon, plazmidin replikasyonu, segregasyon ve stabiliteden sorumluyken, üçüncü bölgesi virülensten sorumlu proteinleri (Vap) kodlayan genleri bulundurmaktadır. 27.5 kb'lık uzunluktaki bu bölge; patojenite adası olarak adlandırılmaktadır (1, 7).

3.3.1. Virülensle İlişkili Protein Ailesi (Vaps)

Sadece belirli *R.equi* türleri hastalık yapma yeteneğine sahiptirler. Bu türler virulent *R.equi* olarak bilinir ve yaklaşık 80-90 kb olmak üzere bir veya daha fazla plazmid bulundururlar. Bu plazmidler genelde intraselüler replikasyon ve virülens için gerekli genleri bulunduran 27.5 kb uzunluğunda bir patojenite adasına sahiptir. Bu ada tarafından kodlanan en önemli virülens protein ailesi virülensle ilişkili proteinler (Vaps) olarak adlandırılır (7, 39, 49).

Geniş aminoasit dizilimine sahip olan virülensle ilişkili bu proteinler VapA, VapB, VapC, VapD, VapE, VapF, VapG VapH olarak adlandırılmaktadır. Bu fonksiyonel proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonu, etkenin makrofajlar

içerisine girmesi ile oluşmaktadır. VapF fonksiyonel değildir. VapC, VapD ve VapE'nin aminoasit sekansları %40 oranında VapA ile benzerlik göstermektedir, salgılanabilen proteinlerdir ve VapA gibi hücre yüzey antijeni özelliği göstermezler. Bu proteinleri kodlayan genlerin minimum 30 °C'de ekspresyonları gerçekleşir ve ekspresyon için optimum sıcaklık 37 °C 'dir (50-53).

Ren ve Prescott, at makrofajlarında etkenin canlı kalabilmesinin çevresel şartlarla (30 °C pH:7) kıyaslandığı zaman *vap* genlerindeki ekspresyonunun daha belirgin düzeyde başlatıldığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışma aynı zamanda virülens plazmid gen ekspresyonu üzerinde çevresel faktörlerin etkinliğini araştırmıştır (51). Bunun dışında iki çalışmada bütün *vap* genlerinin 37 °C'de düşük demir, kalsiyum ve yüksek magnezyum düzeylerinde ve pH:5 olduğu zaman indüklenme özelliği gösterdiği, asidik ortamda ve H₂O₂ varlığında aktif oldukları bildirilmiştir (54).

Orta derecede virulent olarak adlandırılan 79-100 kb uzunluğundaki plazmid tarafından 20 kilodalton (kDa) ağırlığındaki VapB proteininin, enfekte domuzların ve kaviter pnömonili insanların sevikal lenfatik dokularından elde edilen suşlarda bulunduğu görülmüştür. *R. equi*'nin VapB bulunduran orta dereceli virulent suşları, taylarda ve at yetiştiriciliği yapılan yerlerde bulunmamaktadır (8, 55).

3.3.2. Virülensle İlişkili Protein A (VapA)

Klinik olarak hasta taylardan elde edilen izolatların 15-17 kDa ağırlığında bir lipoprotein bulundurduğu görülmüştür (56). Bu protein avirulent özellikte olan ATCC 6939 suşunda bulunmamaktadır. Deneysel enfeksiyon oluşturulan bir

Çalışmadan elde edilen verilere göre ATCC 6939 suşunun fareleri öldürmediği, fakat 15-17 kDa' luk lipoproteini bulunduran *R.equi* suşunun ATCC 6939 suşuna nazaran daha düşük dozda kullanılması durumunda bile fareleri ldrdği görülmüştür. Yine aynı çalışmada hastalıklı taylardan elde edilen antikorların güçlü antijenik özellikteki bu proteinle reaksiyona girdiği görülürken; sağlıklı tayların antikorlarının bu antijenle reaksiyon oluşturmadığı görülmüştür. Bu lipoprotein; virlensle ilişkili protein A (VapA) olarak isimlendirilmektedir ve bu proteini kodlayan gen ise *vapA* olarak adlandırılmaktadır (57).

Pnömonili tayların trakeal aspiratlardan elde edilen *R.equi* izolatlarında PCR ile *vapA* geninin varlığını tespit etme ve immunblotlama üzerine yapılan çalışmalarda bu izolatların çoğunun *vapA* genini bulundurduğu veya VapA proteinini eksprese ettiği görülmüştür (58, 59). Bu genin yüksek oranda ekspresyonu 34-41 C 'leri arasındadır. Ekspresyon optimal 38 C'de ve pH: 6,5 olduğu zaman gerçekleşmektedir. Aynı koşullar konakçıda olduğu zaman da geçerlidir. (60, 61).

Virlent *R.equi* suşunun bütün hücre proteinlerinin purifikasyonu yapılarak ve Triton X-114 kullanarak ve ³H palmitik asit ile radyoaktif işaretleme sonucunda VapA'nın bir lipoprotein olduğu görülmüştür (62).

VapA bulunduran *R. equi*'nin izolatları; enfekte tayların akciğerlerindeki alveolar makrofajlarda çoğalabilme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle VapA bulunduran suşlar taylar için virlent suş kategorisine girmektedir (7).

3.4. Patogenez

R.equi pnömonileri genelde on iki haftalıktan küçük taylarda görülmektedir. Özellikle kuru havalarda ve ilkbahar sonu, yaz başlangıçlarında hastalık daha sık görülür. Çevresel faktörler, pH, çiftlik koşulları ve hayvan sayılarının yoğunluğu patogenezi etkileyen predispoze faktörlerdendir (8, 63).

Bir toprak saprofiti olan *R.equi*, otçul hayvanların dışkılarında yüksek oranda bulunmaktadır. Bu hayvanlar tarafından ağız yoluyla alınarak sindirim sisteminde canlılığını sürdürür ve dışkıyla saçılması sürekli devam eder. Ağız yolu ile alınan virulent form, kan yolu ile pnömoninin oluşum sürecini başlatabilir. Topraktaki konsantrasyon arttıkça etkene maruz kalma süresi de doğru orantılı olarak uzamaktadır (52, 64).

Deneysel enfeksiyon oluşturularak yapılan çalışmalar, klinik hastalıkla ilgili ilerleyici pulmoner lezyonların büyük olasılıkla solunum yolu ile olduğunu göstermiştir (65). Taylardaki *R.equi* pnömonileri, virulent *R.equi*'nin inhalasyon yoluyla alınarak akciğer alveollerine girmesi ve burdaki makrofajlarda canlı kalması ile ilişkilendirilmektedir. Fakültatif intraselüler bir patojen olan *R.equi*; fagolizozom formasyonunun oluşmasına engel olarak ve pyogranülatöz yanıt oluşturarak makrofajlar içerisinde canlı kalmakta ve akabinde makrofajların ölümüne sebep olmaktadır (66, 67).

Dört aylıktan küçük taylar, akciğerlerdeki düşük hücresel bağışıklıktan dolayı bu patojenin sebep olduğu bronkopnömonilere karşı daha duyarlıdırlar. Hastalığın özellikle dört ile on iki haftalık taylarda daha çok görülmesinin sebeplerinden biri de bu dönemlerde maternal antikorların düşüş halinde olması

ile ilgilidir. Bu durumda bağışıklık, hastalığın patogenezi üzerinde en önemli etkenlerden biridir (8).

Etkenin makrofajlar içerisine alınmasında hücre duvarındaki özellikleri büyük rol oynamaktadır. Hücre duvarındaki lipoarabinomannan (ReqLAM), sitokinler tarafından uyarılan ve hepatositler tarafından salınan mannoz bağlayıcı proteine bağlanarak bakteri üzerinde bir komplement komponenti olan C_{3b} ile opsonizasyon sağlar. Direkt olarak makrofajlarda bulunan mannoz reseptörü ile de bağlanabilir. Aynı zamanda IL-10 ve IL-1'in aktivasyonunu sağlayarak Th2 hücrelerini uyarmaktadır. IL-10'lar makrofajların fonksiyonlarını düşürücü özellikteki sitokinlerdir (46, 68).

Dört haftalığa kadar olan taylarda maternal antikorların sayısında azalmalar meydana gelmektedir. Bu antikorlar azaldığı için Fc dışındaki reseptörler ile makrofajlara giriş olayı gerçekleşmektedir (45). Eğer etken Fc reseptörleri aracılığıyla makrofajlara alınacak olsaydı, IFN- γ ve TNF- α , makrofajların aktivasyonunu sağlayarak INOS transkripsiyonu ile makrofajlarda nitrik asit üretimi gerçekleşecekti ve akabinde Fc reseptörleri ile alındığında oksidatif stres olarak adlandırılan, toksik reaktif oksijen ve nitrojen ara maddelerinin üretilmesi sağlanacaktı. Bu durumda da bakterinin makrofajlar içerisinde bu ara maddelerin bir tepkimesi sonucu oluşan peroksinitrit sayesinde ölümü gerçekleşecekti. Ancak etkenin Fc reseptörleri ile makrofajlar içerisine alınmasının hiçbir önemi yoktur. Çünkü taylar için virulent özellik gösteren ve VapA bulunduran suşlar, hidrojen peroksite ve dolaylı olarak oksidatif strese dirençlidirler (8).

Bu mekanizmalar şu şekilde açıklanabilir. Komplement komponentleri ile etken makrofajlar içerisine alındıktan sonra ortamda nitrik asit etimi gerçekleşir ve vakuoller içerisinde hapsedilir. Bu aşamadan sonra makrofaj içerisindeki bir dizi bölünme olaylarından sonra fagozom formasyonu oluşur. Buna bağlı olarak NRAMP1 adı verilen bir makrofaj proteini, bu formasyonun içerisine demir pompalamasını gerçekleştirir. Ortamda nitrik asit bulunmasından dolayı demir uzaklaşır ve NRAMP1 ortamın pH'sını düşürmüş olur (69). Isı, pH, oksidatif stres, magnezyum ve demirin patojenite adasındaki genlerin ekspresyonunda etkili olduğu bildirilmiştir (70). *R.equi*'de bulunan Fur ve IdeR olmak üzere iki reseptör, demire bağımlı gen ekspresyonunu yöneten reseptörlerdir. Bunlar ortamda demir varken kendilerinin homolog bağlanma bölgelerine bağlanıp transkripsiyonu baskırlar. Ortamdan demirin uzaklaşması ile bu baskılamanın şiddeti azalır. Sonuç olarak VapA transkripsiyona uğramış olur ve virlens faktörleri daha da tetiklenir (5, 8). Buna ek olarak da hücre duvarındaki mikolik asit varlığı lizozomun fagozomla birleşmesine engel olur ve etken, makrofajlar içerisinde canlılığını sürdürür (71).

Yeni doğan tayların immun sistemleri; makrofaj, nötrofil ve dendritik hücre sayılarının az olması, TNF ve IFN- seviyelerinin de düşük olması nedeniyle tam gelişmemiş düzeydedir. IFN-, en önemli makrofaj aktivasyonunu sağlayan sitokin olarak bilinmektedir. Aynı zamanda nötrofillerin aktivasyonu için de gereklidir. TNF ve IL-2'ler ile birlikte Fc reseptörlerinin ekspresyonunu arttırır ve fagolizozom formasyonlarının oluşmasını desteklerler. Belirtilen immun sistem hücrelerinin az sayıda oluşu *R.equi*'nin makrofajlarda çoğalmasını

destekleyerek fagolizozom formasyonunun oluşmasını engelleyici özelliktedirler (72, 73).

Sonuç olarak etkenin hücre duvarındaki ReqLAM ile makrofajlara bağlanması, virülens plazmidinde bulunan VapA proteininin varlığı ve mikolik asit içeren hücre duvarı patogenez üzerinde önemli rol oynamaktadır. VapA bulunduran suşların oksidatif stres, düşük demir düzeyi, artmış ısı ve asidik özellikteki pH'a dayanıklı olmaları hastalık tablosunun şekillenmesinde etkilidir.

3.5. Klinik Semptomlar

R.equi taylardaki pnömonilerin en önemli etkenlerinden biridir. 6 aylığa kadar olan taylarda görülebilir ve vakaların çoğunluğu taylar 1-3 aylık yaştaiken daha fazla görülmektedir (1, 66).

Taylarda *R.equi* enfeksiyonları yaygın apselerle birlikte akciğerlerde kronik suppurativ bronkopnömoni ve lenf düğümlerinde lenfadenit şeklinde kendini gösterir. Enfekte taylar ateş, gelişme geriliği, taşikardi, taşipne ve öksürük gibi semptomları bazen gösterir, bazen göstermezler (74). Torasik oskültasyon sonucu bazı vakalarda plevral efuzyonla birlikte hırıltılı solunum ve raller solunumu görülebilir. Abdominal solunumun da eşlik ettiği körükleme olarak adlandırılan raller solunumu, taylarda *R.equi* pnömonileri için tipiktir (75). Hastalığın sinsice ilerlemesi ve klinik belirtilerin hafif seyretmesi nedeni ile erken teşhis oldukça zordur. Özellikle hastalığın akut ve subakut formu belirti göstermeden hızla akciğerlere yayıldığı için öldürücüdür. Bu tarz vakalarda postmortem olarak intersitisiyel pnömoni ve diffuz miliyer pyogranülomatöz

akciğer lezyonları görülmektedir. Subklinik vakalarda ise tayların bazıları kendiliğinden iyileşme gösterebilmektedir (76, 77).

Ultrason muayeneleri ile apselerin tespiti erken teşhis ve tedavi açısından oldukça önemlidir. Apseler hipoekoik nodüller şeklinde çeşitli boyutlarda görülebilir (78).

Hematolojik olarak lökosit değerleri nötrofilik olarak artış göstermektedir ve fibrinojen düzeyleri artmıştır (79).

R. equi'den kaynaklanan enfeksiyonlar yalnızca akciğerlerde lezyon oluşturmamaktadırlar. Kilo kaybı, gelişme geriliği ve diyare ile sonuçlanan ve hastalığın intestinal formu olarak adlandırılan sindirim sisteminde de lezyonlar oluştururlar. Çoğunlukla etkenle kontamine balgamin yutulması ile intestinal form oluşma süreci başlar. *R. equi* 'den kaynaklanan enteritlerde multifokal ülseratif enterokolitis, peyer plaklarında ülserleşme ve mezenterik lenf nodüllerinde suppuratif veya granümatöz inflamasyon şekillenir (7, 80).

Solunum ve sindirim yolu dışında da çok nadir olarak etkenin lezyonlar oluşturduğu bildirilmiştir. Septik artrit ve osteomyelit şekillenebilir. Bunun sonucunda hayvanlarda topallık ve eklemlerde şişlik görülebilir. Yine çok nadir olarak taylarda uveitis, keratouveitis ve panoftalmitis gibi gözle ilgili semptomlar görülebilmektedir (6, 80).

Yetişkin atların bağışıklık düzeyleri taylara göre daha gelişmiş olduğundan dolayı hastalık belirtileri çok nadir olarak görülmektedir. En yaygın olarak tıpkı genç taylardaki gibi hastalığın pnömonik ve enterik formları benzer olarak

görülmektedir. Etkenin oluşturduğu enfeksiyonlar gebe kısıraklarda abortlara da neden olabilmektedir (81).

3.6. Teşhis

R.equi'den kaynaklanan pnömonilerin ayırıcı tanısı için çeşitli teşhis metotları mevcuttur. Ultrasonografi, erken teşhisi ve beraberinde erken tedaviyi getirirken etkenin transtrakeal veya nazotrakeal lavaj sıvılarından izolasyonu ve identifikasyonu altın standart olarak kabul edilmektedir.

3.6.1. Ultrasonografi

Ultrasonografi özellikle hastalık prevalansı yüksek olan ve yetiştiricilik yapılan birçok çiftlik için vakaların saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ölüm oranlarının ve tedavi süresinin azaltılması açısından erken teşhis imkanı sağlar ve beraberinde tedaviye erken başlama açısından avantajlıdır (1).

R.equi'den kaynaklanan lezyonlar pnömoni etkeni olan diğer lezyonlarla benzer özellikler gösterir ve çoğunlukla akciğerin periferinde bulunurlar. Apseler çeşitli boyutlarda, hiperekoik kapsüllü nodüller şeklinde görülür. Bazı durumlarda apselerin içerisinde gaz saptanabilir (77).

Endemik çiftliklerde genelde rutin olarak kısırakların reproduktif taramaları yapılırken bir yandan 3-6 haftalık yaştaki taylarının da subklinik *R.equi* pnömonileri yönünden ultrasonografik olarak taraması yapılmaktadır. Avusturalya'daki çiftliklerde bu prosedürle yapılan 211 taramanın 186'sında *R.equi* pnömonilerinin erken teşhisi yapılmış ve tedavi süresi 21 günden daha kısa

bir süreye indirilerek ve çoğu 10 günden az bir süre olmak üzere başarı sağlanmıştır (82).

Ultrasonografinin yüksek kullanım alanlarına rağmen bazı dezavantajları bulunmaktadır. *R.equi* pnömonilerinin özellikle diğer bakteriyel patojenlerden kaynaklanan lezyonlarla benzer özellikleri göstermesi ve bu lezyonların çoğunun akciğer parankiminde bulunması sonucu yanlış antibiyotik seçimi yapılabilmektedir. Bunun için ultrasonografi tek başına bir teşhis metodu olarak kullanılmamalıdır. Aynı zamanda eğer apseleşmeler mediastinal yüzeyde veya derin akciğer parankiminde bulunursa vakalar tanımlanamayabilir (77).

3.6.2. Serolojik Teşhis

Taylarda *R.equi* pnömonilerinin serolojik teşhisi için bazı araştırmacılar alternatif olarak birtakım tanı testleri denemişlerdir fakat yine hiçbiri kültür yönteminin yerini tutmamaktadır. Çünkü bakterinin hem virü lent hem avirü lent formları çevrede bol miktarda bulunmaktadır ve taylarda bunlara spesifik salgılanan antikorların teşhisi problemlili olabilmektedir. Klinik olarak hastalığın yokluğunda bile antikor varlığından söz edilebilmektedir. *R.equi*'nin serolojik teşhisinde maternal olarak geçen antikorlarla sonradan etkene maruz kaldıktan sonra salgılanan antikorların titrelerinin ayırımında başarısızlık yaşanmaktadır (1, 83).

Serolojik olarak antikor teşhisi için ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), AGID (Agar Gel Immunodiffusion) ve Sinerjistik Hemoliz İnhibisyon (SHI) testleri kullanılmaktadır. AGID ve SHI testleri çoğunlukla subklinik enfeksiyonlarla maternal antikor kaynaklı titreleri teşhis

etmede başarısızken ELISA *R.equi* pnömonilerinin erken teşhisi açısından diğerlerine göre daha güvenlidir (84).

SHI testi, equi faktörüne spesifik antikorların teşhisi için kullanılır ve genelde doğal olarak enfeksiyona yakalanan taylorları sağlıklılarından ayırt etmek için kullanılmaktadır. Fakat hastalığın erken dönemde tanımlanması açısından kullanılabilir bir test değildir (85, 86).

AGID testi klinik olarak hasta hayvanları tespit etmek için kullanılabilir. Fakat bu yöntemde sağlıklı görünümlü taylorların az da olsa bir bölümü pozitif çıkabilmektedir. Ayrıca hasta hayvanların tespit edilmesinde yeterli antikor titresi olmadığı zaman teşhis başarısız olabilmektedir (74).

ELISA, hastalıklıları sağlıklılarından ayırt etmede kullanılan ve *R.equi*'nin serolojik teşhisinde en kullanışlı testlerden biridir. Özellikle VapA proteini kullanılarak yapılan ELISA testinde klinik olarak hasta taylorlar ayırt edilebilmektedir (87).

3.6.3. Konvensiyonel Yöntemlerle İzolasyon ve İdentifikasyon

Hastalık vakalarının tanımlanması açısından *R.equi*'nin trakebronşiyal aspiratlarından veya nekropsi materyali olarak akciğer dokularından kültürü gold standart olarak kabul edilmektedir. Peritonit ve artritis oluşturduğu bilinen etkenin periton sıvısı ve eklem sıvılarından izolasyonu da yapılabilir (1, 88). Epidemiyolojik çalışmalar için toprak ve fekal örneklerden de izolasyon yapılmaktadır. Bunun için çeşitli selektif besiyerleri bildirilmiştir.

İlk olarak Woolcock ve ark. (89) rekabetçi floranın üremesini engelleyen ve günümüze kadar rutin olarak ekolojik ve epidemiyolojik çalışmalar için kullanılan bir besiyeri geliştirmişlerdir. Bu besiyeri Trypticase Soy Agar hazırlandıktan sonra nalidiksik asit (20 µg/ml), novabiosin (25 µg/ml), sikloheksimid (40 µg/ml) ve potasyum tellürit (%0.005) katılarak hazırlanır ve NANAT besiyeri olarak adlandırılır. Özellikle *R. equi*'nin dışkıdan ve çevresel örneklerden izolasyonunda en çok tercih edilen besiyeridir Fakat *Pseudomonas* türleri ve bazı *Corynebacteri*lerin üremelerini inhibe edemeyen bir besiyeri olmasından dolayı dezavantajları bulunmaktadır (90). 1995 yılında Gravenitz ve Pünter-Streit tarafından NANAT agara alternatif olarak CAZ-NB adıyla daha selektif bir besiyeri geliştirilmiştir. Mueller Hinton Agar temelli bu besiyeri içeriğinde ceftazidime (20 µg/ml), novabiosin (25 µg/ml) ve sikloheksimid (50µg/ml) bulundurmaktadır ve NANAT agara kıyasla birçok *Nocardia* türünün üremesini engelleyici nitelikte değerlendirilmektedir. (91).

NANAT ve CAZ-NB besiyerleri için hangisinin en iyi sonuç verdiğini kıyaslamak adına yapılan çalışmalarda izolasyon oranları arasında çok büyük farklar olmadığı bildirilmiştir. Muscatello ve ark. (90) yaptığı bir çalışmada iki besiyeri arasında herhangi bir fark olmadığını bildirirken, yalnızca bir çalışmada virülent *R. equi*'nin topraktan izolasyonunda NANAT besiyerinin daha kullanışlı olduğu bildirilmiştir (64).

CAZ-NB besiyerine anisomisin katılmasıyla ve NANAT besiyerine Polymxin B katılması ile fungal üremenin önüne geçilebilmektedir. NANAT besiyeri diğer *Rhodococcus* türlerinin üremesini inhibe ederken antimikotik etkisi zayıftır ve bakteri kolonilerinin etrafını kaplayıp saflaştırılmasını

zorlaştırmaktadır. CAZ-NB besiyeri birçok Actinomyces türünün ve Gram negatif kontaminantların üremesini engellemektedir. Her iki besiyeri de pratikte kullanılmaktadır (90).

M3T ve TINSDALE olarak adlandırılan fakat pratikte çok kullanılmayan besiyerleri de bildirilmiştir. M3T besiyeri aslında *Rhodococcus coprophilus* izolasyonu için geliştirilmiştir (92). Sodyum propiyonat, tiyamin, tuz ve sikloheksimid içeren bu besiyeri %0.005 potasyum tellürit katılarak modifiye edilmiştir. Kontaminant florayı yüksek oranda baskılaması avantajlı iken *R.equi*'nin üremesi için 72 saatten fazla zaman gerektirmesi nedeniyle pratikte çok tercih edilmemektedir (93, 94). TINSDALE besiyeri aslında *Corynebacterium diphtheriae* izolasyonu için geliştirilmiştir fakat yine çeşitli modifikasyonlarla *R.equi*'nin izolasyonu için kullanılmıştır. Kontaminant florayı zayıf oranda baskılaması yönünden dezavantajlı bir besiyeridir (93).

Selektif izolasyon yapılırken genelde sürüntü örnekleri, alınan trakebronşiyal aspiratlar eklem sıvıları veya kan örneklerinin direkt olarak besiyerine ekimi yapıp 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır (74, 95). Fakat toprak, dışkı gibi içeriğinde çok sayıda kontaminant içeren örnekler sulandırılarak ekime hazır hale getirilmektedir. Genelde 1 g örnek tartılıp üzeri 10 ml izotonik fizyolojik tuzlu su ile sulandırıldıktan sonra santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısımdan 100 µl alınarak ekim aşaması gerçekleştirilmektedir. 48-72 saat süreyle 37°C'de veya 5 gün kadar süreyle 30 °C 'de inkübasyonları yapılmaktadır (96, 97). Ayrıca antibiyotik tedavisi gören taylardan alınan nazal örneklerin inkübasyon süreleri 72 saate kadar çıkarılabilmektedir (95).

Selektif olmayan Kanlı Agar, Trypticase Soy Agar ve Nutrient Agar gibi genel üretim besiyerlerinde de etken izolasyonu yapılabilmektedir. Etkenin 37 °C’de 48 saatlik inkübasyonundan sonra kanlı agardaki koloni morfolojisi S tipi parlak, non-hemolitik 2-3mm çapındadır. Kùltürler eskidikçe koloniler daha da büyümekte ve mukoid somon rengi bir hal almaktadırlar (1).

Selektif olarak en çok kullanılan NANAT besiyerinde inkübasyon sonrası gri birleşmeye meyilli, mukoid ve rutubet kokulu koloniler oluşmaktadır (90).

3.6.4. Bakteriyoskopi ve Biyokimyasal İdentifikasyon

Alınan örneklerden veya taze kùltürlerden yapılan Gram boyama sonucunda mikroskop sahasında Gram-pozitif pleomorfik çomaklar görölmektedir. Aside zayıf dirençli bir bakteri olmasından dolayı Ziehl-Neelsen boyama da yapılabilmektedir (11).

Katı besiyerlerinde üretildiklerinde mikroskop sahasında kokobasil görünümündedirler. Sıvı besiyerlerinde üretildikleri zaman uzun çomaklar veya filamentlerle birlikte değişik şekillerde uçları kıvrık ve dallanmış görüntüleri vardır. Katı besiyerindeki taze kùltürlerin gram boyama görüntülerinde mikroskop sahasında basil formları baskın olarak görülür. Kùltür eskidikçe bakterinin kok formundaki görüntüsü daha baskındır (98).

Etkenin katalaz, üreaz lipaz ve fosfataz aktiviteleri pozitifken, oksidaz DNaz elastaz lesitinaz ve proteaz aktiviteleri negatiftir. H₂S üretimi değişkendir. Laktoz ve glukozu fermente edemez. Nitratı redükte edebilirler (Tablo 1), (1, 99).

R.equi, son derece antijenik, kolesterol oksidaz ve bir fosfolipaz C ekzoenziminden oluşan ve equi faktörü olarak adlandırılan bir substans üretir. Equi faktörü; *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in fosfolipaz D bölgesi veya *Staphylococcus aureus*'un beta toksini ile etkileşime girer. CAMP reaksiyonu olarak adlandırılan bu etkileşimin olduğu yerde, besiyerindeki eritrositlerin hemolizi gerçekleşir. Bu etkileşim, *R.equi* ve *Listeria monocytogenes* arasında da oluşur fakat reaksiyonun gerçekleşmesi; kullanılan *Listeria monocytogenes* suşunun türüne bağlıdır (1).

Tablo 1: *R.equi*'nin biyokimyasal özellikleri (99).

<i>R.equi</i> 'nin Fenotipik Özellikleri	Reaksiyon
Katalaz	+
Oksidaz	-
Hareket	-
Zorunlu Aerop	+
Glukoz Fermantasyonu	-
Glukoz Oksidasyonu	+
equi Faktörü (CAMP)	+
Jelatinaz	-
İndol	-
H ₂ S	Değişken
Üreaz	+
Nitrat Redüksiyonu	+
Lipaz	-
DNaz	-
Lesitinaz	-
Eskulin Hidrolizi	+
Kazein Hidrolizi	-

3.6.5. Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyon

Konvensiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığı zaman moleküler yöntemler hızlı sonuç vermesi bakımından avantajlıdır. Taylarda *R.equi*'den kaynaklanan pnömonilerin varlığını olabildiğince çabuk ortaya koymak için TBA sıvılarından DNA ekstraksiyonu sonrası *R.equi* için spesifik primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) aşaması gerçekleştirilebilmektedir.

Bell ve ark. (100), yaptığı bir çalışmada *R.equi* için tür spesifik primerler dizayn etmişlerdir. Kültür koleksiyonlarından DNA ekstraksiyonu sonrası bu primerlerle PCR amplifikasyonu sonucunda test edilen bütün *R.equi* türlerinin diğer *Rhodococcus* cinsi bakterilerden ve *R.equi* ile yakından ilişkili *Nocardia*, *Gordona*, *Dietzia*, *Tsukamurella*, *Corynebacterium* ve *Mycobacteria* cinslerinden ayırt edici özellikte bulmuşlardır.

R.equi'nin tür düzeyinde tanımlanması için 16S rRNA genine spesifik primerler kullanılmaktadır. Gerek kültürden gerekse trakeal aspiratlardan bakterinin identifikasyonu yapılabilir. Sellon ve ark (88), trakeal aspiratlar, nazal svaplar ve kan örneklerinden üç farklı yöntemi karşılaştırmışlardır. Kültür yöntemi, PCR yöntemi ve serolojik bir yöntem olan AGID testinin kullanıldığı bu çalışmada kültür yöntemi ile pozitif bulunan örneklerin hepsinin PCR ile tür düzeyinde identifikasyonunda hepsi *R.equi* olarak doğrulanmış ve PCR yönteminin sensitivitesi ve spesifitesi sırasıyla %100 ve %90,6 olarak bulunmuştur. Kültür yönteminin sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %57,1 ve %93,8 iken; serolojik bir yöntem olan AGID testinin ise sırasıyla %62,5 ve %75,9 olarak bulunmuştur.

Her ne kadar *R.equi*'nin varlığını PCR yöntemi ile ortaya koymak önemli olsa da taylor için virulent suşların varlığı, hastalık vakalarını tanımlamada bakteriyi tür düzeyinde tanımlamaktan daha önemlidir. Bunun için *vapA* genine spesifik primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir (101).

Oldfield ve ark (102), *vapA* ve *vapB* genine spesifik primerler kullanarak bir amplifikasyon metodu geliştirmişlerdir. Çeşitli hayvanlardan ve çevresel

örneklerden rasgele seçilen 35 *R.equi* izolatında *vapA* ve *vapB* genlerinin varlığına bakılmıştır. Bunun sonucunda aynı anda hem *vapA* hem de *vapB* geni bulunduran izolatlarla rastlanmamıştır. At izolatlarının tamamı *vapA* geni pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada *vapA* geninin taylardaki virülens için güvenilir bir marker olduğu bildirilmiştir.

Konvensiyonel PCR yöntemleri kültür yöntemi ile karşılaştırıldığında daha hızlı sonuç vermesine rağmen kalitatif özelliktedir. Hatalı pozitif sonuçları önlemek adına ve çapraz bulaşmanın olası durumlarında kantitatif real time PCR yöntemleri kullanılabilir. Rodriguez ve ark (49), at, sığır, domuz, insan ve topraktan elde edilen 178 *R.equi* izolatında ve BAL sıvılarında real time PCR yöntemi ile *vapA* geninin varlığına bakmışlardır. Konvensiyonel PCR yöntemi ile karşılaştırıldığında testin sensitivite ve spesifitesi %100 olarak bulunmuştur. Atlardan elde edilen 81 *R.equi* izolatının %85'i ve topraktan elde edilen 13 izolatın %46'sı *vapA* geni bulundururken, sığır ve domuz izolatlarının hiçbirinde *vapA* genine rastlanmamıştır. Yapılan çalışmada real time PCR yönteminin gerek kültür gerekse klinik örneklerden identifikasyonda hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Takai ve ark. (37), endemik olan bir çiftlikte klinik semptom göstermeyen 216 taydan alınan trakeal aspiratların PCR ile 77'sinde pozitiflik bulmuşlardır. Çalışmada endemik bir çiftlik olduğu halde tayların klinik semptom göstermeden pozitif bulunmaları; etkenin aerosol yolla solunum yolunu kontamine ettiğini düşündürmüştür. Bu yüzden her ne kadar sensitivitesi daha yüksek olsa da tek başına PCR ile hastalık vakalarını tanımlamaya çalışmanın her zaman güvenilir olmadığı düşünülmektedir.

3.7. Tiplendirme Yöntemleri

Tiplendirme yöntemleri, salgınlara kimliklendirilmesi, hastalık kaynağının ve salgınlar arasındaki ilişkinin belirlenmesi, daha virulent türlerin fark edilebilmesi koruma ve tedavi stratejileri geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Özellikle epidemiyolojik çalışmalar etkenin tiplendirilmesi temeline dayanmaktadır. Bugüne kadar *R.equi* izolatlarının genetik çeşitliliğini değerlendirmek için farklı teknikler kullanılmıştır.

Etkenin virülensinden sorumlu plazmidlerin tiplendirilmesinde en çok kullanılan RFLP yöntemi olup, araştırmacılar virulent olduğu doğrulanmış suşların plazmid ekstraksiyonlarını yaptıktan sonra hedef DNA'yı restriksiyon enzimleri ile muamele ederek amplifikasyon sonucunda oluşan bant profillerine göre plazmidlerin tiplendirmesini yapmışlardır.

Şu ana kadar dünyada *vapA* geni bulunduran izolatlarda bildirilen 12 adet virülens plazmid tipi bulunmaktadır. Bunlar 85-kb Tip I-IV, 87-kb Tip I-III ve 90-kb Tip I-V plazmidleridir (Tablo 2), (103). Amerika, Avrupa, Avusturalya Afrika Kore ve Japonya'da bildirilen virülensle ilişkili plazmidlerin dağılımı coğrafik olarak farklılıklar göstermiştir (36,37,55,104-109). Amerika Avusturalya ve Avrupa'da en çok 85-kb Tip I veya 87-kb Tip I plazmidin varlığı bildirilmiştir. 85-kb Tip II, sadece Fransa'da bildirilirken 85-kb Tip III-IV, ilk olarak Teksas'ta bildirilmiştir. Bunun yanı sıra 87-kb Tip II ve 90-kb Tip I-IV plazmidleri, Japonya'da klinik ve çevresel örneklerden elde edilen *R.equi* izolatlarında bildirilmiştir (38).

Türkiye’de Tel ve ark. (110), elde ettikleri virulent *R.equi* izolatlarının hepsinin 85-kb Tip I plazmidine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Witkowski ve ark. (111), inceledikleri 58 virulent *R.equi* izolatında RFLP yöntemi ile plazmid profillerine bakmışlar ve bunların 48’inin 85-kb Tip I plazmidine sahip olduğunu, 8’inin 87-kb Tip I plazmidini taşıdığını ve geri kalan bir izolatın diğerlerinden farklı olduğunu belirtmişler, bunu 85-kb Tip V adında yeni bir varyant olarak bildirmişlerdir.

Tablo 2: Dünyada bildirilen *R.equi* plazmid tipleri ve restriksiyon endonükleaz kalıpları (103)

TİP	Boyut (kb)	Suş	Ülke	Restriksiyon enzimlerinin oluşturduğu kalıp			
				<i>EcoRI</i>	<i>EcoT22I</i>	<i>HindIII</i>	<i>BamHI</i>
85-kb Tip I	85	ATCC33701	Kanada	1	1	1	1
85-kb Tip II	85	96E35	Fransa	1	1	2	1
85-kb Tip III	85	T47-2	USA	2	1	1	1
85-kb Tip IV	85	T43	USA	3	1	1	1
87-kb Tip I	87	222	Kanada	4	2	1	1
87-kb Tip II	87	96B6	Japonya	5	2	3	2
87-kb Tip III	87	Brazil	Brezilya	11	6	5	1
90-kb Tip I	90	90	Japonya	6	1	4	3
90-kb Tip II	90	S11-8 (Kiso)	Japonya	7	1	1	1
90-kb Tip III	90	Kuma 83-3	Japonya	8	3	4	3
90-kb Tip IV	90	Kuma 83-10	Japonya	9	4	4	3
90-kb Tip V	90	J21-2	Kore	10	5	5	4

R.equi izolatları arasındaki genetik ilişkinin belirlenebilmesi için yapılan epidemiyolojik çalışmalar, PFGE yöntemi kullanılarak da yapılabilmektedir. Bu yöntem, moleküler epidemiyolojik çalışmalar için altın standart olarak kabul edilmektedir. Ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilirliği olan güvenilir bir metottur. Bu elektroforez tekniğinde elektrik alanının yönleri düzenli olarak değiştirilerek büyük DNA moleküllerinin birbirinden ayrılması sağlanmaktadır ve alternatif olarak birden fazla elektrik alanı kullanıldığı için diğer elektroforez yöntemlerine

üstünlük sağlamaktadır. Böylece oluşan bant profilleri izolatlar arasındaki genetik ilişkilere göre kategorilere ayrılarak yorumlanmaktadır (112).

Birkaç çalışmada araştırmacılar PFGE yöntemini kullanarak atlardan elde ettikleri *R.equi* izolatlarının genetik çeşitliliğini değerlendirmişlerdir.

Cohen ve ark. (32), *R.equi*'nin genetik çeşitliliğinin ülkeler arasında ve avirulent suşlarla karşılaştırıldığında farklılıklarını araştırmışlardır. Arjantin'den 28, İrlanda'dan 19, Japonya'dan 26, ve Amerika'dan 125 izolat olmak üzere toplamda 198 adet virulent *R.equi* izolatının genotiplendirilmesi yapılmıştır.

Dendogram analizleri sonucunda farklı ülkelerden elde edilen *R.equi* izolatlarının PFGE kalıpları arasında hatrı sayılır derecede genetik olarak çeşitlilik bulunmuştur. Yine aynı çalışmada virulent *R.equi* suşları ile avirulent tipleri karşılaştırılmış, ve genetik olarak birbirlerinden anlamlı düzeyde farklı bulunmuşlardır. Soedarmanto ve ark. (113), benzer olarak; Avrupa'da sağlıklı görünümlü buzağılardan ve atlardan elde ettiği 21 *R.equi* izolatında genetik olarak izolatlar arası ve çiftlikler arası farklılık bulmuşlardır.

Venner ve ark. (114), virulent olan 83 *R.equi* izolatına RFLP ve PFGE yöntemlerini birlikte uygulamışlardır. RFLP ile önce plazmid profillerini ortaya koyup, PFGE ile pulsotiplerine bakmışlardır. 83 izolatın 80 tanesinin 85-kb Tip I plazmidine sahip olduğunu ve geri kalan üç tanesinin 87-kb Tip I plazmidine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bunun sonucunda izolatların PFGE ile altı farklı genotipe ayrıldığını bildirmişlerdir.

Son ve ark. (115), klinik ve çevresel örneklerden elde ettikleri 34 virulent *R.equi* izolatının 16 tanesinin 90-kb Tip II plazmidine ve 18 tanesinin 90-kb Tip V

plazmidine sahip olduğunu bildirmişlerdir. PFGE yöntemi ile bu izolatların genotiplendirilmesi sonucunda her iki plazmid tipinin ikişer farklı genotipe olduklarını, ve toplamda bu 34 izolatın dört farklı genotipe ayrıldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak düşük oranda genetik çeşitlilik bulunmuştur.

Witkowski ve ark. (116), ala geyiklerden, yaban domuzlarından ve karacalardan elde ettikleri 27 *R.equi* izolatına PFGE yöntemi uygulamışlar, dendogram analizleri sonucunda dört farklı küme ve 25 farklı genotip bildirmişlerdir.

3.8. Tedavi

R.equi pnömonilerindeki pyogranülatöz inflamatuvar cevapla birlikte, akciğer apselerinin varlığı ve bakterinin intraselüler özellik göstermesi tedavide etkili antibiyotik seçmeyi zorlaştırmaktadır. Özellikle makrofajlara ve kazeöz materyallere penetre olabilen makrolid grubu lipofilik antibiyotikler tedavide başarı şansını arttırmaktadır. Bununla birlikte in vitro ortamda duyarlı bulunan çoğu antibiyotikle yapılan tedavi, pratikte kullanıldığı zaman başarısız olabilmektedir (1, 117).

R.equi pnömonisi için eritromisin ve rifampin gibi lipofilik antimikrobiyal ajanların kombinasyonu ile yapılan tedaviler yirmi yıldan fazladır kullanılmaktadır. Daha önceden tedavi için lipofilik özellik göstermeyen penisilin ve gentamisin gibi antibiyotiklerin kullanımı tedavide başarısız olmuş ve tayların ölümüne neden olmuştur (83, 118).

Eritromisin ve rifampin gibi antibiyotikler tedavide tek başına önerilmemektedir. Dirençli türlerin oluşmasını önleme açısından ve özellikle eritromisinin tek başına intraselüler ortamda zayıf etkisi olmasından dolayı bu antibiyotikler kombine şekilde kullanılmalıdır. Her iki antibiyotiğin *R.equi*'ye karşı in vivo ortamda birbirleriyle etkileşimleri ile hastalığa karşı sinerjistik etkileri daha da artmaktadır (117).

Eritromisin ve rifampin uygulamalarının çeşitli yan etkileri bulunmaktadır. Tedavinin başlaması ile kısmen anoreksi, hafif kolitis ve dış gıcırdatması görülebilir. İlacın kesilmesi durumunda bu belirtilerin ortadan kalktığı görülmüştür. (95)

Eritromisinin gastrointestinal yan etkilere sebep olabilen bir antibiyotik olduğu bildirilmiştir. Taylarda hafif diyare ile birlikte tedavi edilen tayın annesinde *Clostridium difficile* kaynaklı kolitis yaptığı görülmüştür. Bu durumda kısarak, intestinal florasını dengelemek için kaprofaji davranışları sergilemeye başlar. Eritromisin tedavisi ile ilişkili yan etkilerden bazıları da hipertermi ve taşipne gibi ciddi semptomlardır. Ölümmler daha çok sıcak havalarda tedavi edilen taylarda hipertermik reaksiyonlardan sonra gerçekleşmektedir (95).

Son yıllarda azitromisin klaritromisin ve tulatromisin gibi yeni makrolidler tedavide eritromisin yerine kombine şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Eritromisinle kıyaslandığında bu antibiyotikler yan etkilerinin az olması ve daha az dozda kullanılmaları sebebiyle avantajlıdır. Azitromisin ve klaritromisinin her ikisi de oral yolla kullanılabilir. Azitromisin 5 gün boyunca günde 10mg/kg olmak şartıyla klaritromisinle birlikte kullanılabilir. Klaritromisinin dozu

da her iki günde bir ve kullanıldığında da 12 saatte bir olmak şartıyla 7,5mg/kg olacak şekilde kullanılmaktadır. (119, 120).

Yarı ömürleri ve biyoyararlanımlarının yüksek olmasından dolayı yeni nesil makrolidler özellikle eritromisine kıyasla daha düşük dozda kullanılması bakımından avantajlıdır. Giguère ve ark. (121) yaptığı bir çalışmada klaritromisinle rifampinin kombine şekilde kullanılmasının rifampinin ayrı ayrı azitromisin ve eritromisin ile kombine şekilde kullanılmasından daha etkili bulmuşlardır.

Tulatromisin Avrupa’da sığır domuz ve atlardaki pulmoner enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla enjeksiyonluk olarak kullanılan bir makroliddir. Haftada bir 2.5mg/kg olmak şartıyla enjekte edilebilir. Fakat in vitro ortamdaki zayıf aktivitesi ve minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) yüksek olması nedeni ile pratikte tek başına kullanılması önerilmemektedir. Tulatromisinle alakalı literatürlerde farmakokinetik etkileşimleri bakımından fazla veri bulunmamaktadır. Ayrıca rifampin ile kombine edildiğinde akciğerdeki konsantrasyonunun azaldığı görülmektedir (122, 123).

Tilmikosin ve tildipirosin gibi makrolidler de tedavide kullanılmaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda bunların da *R. equi* pnömonilerine karşı çok etkili olmadığı görülmüştür (124).

Tedavi için antimikrobiyal ajanların bilinçli bir şekilde kullanılması direnç gelişiminin sınırlandırılmasında büyük öneme sahiptir. Geniş çaplı antibiyotik kullanımı antibiyotik direncinin gelişmesinde destekleyici görev yapar. Lipofilik antibiyotiklerle uzun süreli tedaviler de direncin artması üzerinde etkilidir.

Rifampin ve eritromisin dirençli izolatların prevalansı her ne kadar düşük olsa da her iki ilacın da MIC değerleri artış göstermektedir. Yeni makrolidlerin ortaya çıkışı antimikrobiyal direncin gelişmesini engellememektedir, çünkü makrolidler arasında çapraz direnç yaygın olarak görülmektedir. Giguère ve ark (125) yaptığı bir çalışmada 24 *R. equi* izolatının 22 tanesinin rifampin ile birlikte eritromisin, azitromisin ve klaritromisine dirençli olduğunu görmüşlerdir.

Ultrasona dayalı görüntülemeler tayların hangi durumda tedaviye ihtiyaç duyup duymadıkları konusunda da bilgi verebilmektedir. Subklinik olarak etkilenen taylarda bulunan bir veya daha fazla olmak üzere çapı 1-2 cm'den daha küçük olan apselerin varlığında bazen tedavi olmaksızın iyileşme sağlanabilmektedir. Bu nedenle tedavinin olup olmayacağı klinisyenin tecrübesine dayalı bir durumdur. Tedavi için kullanılan antimikrobiyal ajanların olası yan etkileri de göz önünde bulundurulursa, apseler görüldüğü andan itibaren hayvanın takibe alınması ve ultrasonografik görüntülemenin sürekliliği hemen antibiyotik kullanımına başlanmasından daha avantajlı bir seçenek olacaktır (126).

3.9. Korunma ve Kontrol

3.9.1. Antimikrobiyal Profilaksi

R. equi pnömonilerine karşı iki ila dört haftalık taylara korunma stratejileri amacıyla antimikrobiyal profilaksi uygulamaları denenir. Bunun nedeni özellikle neonatal dönemde olan iki haftalıktan küçük tayların enfeksiyona karşı daha duyarlı olmalarından kaynaklanır (117, 127).

R. equi pnömonilerinin prevalansı üzerine Teksas'ta yapılan bir çalışmada profilaktik azitromisin terapileri denenmiştir. Bu çalışmada 10 tane endemik

çiftlik üzerinde çalışılmış ve rasgele seçilen iki haftalık kadar olan taylarda her 48 saatte bir azitromisin uygulamaları yapılmıştır ve hastalığın prevalansı profilaksi almayan grupla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda profilaktik tedavi alan grupta (9/170, %5,3) profilaksi almayan grupla kıyaslandığında (35/168 % 20,8) belirgin bir şekilde hastalık prevalansında düşüş gözlemlenmiştir (128).

Almanya’da 4 haftalık taylar üzerinde deney ve kontrol grubu olarak ayrılarak azitromisin uygulaması yapılan benzer bir çalışmada hastalık prevalansı üzerinde herhangi bir fark bulunmamıştır (129). Bu çalışmada uygulama yapılan grup kontrol grubundan 1 ay sonra apseleşme belirtileri göstermiştir. Buna göre genç taylarda profilaksi amacıyla yapılan antibiyotik uygulamaları *R.equi* pnömonilerinden korunma açısından güvenilir bulunmamıştır (117).

Makrolid ve rifampin dirençliliği göz önünde bulundurulduğunda *R.equi* doksisisiklin sitropin, imidazol grubu olan bifonazol, klotrimazol, ekonazol, ve mikonazol gibi ilaçlara yüksek oranda duyarlıdır. Ancak bunların henüz etkili ve güvenli olduğuna dair denemeler yapılmamıştır (124, 130).

Virulent *R.equi* konakçı bünyesinde üreyebilmek için ortamda demir varlığına ihtiyaç duymaktadır. Fagozomlarda demirin tükendiği durumda *vapA* geni upregüle olur. Bu durumda virülens daha da artmış olur. *vapA*’nın upregülasyonu intraselüler proliferasyona olanak vermek için, demirin farklı kaynaklardan ayrılmasını kolaylaştırıyor gibi görünür. Gallium maltolate adı verilen kemoflaksi için kullanılan bir madde demir 3 iyonunu taklit ederek *R.equi*’nin demir metabolizması üzerinde olumsuz etki yapar. Tedavide alternatif bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilir. Bu maddenin deneysel çalışmalarda

fareler üzerinde denendiğinde *R.equi*'nin üremesini inhibe ettiği ve makrofajlarda virulent *R.equi*'nin intraselüler proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür ve taylorlarda da güvenle kullanılabilir (131, 132, 133). Günlük olarak 20mg/kg dozda kullanılması taylorlar için oldukça uygun bulunmuştur. Farmakokinetik çalışmalar metil selüloz formulu gallium maltolatın günlük olarak 30mg/kg dozunda verilmesinin terapötik olarak oldukça etkili olduğunu göstermiştir (132, 134). Fakat araştırmacılar 2 haftalık kadar olan taylorlarda bu maddenin profilaktik olarak başarısız olduğunu görmüşlerdir (135).

Antimikrobiyal profilaksi her ne kadar hastalıktan korunma stratejilerinden biri olarak görülse de büyük ölçüde antimikrobiyal direncin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu durumda olası enfeksiyonlarda tedavinin başarı şansı düşmektedir. Bu yüzden ultrasonografi, hematolojik ve klinik değerlendirmeler yapılarak bu ajanların kullanımı daha uygun bulunmuştur (117).

3.9.2. İmmunoprofilaksi

Etkili bir aşılama programının olmamasından dolayı virulent *R.equi*'ye karşı spesifik olarak geliştirilen ve humoral bağışıklığı uyaran hiperimmün plazma uygulamaları pratikte kullanılmaktadır. Çalışmalarda hiperimmün plazma uygulamalarının koruyucu etkileri değişkenlik göstermektedir (136, 137).

R.equi'ye karşı immunize edilmiş atlardan alınan antikorların hasta taylorlara verilmesi ile enfeksiyonun şiddetinin azaltıldığı görülmüştür. Özellikle elde edilen plazmaların *R.equi*'ye karşı immunize edilen atlardan alınması gerekmektedir.

Hiperimmün plazmanın koruyucu bileşenleri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Özellikle VapA ve VapC proteinlerine karşı geliştirilen

antikorlar önemli görülürken, sitokinler, komplement faktörler ve fibronektinler gibi diğer non spesifik faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir (117, 138).

İmmunize edilen kısırakların kolostrumları yoluyla virü lent *R.equi*'ye spesifik antikorlarının pasif transferi yoluyla taylarda oluşturduğu koruyuculuğu üzerine yapılan çalışmalar karışık sonuçlar göstermiştir. Madigan ve ark (139) ile Varga ve ark. (140), yaptıkları çalışmalarda kısırakların canlı virü lent *R.equi* aşısıyla aşılanmış olsalar bile kolostrumdaki antikorlarının pasif transferinin herhangi bir koruyuculuğunu görmemişlerdir. Ancak Fransa'da üç endemik çiftlikte yapılan bir çalışmada ya formaldehitte muamele edilmiş virü lent *R.equi* ya da su bazlı nanopartikül adjuvanta bağlı VapA protein antijeni (Montanide IMS 3012) ile immunize edilen kısırakların kolosturumunu alan taylarında koruyuculuk saptanmıştır. Taylardaki virü lent *R.equi*'ye karşı oluşan bu koruyucu etki, polimorfnükleer fagositlerin opsonik kapasitesinin artışı ile ilişkilidir. Bu taylardaki serum antikorlarının yüksek konsantrasyonları kolostrumdan pasif transferin bir sonucu olarak görülmektedir (141). Arjantin'de yapılan bir çalışmada da 25 günlük veya daha genç taylara yapılan hiperimmun plazma uygulamalarının hastalık prevalansını ve şiddetini yüksek oranda azalttığı görülmüştür (142).

HIP uygulaması için optimal dozajın ve zamanın tam olarak iyi belirlenememesi bu yöntemin koruma ve kontrolde pek güvenilir bir yerde olmadığını düşündürmektedir. Genotipik olarak farklı olan saha suşları veya üretim esnasında virülensini kaybeden suşlar gibi avirü lent *R.equi*'ye spesifik plazmalar, uygun olmayan dozlar ve HIP verilen atlardaki uygun olmayan immunogenetik faktörler de bu uygulamanın selektivitesini düşürmektedir.

Chaffin ve ark. (143), *R. equi* ile deneysel olarak enfeksiyon oluşturulmuş taylara enfeksiyon oluşturulduktan 9 gün sonra HIP uygulaması yapmış ve herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Bu nedenle zaten doğduğundan beri etkene maruz kalan taylara hastalık oluşmadan önce ve olabildiğince erken dönemlerde HIP uygulamaları yapılmalıdır (144).

Erganiş ve ark. (145), yaptıkları bir çalışmada gebe kısırakları su bazlı nanopartikül adjuvanta bağlı VapA protein antijeni (Montanide IMS 3012) ile immunize etmişlerdir. Bunun sonucunda bu kısırakların taylarının kolostrumdan aldıkları antikorlarla ve bununla birlikte taylara bu kısıraklardan elde edilen antikorların verilmesi ile gerçekleştirilen pasif immunizasyonla etkili bir şekilde *R. equi* pnömonilerinin şiddetinin azaldığını bildirmişlerdir.

HIP uygulamaları her ne kadar hastalığa yakalanma riskini azaltsa da kesin olarak *R. equi* pnömonilerinden korunmada etkili değildir. Bunun için yine hayvanların dikkatle izlenmesi gerekir. Ayrıca maliyetli ve uygulama olarak zaman ve işçilik gerektirdiğinden dolayı çiftlikteki bütün taylara yapılamamaktadır.

3.9.3. Çevresel Faktörlerin Kontrolü

R. equi pnömonilerinin önlenmesi ve kontrolü için etkili bir stratejinin ana odağı şüpheli tayın çevresiyle ilgili faktörler olmalıdır. Şüpheli tayların özellikle yüksek konsantrasyondaki virulent *R. equi* ile kontamine havanın solunması ile risk altında oldukları düşünülmektedir. Çiftlik yönetim stratejileri ile durumun önüne geçilebilmektedir. Aynı zamanda *R. equi* pnömonilerinin prevalansını ve

şiddetini azaltmak için kullanılan teşhis yöntemleri ve terapötik ajanların etkisi çevresel faktörlerin kontrolü ile arttırılabilir (117).

Avusturalya’da kısraklar ve taylar bir araya gelmeden önce sulama sistemleri ile hayvanların yıkanması sonucunda toprak kaynaklı virulent *R.equi*’nin bulaşma riski yarıya indirilmektedir. Tayların dış ortamda yüksek su tutma kapasitesine sahip ve özellikle kum yerine killi topraklarda bulundurulması ve padoklarda ve dış ortamlarda serbest olarak dolaştırılan tayların mera örtüsünün iyi şartlarda bulundurulması virulent *R.equi*’ye maruz kalma durumunu azaltmaktadır (52).

Altlık kaynaklı virulent *R.equi*’nin solunmasını azaltmak için rutin olarak altlıkların değiştirilmesi veya tayların burada geçirdiği zamanın çok uzun tutulmaması gerekir. Etkilenen tayların barındırıldığı ahırların dezenfekte edilmesi ve eş zamanlı olarak hastalığın tedavisine başlanması kontrol için gerekli faktörlerdendir. Altlık malzemesinin dekontaminasyonu ve alternatif olarak altlık yerine karton kullanımı ve ahırların kimyasallarla buğulanması, havadaki virulent *R.equi* miktarını da azaltabilmektedir (82).

Dezenfektanların *R.equi*’nin üremesi üzerine etkisiyle alakalı literatürlerde fazla veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte organizmanın üremesi aşırı asidik ve aşırı alkali koşullarda baskılandığından kireç gibi toprak pH’sını değiştiren dezenfektanlar virulent *R.equi* kontaminasyonunun önüne geçilmesinde etkili olabilmektedir (12, 117). Enfeksiyon şüphesi olan taylar, toprağın fekal bulaşmadan kaynaklanan virulent *R.equi* ile kontaminasyonunu ve yayılma potansiyelini önlemek için ayrı bir yere alınıp sürüden çıkarılmalıdır. Vakaların

erken teşhisi, izlenmesi ve tedaviye erken başlanması, kayıpların azalmasıyla birlikte taylar arasında patojenin bulaşma ve yayılmasının sınırlandırılmasını ve doğru orantılı olarak tedavi maliyetinin azalmasını sağlamaktadır (74).

At dışkılarının padoklarda gübre olarak kullanılması ya da ahırlardan veya padoklardan dışkıların mekanik olarak temizlenmesinin hastalığın prevalansı üzerinde herhangi bir etkisinin olduğuna dair hiçbir epidemiyolojik kanıt bulunmamaktadır (146, 147). Ancak at dışkılarının çevresel olarak etrafta birikiminin önlenmesi, etrafta virüent *R.equi*'nin çoğalmasını geciktirecek etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca 45 °C'nin üzerinde ısı işlem görmüş at dışkılarının gübre olarak padoklarda kullanılması toprakta virüent *R.equi*'nin azaltılmasına yardımcı olabilmektedir (148). Fakat ısı işlem görmüş dışkıları toprağa bağlı virüent *R.equi*'nin üremesini destekleyen bol miktarda uçucu yağ asidi içermektedir. Bu durumda ısı işlem görmüş at dışkılarının tekrar tayın ortamına geri dönüşümü virüent *R.equi*'nin çevresel proliferasyonunu arttırabilir ve bu durumdan kaçınılması gerekir (12).

3.9.4. Sürü Yönetimi

Tayların bir arada bulunması ve barınma koşulları patojene maruz kalma oranıyla birlikte hastalığın prevalansını ve şiddetini etkileyen faktörlerdir. Kuskie ve ark. (149), Kentucky'de yaptıkları bir çalışmada atların ağırlıklı olarak barındığı bölgelerde virüent *R.equi* konsantrasyonunun daha yüksek olduğunu görmüşlerdir. Ahırlarda padoklarda ve avlularda çok sayıda kısrağı ve tayın barınması ve toplanması sonucu dışkılarının birikmesiyle toprakta da yayılan virüent *R.equi*'nin ortamda tozluysa hayvanların soluk alıp vermesi ile yüksek

oranda yayılması söz konusu olmaktadır. Ayrıca tay sayısının fazlalığı taydan taya solunum ile bulaşma olasılığını arttırmaktadır. Bu durumlar şüpheli tayların yüksek oranda pulmoner hasar görmesine ve hastalığı geliştirmesine zemin hazırlamaktadır. Texas'ta yapılan epidemiyolojik çalışmalar da tay sayısındaki yoğunluğun hastalık prevalansını artırma konusunda doğru orantılı olduğunu destekler niteliktedir. Bu nedenle hayvanlar padoklara çıkarıldığında bir arada toplandığı sürelerin azaltılması bulaşıcılığın önlenmesi konusunda yararlı olabilmektedir. Bu gibi stratejiler, tedavinin etkinliğini artırırken tedavi süresini olabildiğince azaltacaktır ve hastalığın daha rahat atlatılmasını sağlayacaktır (146,150).

Korunma ve kontrol stratejileri özellikle *R.equi* pnömonisi geliştirme riski olan taylara odaklanarak gerçekleştirilmelidir. Özellikle iki haftalıktan küçük taylar çevresel faktörlere ve bağışıklık düzeylerinin diğer taylara göre daha düşük olmasına bağlı olarak hastalığa yakalanma konusunda oldukça duyarlıdırlar (117).

3.10. Hastalığın Türkiye’de ve Dünyadaki Durumu

Türkiye’de tayların *R.equi* yönünden prevalansı üzerine yapılmış çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmalar daha çok Marmara ve Şanlıurfa bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda *R.equi*’nin görülme oranı bölgeden bölgeye farklılık göstermiştir.

2013 yılında Bursa bölgesinde yapılan bir çalışmada hayvan hastanesine getirilen solunum sistemi semptomları gösteren 2-6 aylık 20 adet tayda bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvılarından bakteriyolojik ve sitolojik

değerlendirmeler sonucu bir adet *R.equi* izolatu elde edilmiştir ve selektif izolasyon için CAZ-NB besiyeri kullanılmıştır. En çok izole edilen bakteri türü *Streptococcus zooepidemicus* olarak bulunmuştur. Sitolojik değerlendirmelerle bakteri izole edilen örneklerde izole edilmeyenlere göre belirgin bir fark bulunmuş ve bu durumda sitolojik değerlendirmenin tanıda önemli olduğu kanısına varılmıştır (151).

2003-2006 yılları arasında klinik olarak solunum güçlüğü bulunan 3 günlükten 7 aylığa kadar olan ölen 12 taya nekropsi sonrası yapılan immunperoksidaz boyamalar sonucunda tayların hepsinin *R.equi* yönünden pozitif olduğu saptanmış fakat mikrobiyolojik olarak etken izolasyonunda yalnızca iki tanesinde pozitiflik bulunmuştur. Bağırsaklarda herhangi bir lezyonla karşılaşılma ve hepsinin akciğer lezyonu gösterdiği görülmüştür (152).

Bursa ve İstanbul çevresinde 1-5 aylık taylardan alınan trakeal aspiratlardan ve kandan sırasıyla immunhistokimya ve ELISA yöntemi ile *R.equi* varlığına bakılmıştır. Çalışmada 56 adet semptom gösteren ve 54 adet göstermeyen tay kullanılmıştır. Semptom gösterenlerin %73,2'si ve göstermeyenlerin %70,4'ü tanesi immunhistokimya yöntemi ile pozitif bulunurken yine sırasıyla %66,1'i ve %66,7'si ELISA yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Bu durumda iki yöntem arasında klinik semptom göstermesi bakımından değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca immunhistokimya yönteminin sensitivitesinin yüksek olmasına rağmen spesifitesinin de düşük olduğu bildirilmiştir (153).

Şanlıurfa bölgesinde 20 adet çiftlikten toplanan 105'er adet toprak, at dışkısı ve tay dışkılarından izolasyon sonucu toplamda 263 örnek pozitif bulunmuştur. Toprak örneklerinin %86,6'sı (91/105), at dışkılarının %89,5'i (94/105) ve tay dışkılarının %74,2'si (78/105) pozitif bulunmuştur. Klinik olarak pnömoni semptomu gösteren 25 adet taydan nazal svap örnekleri toplanmış ve izolasyon sonucu hiçbirinde *R.equi* varlığına rastlanmamıştır. İzolatların 32 tanesi virulent *R.equi* olarak PCR ile identifiye edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada RFLP yöntemi ile plazmid profil analizi sonucunda *vapA* pozitif izolatların 85-kb tip I plazmide sahip olduğu bildirilmiştir (110).

Brezilya'da endemik olmayan 341 çiftlikten alınan sağlıklı görünümlü 3 yaştan 29 yaşına kadar olan atlarda 1010 nazal örnekten *R.equi*'nin prevalansı ile birlikte antibiyotik duyarlılık profillerine ve risk faktörlerine bakılmıştır. Bu örneklerin %1'i (10/1010) *R.equi* yönünden pozitif bulunmuş ve 10 çiftliğin en az 1 tane pozitif hayvan bulundurduğu görülmüştür. 10 adet *R.equi* izolatının yalnızca bir tanesi virulent suş olarak tanımlanmıştır (154).

Brezilya'da yapılan retrospektif bir çalışmada biyokimyasal olarak doğrulanmış ve 6 adet çiftlikten elde edilen 118 *R.equi* izolatının tür spesifik 16S rRNA geni ve *vapA* geni primerleri ile multiplex PCR yapılarak moleküler olarak identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatların 41 tanesi yetişkin atların dışkılarından, 33 tanesi tay dışkılarından 21 tanesi topraktan, 10 tanesi tayların bulunduğu ahırlardan, 10 tanesi ölmüş hayvanların akciğerlerinden ve 3 tanesi diğer hayvanlardan izole edilmiştir. Toplamda 118 izolatın 17 tanesinin *vapA* pozitif olduğu görülmüştür. Virulent *R.equi* suşları 1 endemik çiftlikten ve

3 sporadik çiftlikten elde edilmiştir. Hastalık vakası rapor edilmemiş çiftliklerde virü lent *R.equi*'ye rastlanmamıştır (155)

Mir ve ark. (9), 2010 Ağustos ve 2011 Eylül ayları arasında 141 adet nazal svap örneğinin hem izolasyon ile hem direkt PCR ile *R.equi* yönünden pozitifliğine bakmışlardır. Bu örneklerin 98 tanesi beş yaşından büyük atlardan, 43'ü 6 aylıktan küçük taylardan alınmıştır. Yetişkin atlardan 9 adet, taylardan ise 3 adet olmak üzere toplamda 12 örnek *R.equi* olarak identifiye edilmiştir. İzolasyon için prevalans oranı yetişkin atlar ve taylar için sırasıyla %20,93 ve %3,06 iken, direkt PCR yöntemi ile bakıldığında bu oran sırasıyla %25,58 ve %4,08 olarak bulunmuştur. Bunun sonucunda örneklerden direkt PCR ile identifikasyonun konvensiyonel olarak izolasyona göre daha duyarlı olduğu kanısına varılmıştır.

Muscatello ve ark. (156), 55 tayın solunum yolundan verilen havada noninvaziv bir yöntem kullanarak virü lent *R.equi*'nin varlığına bakmışlardır. Bu tayların 37 tanesi pozitif bulunmuştur. Burundan verilen havanın çevredeki havadan çok daha yüksek oranda virü lent *R.equi* bulundurduğu görülmüştür. Fakat hastalıklılar ile sağlıklılar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmayla aerosol taşınmanın taylar arasında mümkün olduğu ve *R.equi* pnömonilerinin prevalansı üzerinde önemli olduğu kanaatine varılmıştır.

Witkowski ve ark. (116), *R.equi*'nin lenf nodüllerinden at, sığır ve domuzlardan alınan örneklerinde prevalansına bakmışlardır. Sığır ve domuzların karkaslarından izolasyon yapılmışken atlardan punksiyon ile örnekler toplanmıştır. Atlardan alınan 198 örnekten yalnızca bir tanesi *R.equi* yönünden

pozitif bulunmuş ve *vapA* primerleri kullanılarak virulent olarak identifiye edilmiştir. Bu izolatın RFLP ile plazmid profil analizi sonucu 85-kb tip I plazmide sahip olduğu bildirilmiştir.

Javed ve ark. (157), çevresel örneklerden ve nazal svaplardan *R.equi*'nin prevalansı, moleküler karakterizasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarını araştırmışlardır. Toplamda atlardan 96 adet nazofaryngeal svap toplanmış 9 tanesi konvensiyonel yöntemlerle pozitif bulunmuş ve yalnızca 3 tanesi PCR ile moleküler olarak doğrulanmıştır. İzolatların hepsi amoksisiline duyarlı bulunurken penisilin G'ye dirençli bulunmuştur.

Kuskie ve ark. (149), Kentucky'de 2008 Şubat-Haziran ayları arasında 2 adet yetiştiricilik yapılan çiftlikte padoklarda ve tayların barındırıldığı ahırlarda virulent *R.equi*'nin modifiye koloni immunblot tekniği ile havadaki konsantrasyonuna bakmışlardır. Örnekler 24 saatlik periyotlarla her ay toplanmıştır. Virulent *R.equi* konsantrasyonunun özellikle tayların yoğun olarak bir arada olduğu sabah saat 6 ile 11:59 arasında en yüksek olduğu görülmüştür.

Cohen ve ark (158), Kentucky'de 2009 Şubat-Haziran ayları arasında 30 çiftlikte koloni immunblot tekniği ile havadaki virulent *R.equi* konsantrasyonuna bakmışlardır. Örnekler her gün toplanmış, hem padoklardan hem ahırlardan örnekleme yapılmıştır. Ahır ve padoklar için 180'er adet hava örneğinin %27'si (49/180), ve %7'si (13/180) sırasıyla pozitif bulunmuştur. Bu durumda tayların ahırlarda enfekte olma riskinin padoklardakinden daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Chhabra ve ark. (159), solunum yolu problemi olan taylardan elde edilen 28 *R.equi* izolatının *vap* genlerini araştırmışlardır. İzolatlar *vapA*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapG* ve *vapH* yönünden pozitif bulunurken *vapB* yönünden negatif bulunmuştur. *vapB* geni bulundurmayan suşlar zaten literatürlerde taylar için avirulent olarak bildirilmiştir ve çalışmanın sonuçları diğer araştırmalarla paralellik göstermiştir.

Khurana ve ark. (160), 298 örnek üzerinde (136 nazal svap, 130 fekal svap, 28 toprak, 4 akciğer dokusu) *R.equi*'nin izolasyonu ve identifikasyonu ile birlikte ve antibiyotik dirençliliklerini araştırmışlardır. Klinik örneklerden toplamda 28 adet *R.equi* izolati elde edilmiştir. Bunların 26 tanesinin *vapA* genine spesifik primerler ile virulent *R.equi* olduğu görülmüştür. Test edilen izolatlar kloramfenikol, eritromisin, oksitetrasiklin'e duyarlı bulunurken, ampisilin, trimetoprim kloksasilin ve amikasin dirençli bulunmuştur.

Witkowski ve ark (111), 2001 ve 2012 yılları arasında 13 çiftlikten elde edilen *R.equi*'lerin moleküler karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Toplamda 58 adet *vapA* pozitif *R.equi* izolatına RFLP yöntemi ile plazmid profili analizi yapılmış ve PFGE ile pulsotipleri ortaya konulmuştur.

Tirosh-Levy ve ark. (161), ELISA yöntemi ile yetişkin atlarda virulent *R.equi*'nin seroprevalansını araştırmışlardır. 2011 yılında 144 attan ve 2014 yılında 293 attan kan örnekleri toplanmış ve sırasıyla 2011 yılı için %7,6 oranında pozitiflik bulunurken, 2014 yılı için bu oran %5,1 olarak bildirilmiştir.

Türkiye'de *R.equi* üzerine yapılan çalışmalar bakterinin varlığını ortaya koyma üzerinedir. Dünya genelinde araştırmacılar özellikle son yıllarda

R.equi'nin prevalansı ile birlikte moleküler epidemiyoloji tabanlı çalışmalar yapmışlardır. Bakterinin bulaşma yolları üzerine yoğunlaşmışlar ve taylar için virülent suşların varlığı önem arz etmiştir.

3.11. Amaç

Bu çalışmada;

- Yarış atı yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Malatya, Şanlıurfa, Bursa, Eskişehir ve İzmit şehirlerinde bulunan kurumsal işletmelere bağlı haralar ve özel çiftliklerdeki taylardan alınan nazal ve fekal svaplar ile bu çiftliklerden toplanan toprak ve su örneklerinde *R.equi*'nin varlığının bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve hastalığın muhtemel risk faktörlerinin araştırılması,
- Elde edilen izolatlarda virülensten sorumlu *vapA* olarak adlandırılan genin varlığının PCR ile ortaya konulması,
- İzolatlar arasındaki genetik ilişkinin PFGE metodu ile belirlenmesi,
- İzolatların birtakım antibiyotiklere (ampisilin, vankomisin, eritromisin, rifampisin, klaritromisin, tetrasiklin, streptomisin ve gentamisin) karşı direnç/duyarlılık durumlarının saptanması amaçlandı.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. GEREÇ

4.1.1. Örneklerin Toplanması Kullanılan Malzemeler

Amies Transport Swab With Charcoal (Lp Italiana-İtalya)

Yarı katı ve besleyici özelliği olmayan amies besiyeri; bakterilerin enzimatik reaksiyonlarını önleyerek içeriğindeki kömür sayesinde zor üreyen bakterilerin analiz edilinceye kadar olan sürede canlılığını sürdürmesini sağlamaktadır. Nazal ve fekal örneklerin toplanması için kömürlü amies transport svap kullanıldı.

Etiketli Kaşıklı Numune Toplama Kabı (Lp Italiana-İtalya)

Toprak ve su örneklerinin alınması için 25ml, 25x80 mm ebatlarında vida kapaklı aseptik, kaşıklı numune toplama kapları kullanıldı.

4.1.2. Kültür Aşamasında Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

Nalidiksik asit-novobiosin-sikloheksimid-potasyum tellürit (NANAT) Besiyeri

Rhodococcus equi'nin fekal, nazal svap, toprak ve su örneklerinden ilk izolasyonunda Muscatello ve ark. (90), bildirdikleri yönteme göre hazırlanan selektif NANAT besiyeri kullanıldı. Besiyeri aşağıda belirtilen maddelerden hazırlandı.

Trypton Soy Agar (Tryptone Soya Agar), (Oxoid, İngiltere)

Bileşimi	g/litre
Pancreatic digest of casein	15,0
Enzymatic digest of soya bean	5,0
Sodium chloride	5,0
Agar	15,0

39,2 g Trypton Soy Agar (Oxoid CM0131) 980ml distile su içerisinde eritilip, 121 °C’ de 15-20 dakika otoklavda tutularak steril edildikten sonra besi yeri 45 °C’ ye kadar soğutulup aşağıdaki maddeler belirtilen miktarlarda hazırlandıktan sonra besiyerine ilave edildi.

Supplement	g/litre
Nalidiksik Asit (Nalidixic Acid) (Sigma-Aldrich İtalya)	0,02g
Novobiosin (Novobiocin Sodium Salt) (Sigma-Aldrich ABD)	0,025g
Siklohekzimid (Cycloheximide) (Sigma-Aldrich Çin)	0,04g

Belirtilen miktarlarda malzemeler tartıldıktan sonra karışım steril distile su ile 10ml’ye tamamlandı ve aseptik olarak besiyerine ilave edildi

Supplement	g/litre
Potasyum Tellürit (Potassium Tellurite) (Sigma-Aldrich, Japonya)	0,05 g

0,05g Potasyum tellürit tartılarak üzeri steril distile su ile 100ml’ye tamamlandı. Bunun 10 ml’si hazırlanan temel besiyerine aseptik olarak ilave edildi. Besiyeri petri kutularına döküldü ve sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.

Kanlı Agar (Blood Agar Base No 2), (Oxoid, İngiltere)

İzolatların saflaştırılması ve izolasyon sonrası aşamalar için kullanılmak üzere kanlı agar hazırlandı.

Bileşimi	g/litre
Proteose peptone	15,0
Liver digest	2,5
Yeast extract	5,0
Sodium chloride	5,0
Agar	12,0

40 g kanlı agar (Oxoid CM0271) 1000 ml distile su içerisinde eritilip, otoklavda 121 °C’ de 15-20 dakika tutularak steril edildi. Besiyeri 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 5-7 steril koyun kanı ilave edildi. Besiyeri petri kutularına dökülüp sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.

4.1.3. DNA İzolasyonu ve PCR Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar

TNES Buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0,2 Sodyum Dodesil Sülfat-SDS)

Bileşimi	g
Tris	0,49
NaCl	1,75
EDTA	0,75
SDS	0,4

Belirtilen kimyasallar tartılarak 200ml distile su ile hazırlandı. Otoklavlanıp steril edildi ve kullanılmak üzere buzdolabında bekletildi.

Proteinase K Solüsyonu (20mg/ml, Finnzymes Oy Espoo Finland)

20mg/ml' lik sıvı proteinase K solüsyonu hazır olarak ilgili firmadan temin edildi.

Fenol- kloroform- izoamilalkol (25:24:1)

Hazır olarak Amresco (Ohio, A.B.D) firmasından temin edildi.

10X PCR Buffer (MBI Fermentas, Litvanya)

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C), 200 mM (NH₄)₂SO₄ ve % 0,1 Tween 20 Fermentas firmasından temin edildi.

MgCl₂ (MBI Fermentas, Litvanya)

25 mM MgCl₂ hazır olarak Fermentas firmasından temin edildi.

dNTP Mix (10mM) (Fermentas, Litvanya)

Fermentas firmasından temin edilen 10mM' lık dNTP Mix, 1/8 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Taq DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas, Litvanya)

Her PCR numunesi için 1,25 U olacak şekilde kullanıldı.

Primerler (Sentegen)

Bu çalışmada kullanılan primerler Sentegen firmasına sentezletildi. Stok olarak üretici firmanın tarifine göre steril distile su ile hazırlanan primerler 1/5 (20 pmol) oranında sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

4.1.4. Elektroforez İçin Kullanılan Malzemeler

Agarose LE, (Promega, Madison, ABD)

1X TBE çözeltisi ile %1,5 oranında hazırlandı. Kaynar su banyosunda eritildikten sonra elektroforez kasetine döküldü.

5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu

Bileşimi	g
Tris	54,4
Borik Asit	27,2
EDTA	4,6

Belirtilen kimyasallar tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak, pH 8,3'e ayarlandı. Hazırlanan stok TBE tamponu elektroforez işlemi sırasında 1/5 oranında sulandırılarak kullanıldı.

100 bp DNA Ladder (50 µg/100 µl; MBI Fermentas, Litvanya)

Elektroforez sonucunda oluşan bantların büyüklüklerini belirlemek için 1/6 oranında sulandırılarak kullanıldı. Kullanılncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

6X Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (MBI Fermentas, Litvanya)

Elektroforez sırasında DNA amplikonlarının agaroz jel boyunca ilerlemesini izlemek amacıyla 1/6 oranında sulandırılarak kullanıldı. Kullanılincaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt, Almanya)

Ethidium bromide solüsyonu 0,5 µg/ml oranında sulandırılarak kullanıldı.

4.1.5. PFGE Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar

Hücre Süspansiyon Tamponu (1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH: 7,5)

1 M NaCl	11,68 g
10 mM Tris-HCl	0,31 g

Belirtilen kimyasallar steril ultra saf su (SUSS) ile hazırlandı. pH:7,5’a ayarlandıktan sonra hacim 200ml’ye tamamlandı. Kullanılmak üzere +4 °C ‘de muhafaza edildi.

Hücre Parçalama Tamponu-1 (100mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,5mM NaCl (pH: 8.0), %20 sucrose, 5mg/ml Lizozim, %10 N- Lourylsarcosine)

100mM Tris-HCl	3,152g
10mM EDTA	0,74g
0,5mM NaCl	0,058g

Belirtilen kimyasallar sucrose, lizozim ve N- Lourylsarcosine haricinde SUSS ile hazırlandı. pH:8,0’e ayarlandıktan sonra hacim 200ml’ye tamamlandı. Tampon solüsyon, kullanılmak üzere +4 °C ‘de muhafaza edildi. Sucrose, lizozim

ve N- Lourylsarcosine hesaplamaları her numune için ayrı ayrı yapılarak karışıma eklendi.

Hücre Parçalama Tamponu-2 (0,5M EDTA, %1 N-Lourylsarcosine (pH:9,2), 1mg/ml proteinase-K)

0,5 M EDTA	46,53 g
%1 N-Lourylsarcosine	2,5 g
Sodyum Hidrooksit	6 g

Belirtilen kimyasallar proteinase-K haricinde SUSS ile hazırlandı. Önce EDTA ve Sodyum Hydroxide karıştırılarak EDTA'nın çözünmesi sağlandı. En son %1 N-Lourylsarcosine eklendi. pH 9,2'ye ayarlandıktan sonra hacim 250ml olacak şekilde ayarlandı. Tampon solüsyon, kullanılmak üzere +4 ° C 'de muhafaza edildi. Proteinase-K hesaplaması her numune için ayrı ayrı yapılarak karışıma eklendi.

Tris-EDTA solüsyonu (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH: 8,0)

10 mM Tris-HCL	0,79 g
1 mM EDTA	0,19 g

Yukarıda bileşimi verilen maddeler tartılıp pH: 8,0'a ayarlanıp SUSS ile 500ml'ye tamamlandı. Tampon solüsyon, kullanılmak üzere +4 °C 'de muhafaza edildi.

SeaKem Low Melting Gold Agarose (Lonza, Rockland, USA)

Belirtilen düşük ısılı erime agarozu, hücre süspansiyon tamponu ile %1,2 oranında tartılıp mikrodalga fırında kaynatılmadan eritildi. Kuru ısı bloğunda bekleyen bakteri süspansiyonu ile eşit hacimde olacak şekilde ependorflara dağıtıldı.

***VspI* (AseI) RE enzimi (Thermo Scientific, 10 U/μl, 5000 U)**

Her agaroz kalıbı için 15 U *VspI* enzimi kullanıldı. 37 °C’de 24 saat enzim inkübasyonu yapıldı.

Pulsed-Field Certified Agarose (Bio-Rad Laboratories)

0,5 X TBE çözeltisi ile %1,5 oranında hazırlandı. Kaynar su banyosunda eritildikten sonra elektroforez kasetine döküldü.

4.1.6. Antibiyogram Aşamasında Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Besiyerleri

Kullanılan Antibiyotik Diskleri

- Ampicillin Antibiyotik Diski (10μg) (Oxoid, İngiltere CT0003B)
- Clarithromycin Antibiyotik Diski (15μg) (Oxoid, İngiltere CT0693B)
- Erythromycin Antibiyotik Diski (15μg) (Oxoid, İngiltere CT0020B)
- Gentamicin Antibiyotik Diski (30μg) (Oxoid, İngiltere CT0072B)
- Rifampicin Antibiyotik Diski (30 μg) (Oxoid, İngiltere CT0104B)
- Streptomycin Antibiyotik Diski (25μg) (Oxoid, İngiltere CT0048B)
- Tetracycline Antibiyotik Diski (30 μg) (Oxoid, İngiltere CT0054B)
- Vancomycin Antibiyotik Diski (30μg) (Oxoid, İngiltere CT0058B)

Mueller-Hinton Agar (Oxoid, İngiltere)

Bileşimi	g/litre
Meat infusion	2,0
Casein hydrolysate	17,5
Starch	1,5
Agar	17,0

38 g müller hinton agar (Oxoid CM0337) 1000 ml distile su içerisinde eritilip, otoklavda 121 °C’ de 15-20 dakika steril edildi. Besiyeri 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine %5-7 steril koyun kanı ilave edildi. Besiyeri petri kutularına döküldü ve sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.

4.2. Yöntem

4.2.1. Çalışma Alanları ve Örneklem

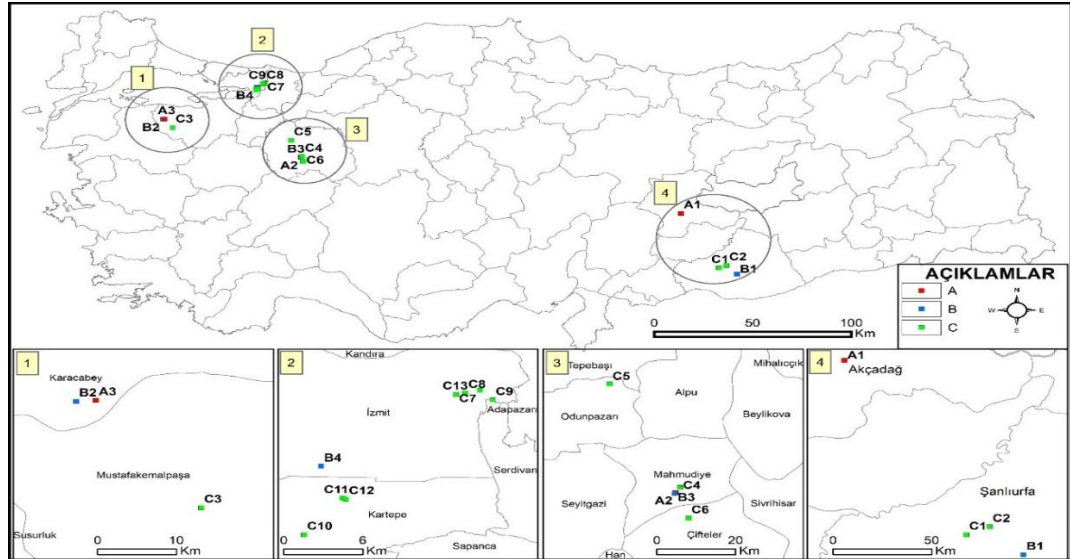
Çalışma alanı olarak özellikle at yetiştiriciliğinin yapıldığı Malatya Bursa İzmit Eskişehir ve Şanlıurfa illeri belirlendi. 2017 Nisan-Mayıs aylarında bu illere gidilerek izin alınan haralardaki taylardan nazal ve fekal örnekler toplandı. Bunun yanında tayların zaman geçirdiği padoklardan toprak ve su örnekleri alındı.

Tayların doğum sezonu her yıl Ocak-Haziran ayları arasında olmaktadır. Özellikle Nisan-Mayıs ayları tayların 1-4 aylık yaşlarda olduğu zamanlar olmakla birlikte doğumların da büyük bir kısmının gerçekleşmiş olduğu aylardır. Yetiştiriciler için özellikle *R. equi* pnömonileri açısından oldukça kritik bir zaman aralığı olduğundan dolayı örnekler bu dönemde toplandı.

Çalışmada incelenecek minimum örnek sayısı Epi info programında %95 güven aralığında tahmini prevalans %20 ve hata payı %5 kriteri temel alınarak

384 olarak hesaplandı. Sonuçların güvenilirliğini artırmak amacıyla çalışmada kullanılan fekal ve nazal svap örnekleri toplam 428 hayvandan toplandı. Çalışma popülasyonunu; sağlıklı görünen taylar, klinik olarak şüpheli taylar ve şüpheli tayların anneleri oluşturdu.

Örnekler 7'si kurumsal ve 13'ü özel olmak üzere toplam 20 farklı haradan temin edildi. A harfiyle kodlanan kurumsal işletmeye ait üç pansiyon haradan sadece nazal ve fekal svap örneklerin toplanmasına izin verildi. Buna karşın B harfiyle kodlanan kurumsal işletmeye ait dört pansiyon haradan svap örneklerine ilaveten toprak ve su örnekleri toplanmasına yasal izin verildi. Kurumsal işletmeler dışında kalan ve şahıslara ait 13 hara ile ilgili olarak gerek belirlenen örneklerin toplanması gerekse hara koşulları hakkında bilgi toplanması konusunda bir engel ile karşılaşılmadı. Örneklerin toplandığı haraların coğrafik konumu Şekil 3'te ve bu haraların illere göre dağılımı Tablo 3'te verilmiştir.



Şekil 3: Örneklerin toplandığı çalışma alanları ve haraların konumları.

Tablo 3: Örnek alınan haraların illere göre dağılımı.

A1		MALATYA
A2	KURUMSAL İŞLETME	ESKİŞEHİR
A3		BURSA
B1		URFA
B2	KURUMSAL İŞLETME	BURSA
B3		ESKİŞEHİR
B4		İZMİT
C1		URFA
C2		URFA
C3		BURSA
C4		ESKİŞEHİR
C5		ESKİŞEHİR
C6		ESKİŞEHİR
C7	ÖZEL ÇİFTLİKLER	İZMİT
C8		İZMİT
C9		İZMİT
C10		İZMİT
C11		İZMİT
C12		İZMİT
C13		İZMİT

4.2.2. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada 2017 Nisan-Mayıs aylarında Malatya, Şanlıurfa, Eskişehir, İzmit ve Bursa illerinde at yetiştiriciliği yapılan toplam 20 farklı harada bulunan 428 hayvandan hem nazal hem fekal svap örnekleri toplandı (Tablo 4). Örnek popülasyonu seçilirken özellikle anneleriyle birlikte bulunan taylar tercih edildi (Şekil 4). Dış bakıdan genel durum bozukluğu bulunan tayların annelerinden de örnekler alındı. Sağlıklı görünüşte ve klinik olarak şüpheli taylar ile annelerinden alınan svap örneklerinin çiftlik ve illere göre dağılımı Tablo 5’te verilmiştir.

Örneklerin sağlıklı bir şekilde alınabilmesi için hayvanlar kulak ve kuyruk bölgesinden tutularak veya yavaşça ile hareketsiz hale getirildi. Daha sonra steril svaplar ile hayvanların nazal boşluğundan ve rektumdan sürüntü alındı (Şekil 5). Kömürlü besiyeri içeren svaplar; strafolar içerisinde buz aküleri ile birlikte Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderildi ve izolasyon için kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Svap örneklerine ilaveten 17 haradan toprak ve su örnekleri steril kaplara toplandı. Toprak örnekleri için taylı kısırakların en çok zaman geçirdiği padoklar tercih edildi ve padokların birkaç bölgesinden rasgele toplandı (Şekil 6). Su örnekleri ise padoklarda bulunan suluklardan temin edildi. Aynı şekilde bu örnekler de buz aküleriyle birlikte strafolar içerisinde Anabilim dalımıza gönderilerek kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edildi. A işletmesine bağlı üç haradan izin alınamadığı için toprak ve su örnekleri toplanamadı.

Ayrıca 17 harada görev yapan veteriner hekim veya yetiştiricilere işletme yönetim koşulları ve tayların bakımları konusunda birtakım soruları içeren mini bir anket uygulandı. (Tablo 6).

Tablo 4: Alınan örneklerin ve hayvan sayılarının illere göre dağılımı.

	Hara Sayısı	Hayvan Sayısı	Nazal Swap	Fekal Swap	Toplam Örnek
Malatya	1	25	25	25	50
Şanlıurfa	3	48	48	48	96
Bursa	3	99	99	99	198
Eskişehir	5	143	143	143	286
İzmit	8	113	113	113	226
Toplam	20	428	428	428	856



Şekil 4: Ziyaret edilen haralardaki, taylı kısrakların bulunduğu ahırlardan bir görüntü.(Orijinal)



Şekil 5: Tayların nazal boşluğundan örnek alınırken çekilmiş bir görüntü (Orijinal)



Şekil 6: Toprak örneklerinin alındığı padokların görüntüsü (Orijinal).

Tablo 5: Örnek alınan hayvan sayılarının illere ve çiftliklere göre dağılımı.

İl/Çiftlik	Sağlıklı Tay	Şüpheli Tay	Anne	Toplam Hayvan
MALATYA	21	2	2	25
A1	21	2	2	25
ŞANLIURFA	40	4	4	48
B1	21	2	2	25
C1	3	1	1	5
C2	16	1	1	18
BURSA	89	5	5	99
A3	36	2	2	40
B2	36	2	2	40
C3	17	1	1	19
ESKİŞEHİR	125	9	9	143
A2	42	7	7	56
B3	58	1	1	60
C4	5	-	-	5
C5	5	-	-	5
C6	15	1	1	17
İZMİT	81	16	16	113
B4	50	12	12	74
C7	2	-	-	2
C8	4	-	-	4
C9	4	3	3	10
C10	2	-	-	2
C11	14	1	1	16
C12	2	-	-	2
C13	3	-	-	3
TOPLAM	356	36	36	428

(A1-A3), (B1-B4) : Kurumsal İşletmelere Bağlı Haralar

(C1-C13) : Özel yetiştiricilik yapan haralar

Tablo 6: Çiftlik koşulları ile ilgili bilgi formu.

-
1. Daha önceden haradaki hayvanlar arasında *R.equi* enfeksiyonu geçiren oldu mu?
 2. Yetiştiriciliğini yaptığınız ırk hangisidir?
 3. Hiperimmün plazma uygulaması yapılıyor mu?
 4. Hayvanlar pansiyon mu yoksa kendi hayvanınız mı?
 5. Enfeksiyonlu hayvanları ayrı bir yere alıyor musunuz?
 6. Tayların tamamına hiperimmün plazma uygulaması yapılıyor mu?
 7. Çiftlikte karışık yetiştirme var mı?
 8. Altlık olarak ne kullanılıyor?
 9. Sanitasyon için ne kullanılıyor?
 10. Enfeksiyondan ölen tay var mı?
 11. Altlıklar haftada kaç kez değiştiriliyor?
 12. Antibiyotik tedavisi ortalama kaç gün sürüyor?
 13. Ölen tayların daha önceki yavruları enfeksiyona yakalanmış mıydı?
 14. Ortalama olarak padokların mekanik temizliği yılda kaç kez yapılıyor?
 15. Dezenfeksiyon senede kaç kere yapılıyor?
 16. Hayvanlara yem olarak ne veriyorsunuz?
-

4.2.3. *Rhodococcus equi*'nin Kültür Yöntemiyle İzolasyon ve İdentifikasyonu

Standart Suşlar

Selektif besiyerindeki optimizasyon için ilgili firmadan temin edilmiş referans liyofilize ATCC 6939 ve ATCC 33701 suşları ile daha önce Anabilim dalımızda 2004 yılında Sultansuyu Tarım İşletmesinde ölen bir taydan izole edilen ve -20 °C'de muhafaza edilmiş bir saha suşu kullanıldı.

Nazal ve Fekal Svaplar

Anabilim dalımız laboratuvarında -20 °C’ de muhafaza edilen nazal ve fekal svaplar çözdürüldü ve direkt olarak NANAT selektif besiyerine ekildi. Petriler 37 °C ‘de, aerobik ortamda 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Oluşan rutubet kokulu gri, birleşmeye meyilli, parlak ve mukoid koloniler şüpheli olarak alınıp daha sonra identifikasyonda kullanmak amacı ile saklandı.

Toprak ve Su Örnekleri

Toprak numunelerinden etken izolasyonu Takai ve ark. (1991)’nın (97) protokolüne göre yapıldı. Kısaca 1 g toprak numunesi üzerine 10ml steril fizyolojik tuzlu su (%0,9’luk NaCl) ilave edilerek sulandırıldı. Karışım 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvıdan 100 mikrolitre alınarak direkt NANAT besi yerine ekim yapıldı. Su numunelerinden ise direkt 100 mikrolitre alınarak NANAT besi yerine ekildi. Besi yerleri hem 30 °C’de hem de 37 °C’de aerobik ortamda 48-72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Meydana gelen rutubet kokulu gri, birleşmeye meyilli, parlak ve mukoid koloniler şüpheli olarak değerlendirilip identifikasyonda kullanmak amacı ile -20 °C’de saklandı.

NANAT selektif besiyerinde üreyen tipik kolonilerden en az iki koloni alınarak %5 koyun kanı içeren kanlı agara (Oxoid 500 gr) ekim yapıldı. Koloniler saflaştırılarak 37°C’de aerobik ortamda 24-48 saatlik inkübasyona bırakıldı ve meydana gelen somon rengi, mukoid kolonilere Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri uygulandı. Test sonuçlarına göre *R.equi* olarak tanımlanan izolatlar moleküler aşamalarda kullanılmak üzere % 20 gliserol içeren Nutrient Broth besiyerine aktarılıp -20 °C’de muhafaza edildi.

4.2.4. Kùltür Yöntemiyle Elde Edilen *Rhodococcus equi* İzolatlarının PCR ile Doğrulanması ve *vapA* geninin Tespiti

Bu çalışmada *R.equi*'nin 16S rRNA ve *vapA* geninin tespiti için referans ATCC 33701 ve ATCC 6939 suşu ile diğer saha suşları pozitif kontrol olarak kullanıldı.

4.2.4.1. DNA İzolasyonu

Kùltür ve biyokimyasal yöntemlerle *R.equi* olarak tanımlanan izolatlardan DNA ekstraksiyonu için klasik fenol/kloroform ekstraksiyon prosedürü uygulandı. -20 °C'de muhafaza edilen *R.equi* şüpheli izolatlar çözdürölerek %5 koyun kanı içeren kanlı agara ekildi. 37°C'de aerobik ortamda 24-48 saatlik inkübasyon yapıldı. Üreyen kolonilere sırasıyla şu işlemler uygulandı.

1. Üreyen kolonilerden çok az miktarda alınarak (birkaç koloni) steril distile su ile 1,5 ml'lik steril ependorf tüplerinde 300 µl hacminde bakteri süspansiyonu hazırlandı.
2. Her bir ependorf tüpü için, 15ml'lik steril flakonda 300 µl TNES buffer (20 mM Tris- HCl pH: 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0.2 SDS) ve 6 µl proteinase K (Finnzymes 20 mg/ml) karışımı hazırlandı ve bakteri süspansiyonu yapılan ependorflara eşit oranda dağıtıldı.
3. Süspansiyon vortekslenerek 56 °C'de 2 saat su banyosunda inkübasyona maruz bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası proteinase-K inaktivasyonu için 10 dk. kaynatma işlemi gerçekleştirildi.

5. Kaynatma işleminin ardından süspansiyona 400 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edilip strafor üzerine yerleştirilerek dikkatli bir şekilde elle 5 dakika iyice çalkalandı.
6. Çalkalamanın ardından 11,600 g'de 10 dk süreyle santrifüj aşaması gerçekleştirildi.
7. Santrifüj sonrası oluşan üst katmandan alt faza hiç dokunmadan aynı numaralar verilmiş başka ependorflara aktarıldı.
8. Alınan miktarın 2,5 katı kadar % 96'lık etanol (750 µl) ve 0,1 katı kadar da 3M sodyum asetat (30 µl) eklenerek, vortekslenip -20 °C'de bir gece bekletildi.
9. Süspansiyon 11,600 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen peletin üzerine sıra ile saf alkol ve %70 lik alkol ilave edilerek aynı şartlarda tekrar santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası alkol uzaklaştırıldı ve pelet kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelet 100 µl steril distile su ile sulandırılarak PCR'da hedef DNA olarak kullanıldı.

4.2.4.2. *R. equi* 16S rRNA Geni'nin PCR ile Amplifikasyonu

Tür düzeyinde identifikasyon için Bell ve ark. (100), tarafından bildirilen 16S rRNA genine spesifik 450bp uzunluğunda gen bölgesini amplifiye eden primerler kullanıldı (Tablo 7).

Toplam 25 µl'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına 2,5 µl 10X PCR buffer (750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂ SO₄, % 0,1 Tween- 20), 2,5 µl 25 mM MgCl₂, 1/8 oranında sulandırılmış 10 mM dNTP karışımından 2 µl ve

1,25 U (0,25 µl) Taq DNA polymerase enzimi (MBI, Fermentas) ilave edildi. PCR karışımına 1/5 oranında sulandırılmış 16S rRNA genine spesifik oligonükleotid primer çiftinin her birinden 1,25 µl ve 2,5 µl template DNA ilave edildi. PCR reaksiyonları Techne TC-512 gradient thermalcyclers (Techne, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda 94 °C’de 5 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklusu olacak şekilde 94 °C’de 30 saniye denatürasyon, 52 °C’de 30 saniye hibridizasyon ve 72 °C’de 1 dakika uzama basamakları olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C’de 10 dakika son uzama işlemi yapıldı.

Negatif bulunan örnekler DNA yoğunluğu nedeniyle hatalı negatiflik ihtimaline karşı 1/10 oranında sulandırılarak PCR işlemi tekrarlandı.

4.2.4.3 Virülensle ilişkili *vapA* Geni’nin PCR ile Amplifikasyonu

R. equi olarak doğrulanan izolatlarda virülensle ilişkili *vapA* geninin varlığını araştırmak amacıyla Haites ve ark. (162), tarafından bildirilen ve 563 bp uzunluğundaki bir bölgeyi hedefleyen bir çift spesifik primer (Tablo 7) ile kombine edilen PCR işlemi gerçekleştirildi. *vapA* geni spesifik PCR karışımı, yukarıda bildirilen yoğunluklarda hazırlandıktan sonra amplifikasyon işlemi; 94 °C’de 2 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 40 PCR siklusu olacak şekilde 94 °C’de 90 saniye denatürasyon, 57 °C’de 1 dakika hibridizasyon ve 72 °C’de 2 dakika uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C’de 10 dakika son uzama işlemi yapıldı.

Tablo 7: PCR analizlerinde kullanılan primer çiftleri.

Genler	Oligonükleotid Sekansı (5'-3')	Uzunluk	Literatür
		(bp)	
<i>16S rRNA</i>	GGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTC CGCAAGCTTGGGGTTGAGCCCCAA	450	(100)
<i>vapA</i>	GACTCTTCACAAGACGGT TAGGCGTTGTGCCAGCTA	563	(162)

4.2.4.4 Agaroza Jel Elektroforez

Amplifikasyon işleminden sonra hedef bölgeyi temsil eden büyüklükteki ampliconların varlığını görebilmek için elektroforez işlemi gerçekleştirildi. . Bu amaçla 1,5 g agaroz tartılarak üzerine 100 ml 1X TBE ilave edildi. Karışım, mikrodalga fırında iyice eritildi ve daha sonra oda sıcaklığında soğutuldu. Soğutulan jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü. Oda sıcaklığında 30 dk. bekletilerek jel kalıbının katılaşması sağlandı. Jel kalıbı elektroforez tankına yerleştirilerek taraklar çok dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Örneklerden 15 µl alınarak parafilm üzerindeki 1X TBE ile hazırlanmış 6 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı. Bu karışım 2. kuyucuktan itibaren açılan her kuyuya 21 µl olacak şekilde yüklendi. İlk kuyucuğa ise 100 bp DNA ladder yüklendi. Tankın güç kaynağı çalıştırılarak 110 voltta 1,5 saat akım verildi. Tanktan çıkarılan jel ethidium bromide (10

µg/ml) ile 25 dk süreyle boyandı ve UV transilluminatörde incelenerek sonuçlar jel görüntüleme sistemi ile kaydedildi.

Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321) kullanıldı. DNA ekstraksiyonu ve PCR işlemlerinin sağlıklı bir şekilde yürütüldüğünü kontrol etmek için *R.equi* ATCC 33701 ve ATCC 6939 referans suşları ile Anabilim dalımızda bulunan bir adet saha suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

4.2.5. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Profilleri

Moleküler yöntemlerle *R.equi* olarak doğrulanmış izolatların antibiyotiklere duyarlılıkları, Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) standartlarına uygun olarak yapıldı (163, 164).

Kanlı agarda üreyen saf *R.equi* izolatları steril % 0,9'luk serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland olacak şekilde dilue edildi. Steril eküvyon yardımıyla 4mm kalınlığındaki kanlı Müller Hilton agar besiyerine ekildi. Antibiyotik diskleri 2 cm aralıklarla yerleştirildi ve 37°C de 24-48 saat etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda sonuçlar okundu.

4.2.6. *Rhodococcus equi* İzolatlarının Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemiyle Genotiplendirilmesi

Malatya, Şanlıurfa, Bursa, Eskişehir ve İzmit illerinden elde edilen *vapA* geni pozitif bulunan saf *R. equi* izolatlarına PFGE yöntemi uygulandı. PFGE

analizi, Morton ve ark. (165) ile Witkowski ve ark. (116)'nın kullandığı metotlar modifiye edilerek gerçekleştirildi.

4.2.6.1. İzolatların Hazırlanması

Moleküler yöntemlerle *vapA* geni pozitif olarak tanımlanmış ve -20 °C'de kriyoviallerde saklanan bakteriler oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra kanlı agara ekimi yapılarak 37 °C'de aerobik ortamda 24-48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sırasıyla şu işlemler uygulandı:

1. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 5 ml Brain Heart Infusion Broth'a (BHI) süspansiyon edildi. Bakteri yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm'de 0.95 absorbans olacak şekilde ayarlandı.
2. Bakteri süspansiyonları bir gece boyunca 37 °C 'de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
3. Ertesi gün bakteri süspansiyonlarından 1ml alınarak numaralandırılmış ependorflara aktarıldı ve 16250g'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve peletin üzerine 1 ml soğuk hücre süspansiyon tamponu (HST) (1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH: 7.5) konularak 4 °C'de 16250g'de 10 dk santrifüj aşaması gerçekleştirildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı.
5. Son aşamada pelet, 100 µl soğuk HST ile sulandırıldı. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agarozda gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise buz aküsü üzerinde buzdolabında bekletildi.

4.2.6.2 İzolatların Agaroz Gömülmesi

HST içerisinde %1,2'lik düşük erime ısıları agaroz (SeaKem Gold Agarose) hazırlandı. 0,24g agaroz, 20ml HST ile karıştırıldı ve yavaşça karıştırılarak agarozun dağılması sağlandı. Balonun ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutuldu ve çıkarılarak hafifçe tekrar karıştırıldı. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı ve kaynatılmadan yavaş bir şekilde hazırlandı. Agaroz karışımından 100 µl ependorf tüplerine dağıtıldı ve 50°C' deki kuru ısı bloğunda bekletildi. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak, 50 °C'de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime ısıları agaroz bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına (10 mm x 5 mm x 1,5 mm, Bio Rad Laboratories) 100 µl dağıtıldı. Her örnek için ikişer kalıp alındı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletildi.

4.2.6.3 Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

Agaroz kalıplarının içerisindeki bakterilerin hücre duvarını parçalamak ve kromozomal DNA'yı kırmadan elde etmek için için lizis aşamaları gerçekleştirildi. Bu aşamalar Lizis 1 ve Lizis 2 aşaması olmak üzere farklı inkübasyonlarda farklı tampon çözeltiler ve enzimler kullanılarak yapıldı.

Lizis 1 Aşaması :

1. Lizis 1 solusyonu; Hücre parçalama tamponu-1 (HPT1) ile; çalışılan numune sayısına göre 50ml’lik steril flakonlarda %20 süktroz ve 5mg/ml Lizozim katılacak şekilde hazırlandı.

2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak 5ml’lik steril kapaklı tüplere dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Yerleştirmeden önce hazırladığımız Lizis 1 solusyonu her tüpe 1ml olacak şekilde çalışılacak numune sayısına göre ayarlandı.

On beş numune için; $15 \times 0,2 = 3$ g süktroz,

20mg/ml’lik stok lizozimden $15 \times 5 = 20 \times x$ $x = 3,75$ ml

HPT1 stok solüsyonundan $15 - 3,75 = 11,25$ ml alınıp karıştırılarak Lizis 1 solusyonu hazır hale getirildi.

3. Hazırlanan Lizis 1 solusyonu 1’er ml şeklinde tüplere dağıtıldı. Tüpler, 37°C’de çalkalamalı su banyosunda çalkalama devri yüksek olacak şekilde bekletildi.

4. Lizis 1 aşamasının ilk 24 saatinin bitiminde steril ultra saf su ile hazırlanmış %10’luk N-lauroylsarcosine’den her tüpe 110 µl katıldı ve 24 saat daha çalkalamalı su banyosunda çalkalama devri yüksek olacak şekilde bekletildi. Bu durumda lizis 1 aşaması 48 saatlik bir sürede tamamlandı.

Lizis 2 Aşaması :

1. HPT1 solusyonu dikkatlice aspire edildikten sonra, yerine 1 ml hücre parçalama tamponu II (HPT2) konuldu.
2. Hesaplamalar lizis 1 aşamasında belirtildiği gibi yapıldı.
3. Tüpler, çalkalamalı su banyosunda çalkalama devri yüksek olacak şekilde ve 50 °C’de 50-54 saat boyunca bekletildi.

4.2.6.4 Hücre Lizizinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkama

1. Dikkatlice HPT 2 solusyonu aspire edildi.
2. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50 °C’ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan 5 ml eklendi. Tüpler 50 °C’de çalkalamalı su banyosunda, çalkalama devri yüksek olacak şekilde 30 dakika bekletildi.
3. Su tamamen aspire edildikten sonra su ile yıkama işlemi iki defa daha aynı koşullarda 30’ar dakika olmak üzere tekrarlandı.
4. Üç kez steril ultra saf su ile yıkama işleminden sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C’de 30 dakika olmak üzere), 5 ml TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH: 8.0) tamponuyla yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

4.2.6.5 Agaroz Kalıpları İçindeki DNA’nın RE ile Kesilmesi

R. equi için etkinliği daha önce araştırılmış olan *AseI* (Thermo Scientific 5U/μl) enzimi kullanıldı.

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla 1/3 oranında kesildi.

2. Her agaroz kalıbı için hesaplanan 1 x 15U *AseI* enzimi; steril ultra saf su içine ilave edilerek, yıkanmış agaroz kalıba konulup, 37 °C’de 16 saat inkübe edildi.

3. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

10 µl 10X *AseI* tamponu (BSA içeren Buffer 0)

3 µl (15U) *AseI* enzimi

87 µl steril apirojen su veya steril ultra saf su

İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

4.2.6.6 Elektroforez Jelinin Hazırlaması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

0.5X TBE (44,5 mM Trisma base, 44,5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,0) içinde 100 ml olacak şekilde %1,5 luk agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı. 1,5 g “pulsed-field certified agarose” 200 ml’lik balon jojeye konuldu. Üzerine 100 ml 0,5 x TBE eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balon jojenin ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı ve tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon joje 45–50 °C’lik su banyosuna konuldu. Bu sırada agaroz dökülecek kaset hazırlandı ve sızdırmaması için etrafı bantlandı. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak

şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklendi. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50 °C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı. Sonra agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılıp, tabla üzerindeki agaroz; içerisinde 2000 ml 0.5 X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

4.2.6.7. Elektroforez

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları Witkowski ve ark. (116) protokolüne göre iki blok şeklinde gerçekleştirildi (Tablo 8).

Tablo 8: *R. equi* için CHEF DR II sistemi ile uygulanan elektroforez koşulları.

	Başlangıç Vuruş Süresi	Bitiş Vuruş Süresi	Vuruş Açısı	Akım	Sıcaklık	Süre
Blok -1	6 saniye	15 saniye	120°	6 V/cm ²	14 °C	7 saat
Blok -2	23 saniye	40 saniye	120°	6 V/cm ²	14 °C	15 saat
Toplam Süre						22 saat

4.2.6.8. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alındı ve 30 dakika boyandı.
2. UV ışığa altında görüntülendi.
3. Gel logic 2200 imaging system (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt altına alındı.
4. GelCompar II yazılım sistemi (version 3,0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin, dendogramı oluşturuldu. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında optimizasyon ve profil toleransı, %1 olarak alındı.

PFGE uygulamalarının bütün aşamaları İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji A.B.D’da gerçekleştirildi.

4.2.7. İstatistiksel Analizler

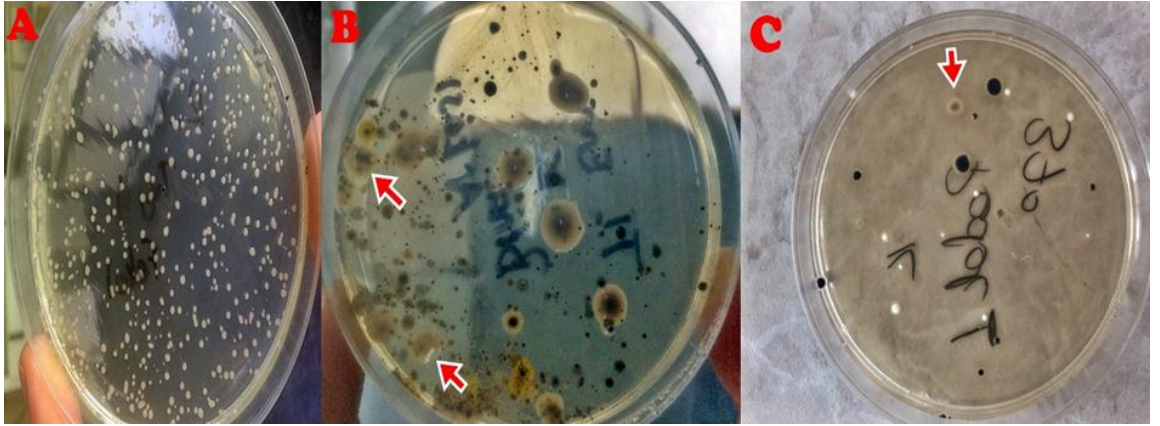
Verilerin değerlendirilmesinde SPPS istatistik paket programı (IBM SPSS Versiyon 22.0) kullanıldı. *R equi* pozitiflik durumu ve *vapA* geni bulunduran *R.equi* izolatlarının örneklere ve illere göre yüzde frekans dağılımları Ki kare testi ile değerlendirildi. Grupların ikili karşılaştırılmaları Pearson Ki-Kare ve Fisher’s

Exact testi kullanılarak yapıldı. Çiftliklerde uygulanan mini anket formundan elde edilen veriler arasındaki ilişki Sperman korelasyonu ile incelendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.

5.BULGULAR

5.1. *Rhodococcus equi*'nin İzolasyon Bulguları

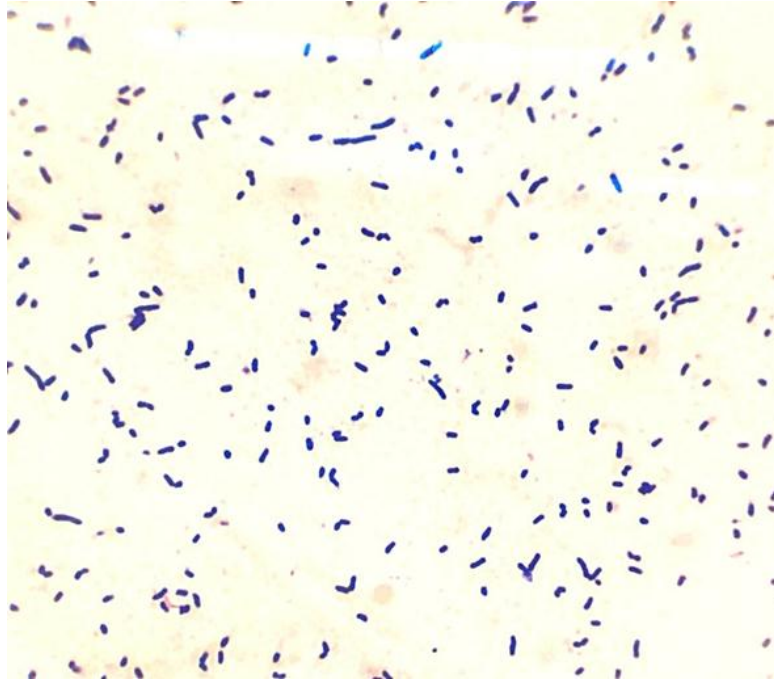
NANAT selektif besiyerinde 37 ° C' de 24-48 saat inkübasyona bırakılan nazal, fekal svaplar ile toprak ve su örneklerinden (n=890) 150 tanesinde gri, birleşmeye meyilli, parlak ve mukoid koloniler saflaştırılıp değerlendirmeye alındı (Şekil 7, Şekil 8). Gram boyama sonucu mikroskop sahasında görülen Gram pozitif kokobasil bakterilerin (Şekil 9, Şekil 10) katalaz testi pozitif oksidaz testleri negatif bulundu.



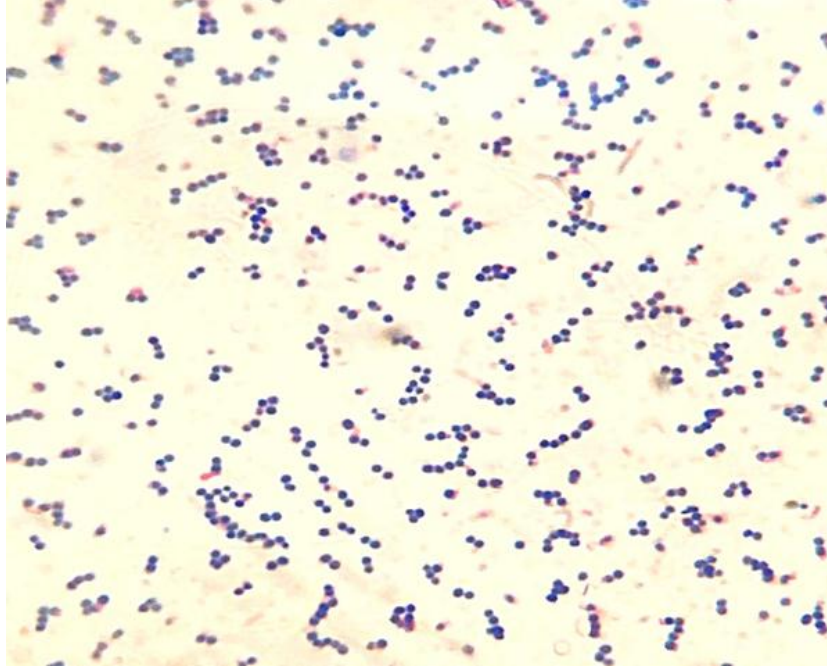
Şekil 7: (A) NANAT besiyerinde nazal svaptan üreyen saf *R.equi* kolonileri, (B-C) Toprak örneğinden izole edilmiş kontaminant bakteriler ve *R.equi* kolonileri(Orijinal)



Şekil 8: *R. equi*'nin kanlı agardaki koloni görüntüsü (Orijinal)



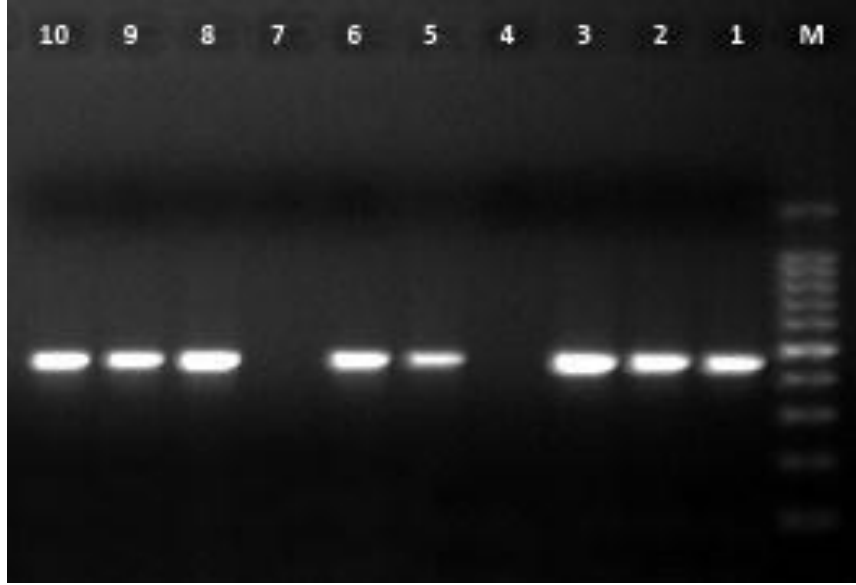
Şekil 9: *R. equi*'nin 24 saatlik kültüründen Gram boyama sonucu görülen kokobasil görüntüsü. (Orijinal)



Şekil 10: *R.equi*'nin 48 saatlik kültüründen Gram boyama sonucu görülen kok görüntüsü. (Orijinal)

5.2. 16S rRNA Geni PCR Amplifikasyon Bulguları

Kültür yöntemi ile belirlenen toplam 150 şüpheli izolattan ekstrakte edilen DNA örneklerinin 16S rRNA genine spesifik PCR ile analizi neticesinde 147'sinde *R. equi* göstergesi olarak kabul edilen 450 bp uzunluğunda amplifikasyon ürünleri elde edildi (Şekil 11). Böylece haralardan toplanan örneklerden elde edilen 147 izolat, *R. equi* olarak doğrulandı.



Şekil 11: Kültürlerden ekstrakte edilen DNA'ların *R. equi* 16S rRNA genine spesifik primerlerin kullanıldığı yapılan PCR ile analizi sonucunda oluşan 450 bp büyüklüğündeki ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA ladder (100 bp)

1: *R. equi* ATCC 6939 suşu (Avirü lent suş)

2: *R. equi* ATCC 33701 suşu (Virü lent suş)

3: *R. equi* izolatu (Anabilim dalımız kü ltür koleksiyonunda bulunan suş)

4: Negatif kontrol (Steril distile su)

5-10: Saha izolatları

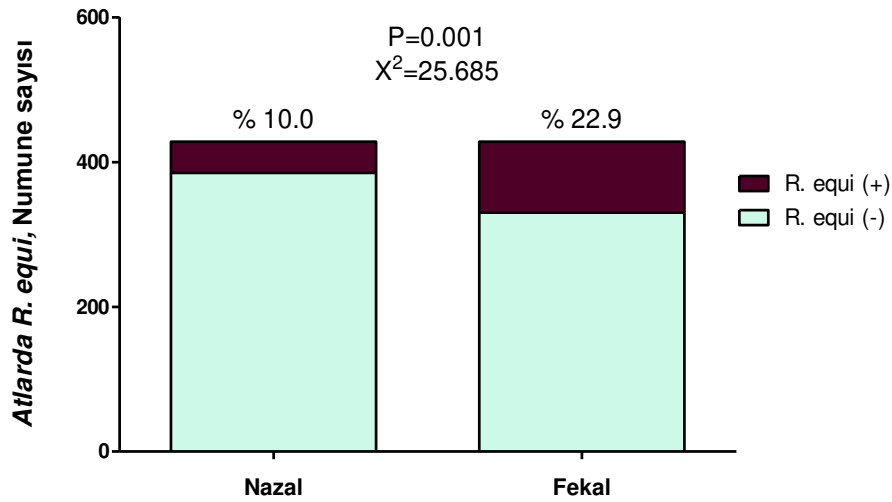
Konvansiyonel kü ltür ve PCR analizleri neticesinde elde edilen bulgular ö rnek türüne göre değ erlendirildiğ inde yirmi farklı haradan toplanan nazal ve fekal swap ö rneklerinin sı rasıyla %10 (43/428) ve %22,9 (98/428)'unda 17 farklı haraya ait padoklardan toplanan toprak ve su ö rneklerinin ise sı rasıyla %29,4 (5/17) ve %5,8 (1/17)'inde *R. equi* yön ünden pozitiflik saptandı. Nazal ve fekal swaplardan elde edilen pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 9) (Ş ekil 12). Pozitiflik oranları yerleş im yeri

bazında ele alındığında; en yüksek oranın % 26,4 (64/242) ile İzmit ilinden, buna karşılık en düşük oranın ise %9,4 (19/202) ile Bursa ilinden elde edildiği görüldü (Tablo 10). Bu oranlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 13).

Tablo 9: Nazal ve fekal örneklerin *R. equi* yönünden pozitiflik durumları.

	Örnek		--P--
	Nazal	Fekal	X^2
<i>R. equi</i> (+)	43/428	98/428	0.001
	(%10.0)	(%22.9)	$X^2=25.685$

Örnekler arası karşılaştırmalar Pearson Ki-Kare testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi ($P<0.05$) olarak kabul edildi.

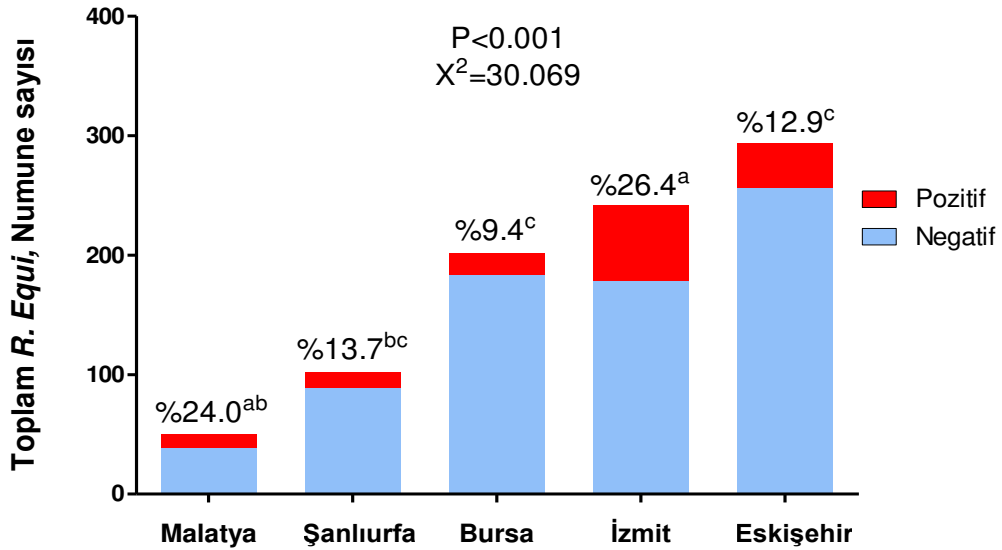


Şekil 12: Atlardan alınan nazal ve fekal örneklerde *R. equi* pozitiflik durumunun incelenmesi. Grupların ikili karşılaştırmaları Pearson Ki-Kare testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.

Tablo 10: Farklı illerde yetiştirilen atlardan ve haralardan alınan numunelerin *R. equi* yönünden pozitiflik durumu.

Numune	İller					--P--
	Malatya	Şanlıurfa	Bursa	İzmit	Eskişehir	X^2
Toprak	-	1/3 (%33.3)	2/2 (%100.0)	1/8 (%12.5)	1/4 (%25.0)	0.119 $X^2=5.110$
Su	-	1/3 (%33.3)	0/2 (0.0)	0/8 (0.0)	0/8 (0.0)	0.294 $X^2=4.213$
Fekal	8/25 (%32.0) ^{ab}	5/48 (%11.0) ^c	15/99 (%15.2) ^{bc}	42/113 (%37.2) ^a	28/143 (%19.6) ^{bc}	0.001 $X^2=22.699$
Nazal	4/25 (%16.0) ^a	7/48 (%14.6) ^a	2/99 (%2.0) ^b	21/133 (%18.6) ^a	9/143 (%6.3) ^a	0.001 $X^2=21.466$
Toplam	12/50 (%24.0) ^{ab}	14/102 (%13.7) ^{bc}	19/202 (%9.4) ^c	64/242 (%26.4) ^a	38/294 (%12.9) ^c	0.001 $X^2=30.069$

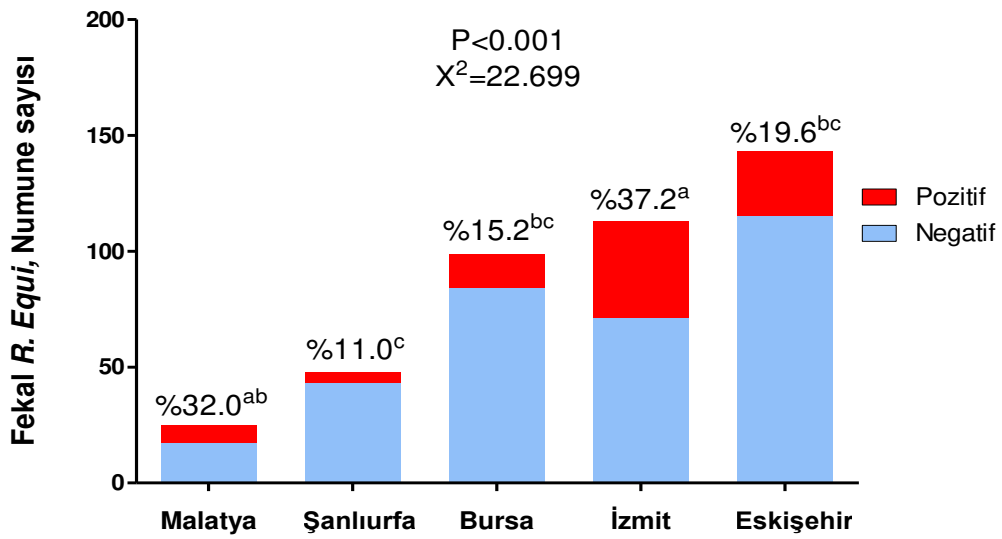
a,b,c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası fark istatistik olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırması Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.)



Şekil 13: Farklı illerde yetiştirilen atlardan alınan toplam numunelerin *R. equi* yönünden pozitiflik durumu. a,b,c: Sütunlarda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası

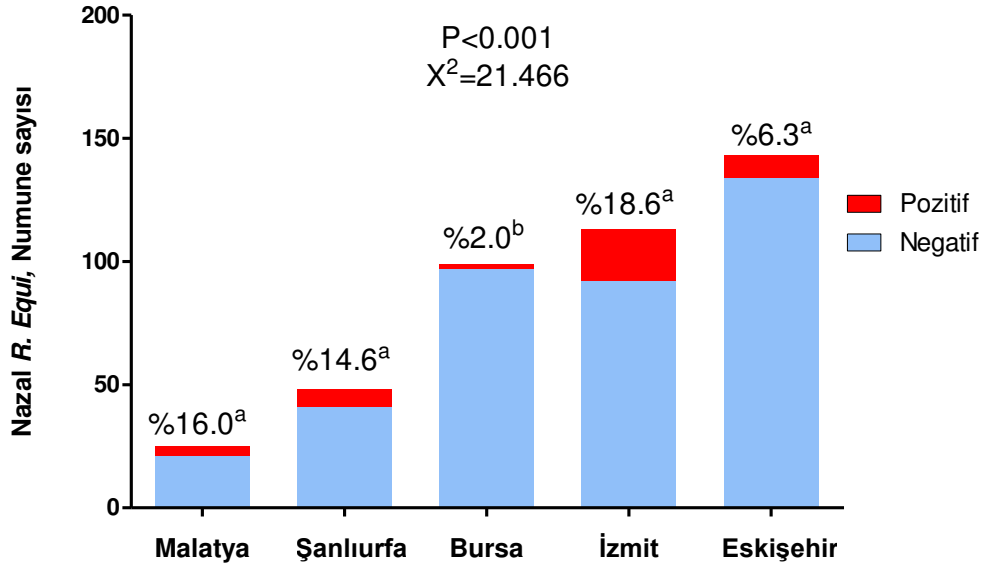
fark istatistiki olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırması Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.)

Fekal svap örneklerindeki pozitiflik oranlarının illere göre dağılımına bakıldığında; en yüksek oran %37,2 ile İzmit ilinde en düşük oran ise %11 ile Şanlıurfa ilinde tespit edildi (Tablo 10). Bu oranlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.001$) (Şekil 14).



Şekil 14: Farklı illerde yetiştirilen atlardan alınan fekal numunelerin *R. equi* yönünden pozitiflik durumu. a,b: Sütunlarda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası fark istatistiki olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırması Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.)

Nazal svap örneklerindeki pozitiflik oranlarının illere göre dağılımı ele alındığında; en yüksek oran %18,6 ile İzmit ilinde, en düşük oran ise %2 ile Bursa ilinde tespit edildi (Tablo10). Bu oranlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.001$), (Şekil 15).



Şekil 15: Farklı illerde yetiştirilen atlardan alınan nazal numunelerin *R. equi* yönünden pozitiflik durumu. a,b: Sütunlarda farklı harfi taşıyan yüzdelere farklı istatistiksel olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırması Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.)

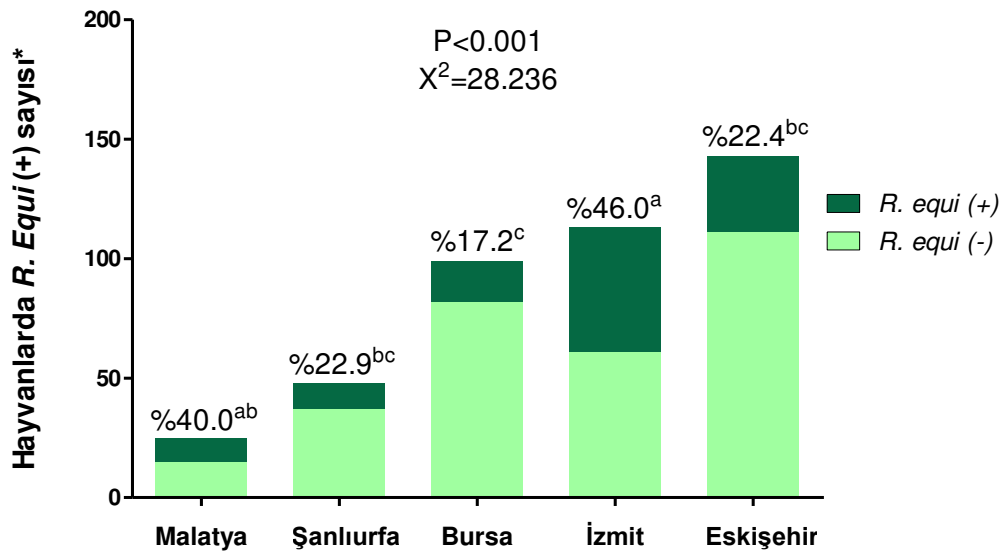
Çalışmada numune toplanan atların %28,5 (122/428)'inde nazal ve fekal svap örneklerinin en azından birinde *R. equi* yönünden pozitiflik saptandı. Hayvan bazında elde edilen pozitiflik oranlarının illere göre dağılımına bakıldığında; en yüksek oranın %46 (52/113) ile İzmit ilinde ve en düşük oranın ise %17,2 (17/99) ile Bursa ilinden elde edildiği görüldü (Tablo 11). Bu oranlar arasındaki farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.001$), (Şekil 16).

Tablo 11: *R. equi* pozitif bulunan hayvanların illere göre dağılımı.

	İller					--P--
	Malatya	Şanlıurfa	Bursa	İzmit	Eskişehir	X ²
Pozitif Hayvan Sayısı*	10/25	11/48	17/99	52/113	32/143	0.001
Pozitiflik Oranı	(40.0) ^{ab}	(22.9) ^{bc}	(17.2) ^c	(46.0) ^a	(22.4) ^{bc}	X ² =28.236

a,b,c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası fark istatistiki olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırılmaları Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi P<0.05 olarak kabul edildi.)

*Hayvanların nazal ve/veya fekal örneklerinden en az birinde *R. equi* tespit edilenler pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 16: Farklı illerde yetiştirilen atların *R. equi* yönünden pozitiflik durumu.

a,b,c: Sütunlarda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası fark istatistiki olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırması Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi P<0.05 olarak kabul edildi.)

*Hayvanların nazal ve/veya fekal örneklerinden en az birinde *R. equi* tespit edilenler pozitif olarak kabul edildi.

Çalışmamızda klinik olarak şüpheli bulunan tayların annelerinden de örnekler toplandı. Şüpheli görünümlü 36 tay ve annelerinden alınan nazal ve fekal svap örnekleri değerlendirildiğinde sadece yedi tay ve annelerinde pozitiflik saptandı. Buna karşılık *R. equi* tespit edilemeyen üç tayın annelerinden alınan örneklerde pozitiflik belirlendi. Anne ve yavrularındaki pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.182$) (Tablo 12).

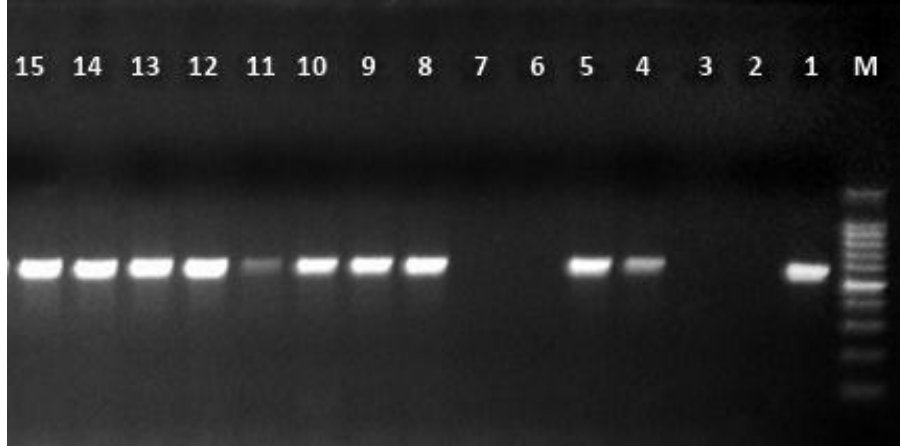
Tablo 12: Şüpheli taylardan ve annelerinden alınan nazal ve fekal numunelerin *R. equi* yönünden incelenmesi.

<i>R. equi</i>		Anne		Toplam	--P--
		+	-		X^2
Tay	+	7	12	19	0.182
	-	3	14	17	$X^2=1.648$
	Toplam	10	26	36	

Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.

5.3. *vapA* Geni PCR Amplifikasyon Bulguları

Elde edilen *R. equi* izolatlarında *vapA* geninin varlığını araştırmak amacıyla Muscatello ve ark. (1997) tarafından bildirilen bir çift spesifik primer kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi ve klinik ve çevresel örneklerden elde edilen 147 *R. equi* izolatının %46,2 (68/147)'si *vapA* geni yönünden pozitif bulundu (Şekil 17).



Şekil 17: PCR ile *R. equi* olduğu doğrulanan kültürlerden elde edilen DNA'ların *vapA* genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunda oluşan 563 bp büyüklüğündeki ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA ladder (100 bp)

1: *R. equi* ATCC 33701 suşu (Virü lent suş)

2: *R. equi* ATCC 6939 suşu (Avirü lent suş)

3: Negatif kontrol

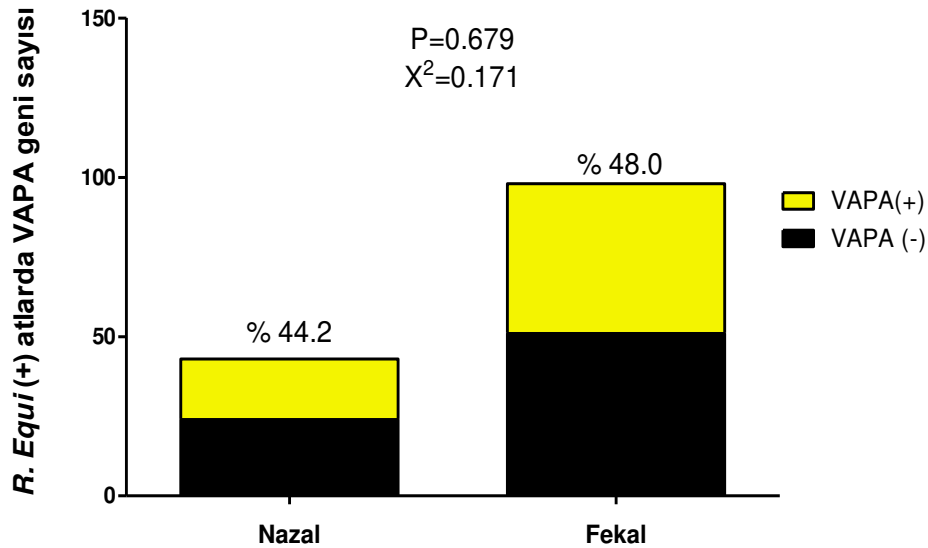
4-15: *R. equi* saha izolatları.

vapA geni yönünden pozitif bulunan 68 izolatın %27,9 (19/68)'u nazal svaplardan, %69,11 (47/68)'i fekal svaplardan ve %2,9 (2/68)'u ise toprak numunelerinden elde edildi. *R. equi* izole edilen 43 adet nazal swap örneğinin %44,2'sinde ve 98 adet fekal swap örneğinin %47'sinde *vapA* geni yönünden pozitiflik saptandı. Bu oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.679$) (Tablo 13) (Şekil 18).

Tablo 13: *R. equi* izole edilen nazal ve fekal örneklerde *vapA* geni yönünden pozitiflik durumu.

	Örnek		--P--
	Nazal	Fekal	X^2
<i>vapA</i> (+)	19/43	47/98	0.679
	(%44.2)	(%48.0)	$X^2=0.171$

Örnekler arası karşılaştırmalar Pearson Ki-Kare testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.



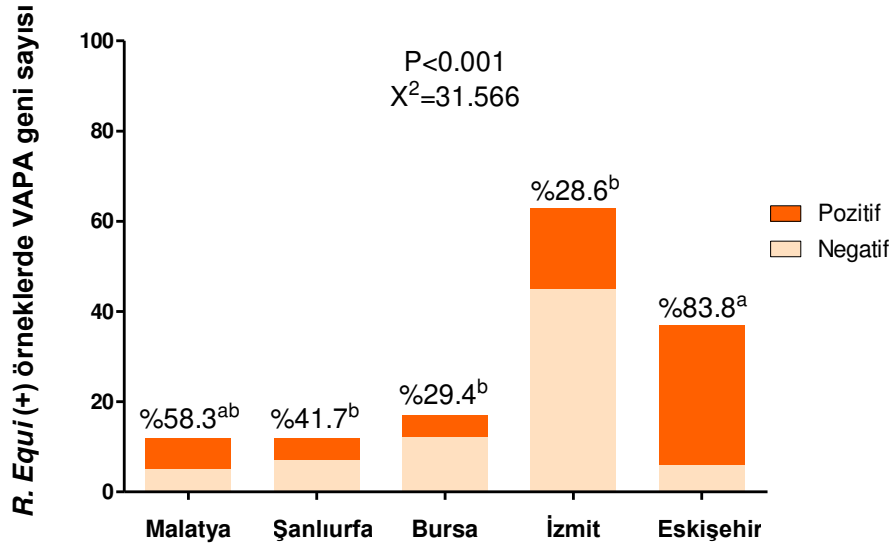
Şekil 18: Atlardan alınan nazal ve fekal örneklerde *R. equi* yönünden pozitiflik bulunan örneklerin *vapA* geni yönünden incelenmesi. (Grupların ikili karşılaştırmaları Pearson Ki-Kare testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.)

vapA geni bulunduran *R.equi* izolatlarının illere göre dağılımı incelendiğinde; en yüksek oranın %83,8 (31/37) ile Eskişehir, en düşük oranın ise %28,6 (18/63) ile İzmit ilinden elde edildiği görüldü iller arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p<0.001$) (Tablo 14) (Şekil 19).

Tablo 14: *R.equi* izolatlarında vapA geni pozitiflik durumunun illere göre dağılımı.

Numune	İller					--P--
	Malatya	Şanlıurfa	Bursa	İzmit	Eskişehir	X ²
Fekal Swap	5/8 (%62.5) ^{ab}	1/5 (%20.0) ^b	5/15 (%33.3) ^b	12/42 (28.6) ^b	24/28 (%85.7) ^a	0.001 X ² =26.581
Nazal Swap	2/4 (%50.0)	4/7 (%57.1)	0/2 (%0.0)	6/21 (%28.6)	7/9 (%77.8)	0.068 X ² =7.895
Toplam pozitiflik	7/12 (%58.3) ^{ab}	5/12 (%41.7) ^b	5/17 (%29.4) ^b	18/63 (%28.6) ^b	31/37 (%83.8) ^a	0.001 X ² =31.566
Pozitif Hayvan Sayısı*	6/10 (%60.0) ^{ab}	5/11 (%45.5) ^b	5/17 (%29.4) ^b	17/52 (%32.7) ^b	28/32 (%87.5) ^a	0.001 X ² =27.604

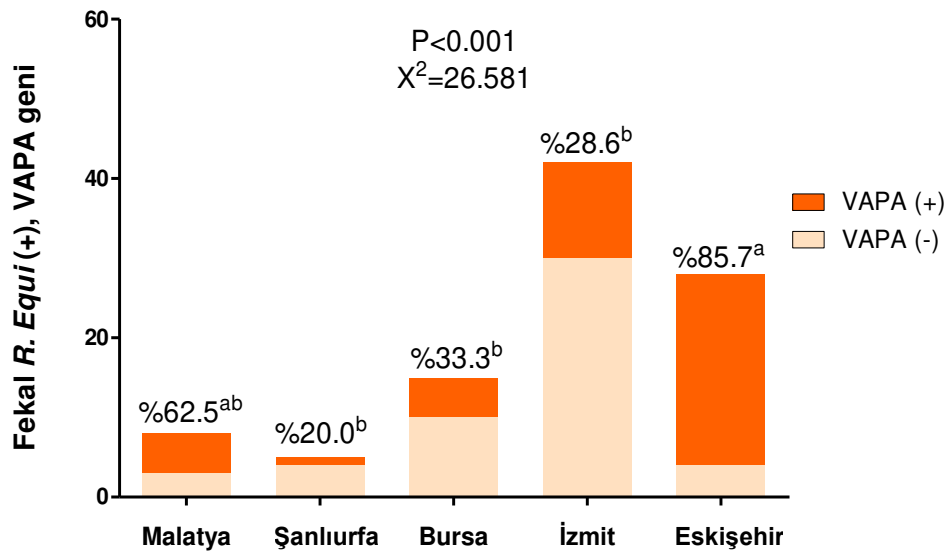
a,b,c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası fark istatistiki olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırılmaları Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi P<0.05 olarak kabul edildi.) * Hayvanların nazal ve/veya fekal örneklerinden en az birinde vapA geni tespit edilenler pozitif olarak kabul edildi.



Şekil 19: *R.equi* izolatlarında vapA geni pozitiflik durumunun illere göre dağılımı. a,b: Sütunlarda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası fark istatistiki olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırılmaları Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi P<0.05 olarak kabul edildi.)

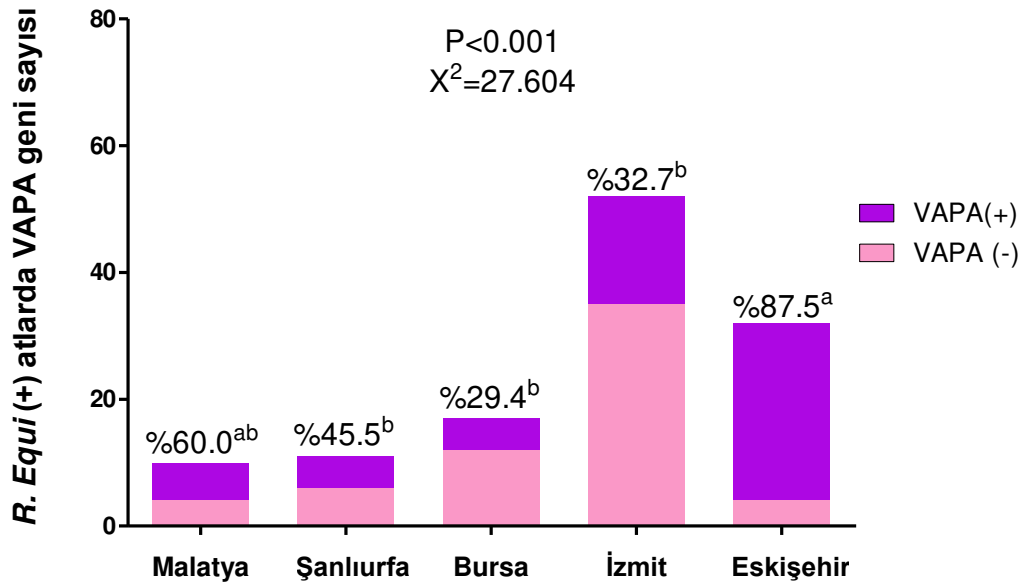
Nazal svap örneklerinden izole edilen *R. equi* suşlarının *vapA* geni yönünden pozitiflik oranları illere göre ele alındığında; en yüksek oran %77,8 (7/9) ile Eskişehir ilinde saptanırken, Bursa ilinde toplanan nazal svap örneklerinden *vapA* geni tespit edilemedi. İllerde *vapA* geni yönünden elde edilen pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.068$) (Tablo 14).

Fekal svap örneklerinden izole edilen *R. equi* suşlarının *vapA* geni yönünden pozitiflik oranlarının illere göre dağılımı incelendiğinde; en yüksek oranın %62,5 (5/8) ile Malatya ilinden, en düşük oranın ise %20 (1/5) ile Şanlıurfa ilinden elde edildiği görüldü. İllerde *vapA* geni yönünden elde edilen pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p<0.001$) (Şekil 20) (Tablo 14).



Şekil 20: Farklı illerde yetiştirilen atlarda *R. equi* yönünden pozitiflik bulunan fekal örneklerin *vapA* geni yönünden incelenmesi.. a,b: Sütunlarda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası fark istatistiki olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırılmaları Pearson Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.)

Çalışmada *R. equi* izolasyonu ve identifikasyonu yapılan atların %50 (61/122)’sinde izolatların *vapA* geni yönünden pozitif olduğu belirlendi. Hayvan bazında elde edilen *vapA* pozitiflik oranlarının illere göre dağılımına bakıldığında; en yüksek oranın %87,5 (28/32) ile Eskişehir ilinde ve en düşük oranın ise %29,4 (5/17) ile Bursa ilinden elde edildiği görüldü. Bu oranlar arasındaki farklılık, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$) (Şekil 21) (Tablo 14).



Şekil 21: Farklı illerde yetiştirilen *R. equi* yönünden pozitif bulunan hayvanların *vapA* geni yönünden incelenmesi. a,b,c: Sütunlarda farklı harfi taşıyan yüzdeler arası fark istatistiki olarak anlamlıdır. (Grupların ikili karşılaştırılmaları Pearson Ki-Kare ve Fisher’s Exact testi kullanılarak yapıldı; anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.) *Hayvanların nazal ve/veya fekal örneklerinden en az birinde *R. equi* tespit edilenler pozitif olarak kabul edildi.

5.4. Antibiyotik Duyarlılık Bulguları

Çalışma kapsamında elde edilen 147 *R. equi* izolatının %43,5 (64/147)'i test edilen bütün antibiyotiklere karşı duyarlı bulunurken %39,4 (58/147)'ü sadece tek bir antibiyotiğe karşı dirençli bulundu. Yalnızca bir tane antibiyotiğe dirençli bulunan izolatların oranı ampisilin için %34 (50/147), streptomisin için %3,4 (5/147) ve tetrasiklin için %0,7 (1/147) olarak belirlendi. İzolatların %3,4 (5/147)'ünün, ampisilin ve streptomisine karşı dirençli olduğu görüldü. Üç veya daha fazla antibiyotiğe birlikte direnç gösteren izolatların oranı % 2,72 (4/147) olarak saptandı. Bu izolatların ampisilin, eritromisin, rifampisin ve klaritromisine karşı dirençli olduğu tespit edildi. Elde edilen izolatların %10,8 (16/147)'i tetrasiklin ve klaritromisin dışında test edilen diğer antibiyotiklere karşı orta derecede duyarlıydı. Bu izolatların yedi tanesinin ampisiline, üç tanesinin rifampisine, ve birer tanesinin sırasıyla gentamisin ve vankomisine orta derecede duyarlı oldukları belirlendi. Geriye kalan dört izolatın ikisi streptomisin ve rifampisine orta derecede duyarlılık gösterirken, birer tanesi sırasıyla gentamisin ve eritromisine, streptomisin ve eritromisine orta derecede duyarlı olarak bulundu (Tablo 15).

Toplam dirençlilik oranları ampisilin için %45,5, gentamisin için %0,7, eritromisin ve klaritromisin için %2,7, streptomisin için %7,6 ve rifampisin için %3,4 olarak bulundu. Rifampisin dirençli bir suşa yapılan antibiyogram sonucu Şekil 22'de gösterilmiştir. Vankomisine karşı hiçbir suşun dirençli olmadığı görüldü. Orta derecede duyarlılık profillerine bakıldığında ampisilin için %4,9,

gentamisin için %1,3, vankomisin için %0,7, eritromisin için %1,3, streptomisin için %2,7 ve rifampisin için %3,4 oranları tespit edildi (Tablo 16).

Tablo 15: *R. equi* izolatlarının test edilen antibiyotiklere karşı direnç profilleri.

İzolat Sayısı	Test Edilen Tüm Antibiyotiklere Duyarlı Olan İzolatlar (%)	Yalnızca Bir Antibiyotiğe Dirençli Olan İzolatlar (%)	İki Antibiyotiğe Dirençli Olanlar (%)	Çoklu (≥3) direnç gösterenler	Orta Derecede Duyarlı Olanlar (%)
147	64 (43,5)	58 (39,4)	5 (3,4)	4 (2,72)	16 (10,8)

Tablo 16: *R. equi* izolatlarının test edilen antibiyotiklere duyarlılıkları.

Antibiyotikler	Çap (mm)	Duyarlı (%)	Orta Duyarlı (%)	Dirençli (%)
AMP	20-29*	73 (49,6)	7 (4,9)	67 (45,5)
CN	12-16*	144 (98)	2 (1,3)	1 (0,7)
VA	≥15**	146 (99,3)	1 (0,7)	0
E	13-23*	141 (96)	2 (1,3)	4 (2,7)
S	11-15*	132 (89,7)	4 (2,7)	11 (7,6)
RD	16-20*	137 (93,2)	5 (3,4)	5 (3,4)
CLR	13-23*	143 (97,3)	0	4 (2,7)
TE	14-19*	146 (99,3)	0	1 (0,7)

AMP= Ampisilin, CN= Gentamisin, VA= Vankomisin, E= Eritromisin, S= Streptomisin, RD= Rifampisin, CLR= Klaritromisin, TE= Tetrasiklin * CLSI (164), ** CLSI (163)



Şekil 22: Rifampisin dirençli bir *R. equi* izolatına uygulanan antibiyotik duyarlılık test sonucu.

5.5 *Rhodococcus equi* İzolatlarının PFGE Yöntemi ile Genotiplendirilmesi

Farklı illerden ve haralardan elde edilen ve *vapA* geni pozitif bulunan toplam 65 adet saf *R.equi* izolatı, izolatlar arası genetik ilişkinin ve genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla PFGE yöntemi ile tiplendirildi. *AseI*(*VspI*) enzimi ile kesilen *R.equi* saf izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü Şekil 23'te gösterilmiştir (Şekil 23). Yapılan dendogram analizi sonucunda "Dice" benzerlik katsayısı %95 olarak belirlendi. İncelenen 65 izolattan 29 farklı profil ve bu profilleri içinde bulunduran toplam 12 farklı küme saptandı. Buna göre suşların kümeleşme oranı %73,8 (48/65) olarak hesaplandı. İzolatların 17 (%26,1) tanesi spesifik PFGE profili gösterdi.

Kümeleşmede suş aralığının 2-8 arasında değiştiği tespit edildi. En büyük küme, sekiz izolat içeren genotip-13 kümesi olarak belirlendi. Bunu sırasıyla genotip-16 (6 izolat), genotip-11 (5 izolat) ve genotip-20 (5 izolat) takip etti. En küçük kümeler ise ikişer elemanlı genotip-10, genotip-12, genotip-17 ve genotip-27 olarak saptandı (Şekil 24).

5.5.1 Kümeler İçinde Yer Alan Suşların Epidemiyolojik İlişkileri

Birinci Küme (Genotip-11): Bu kümeyi oluşturan beş suşun dördü, Eskişehir'de A işletmesine bağlı haradan izole edildi. Bu dört suşun ikisi şüpheli olarak görülen taydan ve annesinden elde edilen fekal svap örneklerinden izole edildi. Yine bu kümede İzmit'teki B işletmesine bağlı haradan izole edilen bir adet suş yer aldı.

İkinci Küme (Genotip-10): Bu kümede biri nazal diğeri fekal örnekten izole edilen iki suş yer aldı. Bu suşlar İzmit bölgesine ait ve birbirine yakın mesafede yer alan iki farklı haradan elde edildi.

Üçüncü Küme (Genotip-12): İki elemanlı bu kümede bulunan ve fekal örneklerden elde edilen suşların tamamı Bursa’da A işletmesine bağlı bir haradan izole edildi.

Dördüncü Küme (Genotip 20): Bu kümede yer alan beş suşun üçü nazal ve birisi fekal örneklerden olmak üzere dört tanesi A işletmesine bağlı Eskişehir, Bursa ve Malatya’da bulunan haralardan elde edildi. Sezon boyunca aynı işletmeye bağlı bu haralar arasında hayvan giriş çıkışının olduğu belirlendi. Geriye kalan bir suş ise Şanlıurfa’da B işletmesine bağlı bir haradan alınan nazal swap örneğinden izole edildi.

Beşinci Küme (Genotip-21): Bu kümede yer alan dört suşun üç tanesi Eskişehir bölgesindeki A işletmesine bağlı bir haradan, diğeri ise bu haraya yürüme mesafesinde bulunan özel bir haradan izole edildi. Eskişehir A işletmesindeki üç izolattan ikisi şüpheli bir tay ve annesinden elde edildi. Bu kümedeki bir diğeri suş ise Malatya A işletmesine bağlı harada bulunan bir tayın fekal örneğinden izole edildi. Aynı hayvanın nazal örneğinden elde edilen suş dördüncü küme içerisinde yer almakta olup, bu kümedeki suşlarla benzerlik oranı %94,6 olarak saptandı.

Altıncı Küme (Genotip-22): Bu kümede bulunan üçü nazal biri fekal örnekten izole edilen dört suş bulunmaktadır. Bunların ikisi Eskişehir A

işletmesine bağlı haradan elde edildi. Diğer iki suştan biri, şanlıurfa'daki özel bir haradan, diğeri ise İzmit'te B işletmesine bağlı bir haradan elde edildi.

Yedinci Küme (Genotip 23): Bu kümede bulunan dört suşun üç tanesi fekal örneklerden, bir tanesi de toprak numunesinden izole edildi. Toprak numunesi Eskişehir'de bulunan B işletmesine ait padoktan elde edildi. Geriye kalan üç izolatan ikisi Eskişehir ve bir tanesi Bursa olmak üzere A işletmesine bağlı haralardan elde edildi.

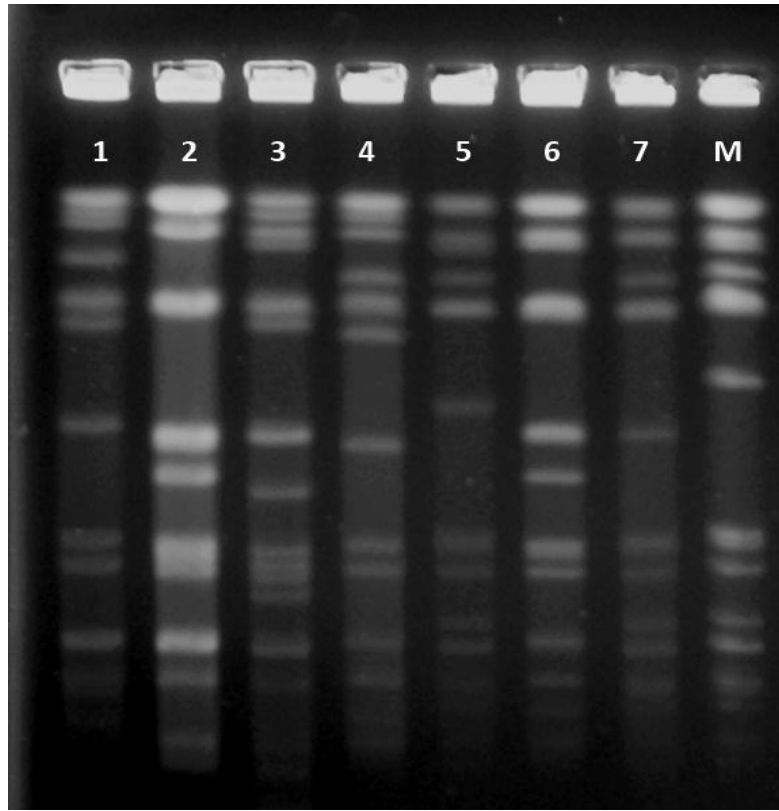
Sekizinci Küme (Genotip 13): En büyük küme olarak saptanan bu kümedeki sekiz suşun dördü Eskişehir bölgesinde bulunan ve birbirine mesafe olarak oldukça yakın B işletmesine ait bir hara ile özel yetiştiricilik yapan C6 harasında bulunan taylardan izole edildi. Üç adet suş; İzmit'te bulunan ve birisi B işletmesine bağlı üç farklı haradan izole edildi. Geriye kalan bir suş ise Bursa'da B işletmesine ait bir haradan izole edildi.

Dokuzuncu Küme (Genotip 15): Bu kümeye ait dört suşun üçü Malatya'da A işletmesine bağlı olan haradaki taylardan izole edildi. Geriye kalan bir suş ise şanlıurfa'da özel yetiştiricilik yapılan bir çiftlikten elde edildi.

Onuncu Küme (Genotip 16): Altı suştan oluşan bu kümedeki suşların dört tanesi Eskişehir bölgesinden izole edildi. Bu suşların üçü Eskişehir'deki özel haralardan elde edilmiş olup, bir tanesi ise B işletmesine bağlı haradan elde edildi. Geriye kalan iki suştan biri İzmit'te B işletmesine bağlı haradan elde edilirken diğeri Malatya'da A işletmesine bağlı haradan elde edildi. Bu kümenin Malatya'dan elde edilen suşları da bulunduran dokuzuncu küme ile olan benzerlik oranı %93,6 olarak tespit edildi.

Onbirinci Küme (Genotip 17): Bu kümede yer alan iki suş, biri nazal diğeri fekal örnekten olmak üzere İzmit bölgesinde bulunan ve mesafe olarak birbirine uzak olan iki farklı özel haradan elde edildi.

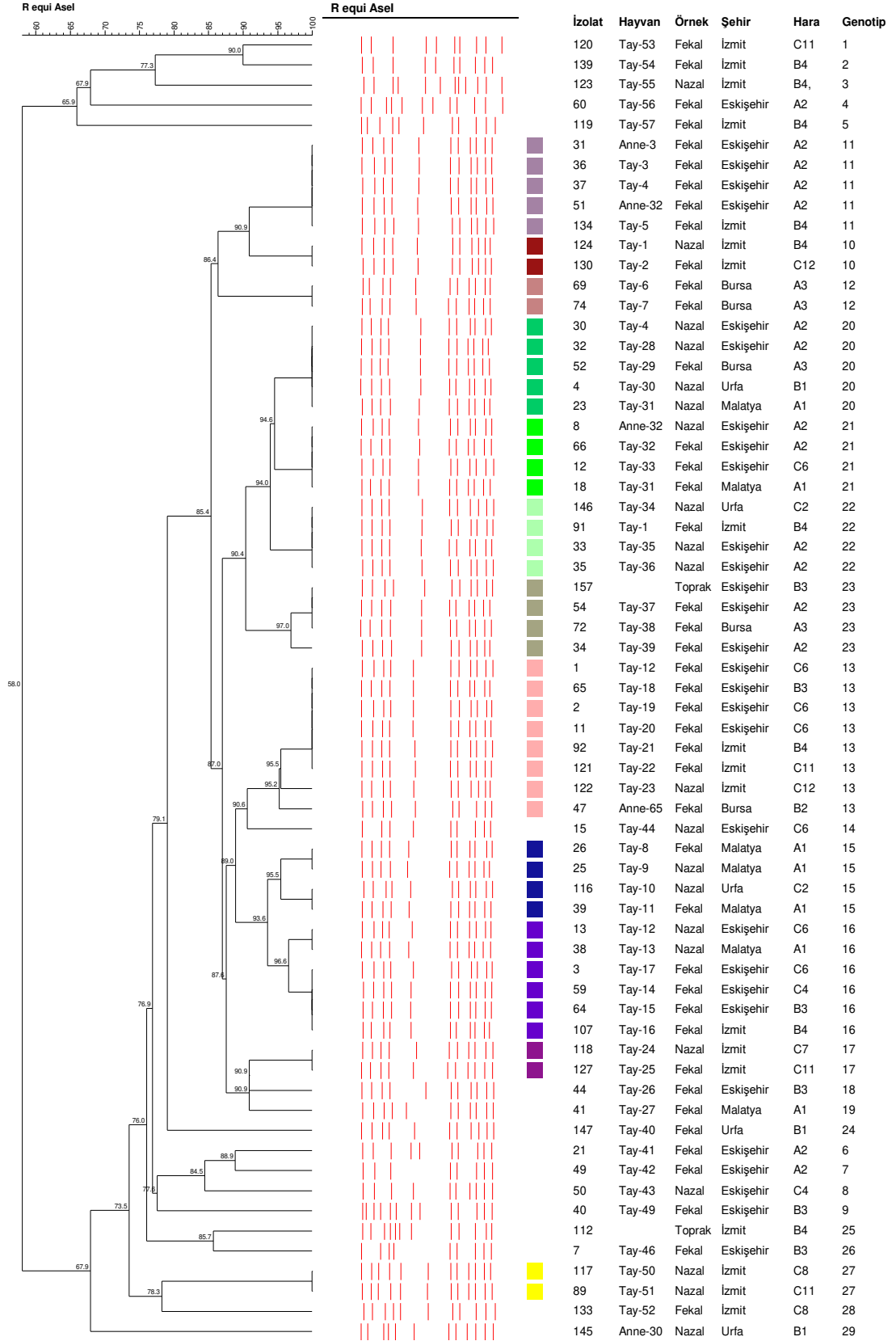
Onikinci Küme (Genotip 27): Bu kümede yer alan iki izolat, İzmit'te bulunan ve birbirine uzak mesafede yer alan iki farklı özel haradan toplanan nazal örneklerden elde edildi.



Şekil 23: *AseI*(*VspI*) enzimi ile kesilen *R. equi* saf izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü.

M: *R. equi* referans ATCC 33701 suşu

- | | |
|--------------------|------------------------|
| 1) İZMİT-B4 Fekal | 5) İZMİT-B4 Fekal |
| 2) İZMİT-C11 Fekal | 6) İZMİT-B4 Fekal |
| 3) İZMİT-B4 Nazal | 7) ESKİŞEHİR-B3 Toprak |
| 4) İZMİT-C8 Fekal | |



Şekil 24: PFGE yöntemi sonucu *R. equi* izolatlarına uygulanan dendrogram grafiği.

5.6. Çiftlik Koşulları ile İlgili Toplanan Bilgilerin Değerlendirmesi

Örnek alınan on yedi haranın koşulları ile ilgili çiftlik yetiştiricileri veya veteriner hekimlerden soru cevap şeklinde kısa bilgiler alındı. Verilen cevapların çiftlik sayılarına göre oranları, her çiftliğin sorulara verdiği cevaplar ve bilgilerin birbirleri ile istatistiksel olarak ilişkileri aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir (Tablo 17), (Tablo 18), (Tablo 19).

Tablo 17: *R.equi* suşlarının izole edildiği haralardan alınan bilgilerin çiftliklere göre yüzdeleri.

Soru No:	Soru	Cevap/Yüzde(%)
1	Daha önceden haradaki hayvanlar arasında <i>R.equi</i> enfeksiyonu geçiren oldu mu?	Evet: 12 (%70,6) Hayır: 5 (%29,4)
2	Yetiştiriciliğini yaptığınız ırk hangisidir?	İngiliz: 5 (%29,4) Arap: 4 (%23,5) Karma: 8 (%47,1)
3	Hiperimmün plazma uygulaması yapılıyor mu?	Evet: 2 (%11,8) Hayır: 15 (%88,2)
4	Haradaki hayvanlar kendi hayvanınız mı pansiyon mu?	Pansiyon: 4(%23,5) Kendi Hayvanımız: 11 (%64,7) Her ikisi de: 2 (%11,8)
5	Enfeksiyonlu hayvanları ayrı yere alıyor musunuz?	Evet: 14 (%82,4) Hayır: 3 (%17,6)
6	Tayların tamamına hiperimmün plazma yapılıyor mu?	Evet: 1(%5,9) Hayır: 16(%94,1)
7	Çiftlikte karışık yetiştirme var mı?	Evet: 8(%47,1) Hayır: 9(%52,9)
8	Altık olarak ne kullanılıyor?	Buğday sapı: 16 (%94,1) Altık yok: 1 (%5,9)
9	Sanitasyon için ne kullanılıyor?	Çim ilacı: 2 (11,8) Vircon's: 4(%23,5) Organik asit ve iyot: 1 (%5,9) Gübre: 2 (%11,8)

		Tarım Kireci: 4(%23,5)
		Hiçbiri: 4(%23,5)
10	Enfeksiyondan ölen hayvan var mı?	Evet:10(%58,8) Hayır:7(%41,2)
11	Altlıklar haftada kaç kez değiştiriliyor?	1 kez: 2 (%11,8) 3 kez: 4 (%23,5) Her gün: 11 (%64,7)
12	Antibiyotik tedavisi ortalama kaç gün sürüyor?*	15.0 (0-35)
13	Ölen tayların annelerinin daha önceki yavruları enfeksiyona yakalanmış mıydı?	Büyük çoğunluğu: 2 (%11,8) Nadiren: 3 (%17,6) Hayır: 8 (%47,1) Bilmiyorum: 4 (%23,5)
14	Ortalama olarak padokların mekanik temizliği yılda kaç kez yapılıyor?*	12.0 (0-24)
15	Dezenfeksiyon senede kaç kere yapılıyor?*	1.0 (0-5)
16	Hayvanlara yem olarak ne veriyorsunuz?	a: 1 (%5,9) b: 1 (%5,9) c: 5 (%29,4) d: 3 (%17,6) e: 4 (%23,5) f: 2 (%11,8) g:1 (%5,9)

* Tanımlayıcı olarak medyan(min-max) verilmiştir.

a :Hazır Yem (Dodson & Horrell)

b: Mısır kırması, buğday kepeği, melas, havuç, yumurta, yonca, fiğ

c: Arpa ezmesi, yulaf, mineral-vitamin karması, kuru ot, kuru yonca.

d: Yulaf ezmesi, mısır, soya, pirinç kepeği, vitamin karması.

e: Yulaf arpa.

f: Arpa, yonca, kepek.

g: Yonca, arpa, yulaf .

Tablo 18: Örnek alınan haralardaki pozitif hayvanların oranları ve sorulan sorulara verilen cevaplar.

	s1	s2	s3	s4	s5	s6	s7	s8	s9	s10	s11	s12	s13	s14	s15	s16	<i>R.equi</i> Pozitif hayvan %	<i>vapA</i> pozitif Hayvan %
B1	Evet	İngiliz+Arap	Hayır	Pansiyon	Evet	Hayır	Hayır	Buğday sapı	Virkon S	Evet	7	10 gün	Bilmiyorum	12	5	e	36 (9/25)	33.3(3/9)
B2	Evet	İngiliz+Arap	Hayır	Pansiyon	Hayır	Hayır	Hayır	Buğday sapı	Virkon S	Evet	7	35 gün	Nadiren	24	1	c	20 (8/40)	12.5(1/8)
B3	Evet	İngiliz+Arap	Hayır	Pansiyon	Evet	Hayır	Hayır	Buğday sapı	Organik asit ve iyot	Evet	7	10 gün	Bilmiyorum	12	1	c	15 (9/60)	77.7 (7/9)
B4	Evet	İngiliz+Arap	Evet	Pansiyon	Evet	Hayır	Hayır	Buğday sapı	Kullanılmıyor	Evet	7	21 gün	Büyük çoğunluğu	12	0	c	36.4 (27/74)	29.6 (8/27)
C1	Hayır	İngiliz	Hayır	Kendi H.	Evet	Hayır	Hayır	Buğday sapı	Tarım kireci	Hayır	7	-	Hayır	12	1	e	0 (0/5)	0
C2	Evet	Arap	Hayır	Kendi H.	Hayır	Hayır	Evet	Altılık yok	Kullanılmıyor	Evet	1	10 gün	Bilmiyorum	0	0	f	11 (2/18)	100 (2/2)
C3	Hayır	İngiliz	Hayır	P+K	Evet	Hayır	Evet	Buğday sapı	Gübre	Hayır	3	7 gün	Hayır	24	1	d	5.26 (1/19)	0
C4	Evet	Arap	Hayır	Kendi H.	Evet	Hayır	Hayır	Buğday sapı	Tarım kireci	Hayır	3	20 gün	Hayır	12	1	e	60 (3/5)	66.6 (2/3)
C5	Hayır	İngiliz+Arap	Evet	Kendi H.	Evet	Evet	Hayır	Buğday sapı	Virkon S	Hayır	7	-	Hayır	24	1	b	0 (0/5)	0
C6	Evet	İngiliz+Arap	Hayır	Kendi H.	Hayır	Hayır	Evet	Buğday sapı	Kullanılmıyor	Evet	1	15 gün	Büyük Çoğunluğu	2	0	f	35.2 (6/17)	100 (6/6)
C7	Evet	İngiliz	Hayır	Kendi H.	Evet	Hayır	Evet	Buğday sapı	Çim ilacı	Evet	3	21 gün	Hayır	24	1	a	50 (1/2)	100 (1/1)
C8	Evet	Arap	Hayır	Kendi H.	Evet	Hayır	Evet	Buğday sapı	Gübre	Hayır	7	10 gün	Nadiren	24	1	g	100 (4/4)	50 (2/4)
C9	Evet	İngiliz+Arap	Hayır	Kendi H.	Evet	Hayır	Hayır	Buğday sapı	Çim ilacı	Evet	7	21 gün	Nadiren	12	1	e	40 (4/10)	0
C10	Hayır	İngiliz	Hayır	Kendi H.	Evet	Hayır	Evet	Buğday sapı	Kullanılmıyor	Hayır	3	-	Hayır	12	0	c	50 (1/2)	0
C11	Evet	İngiliz	Hayır	P+K	Evet	Hayır	Evet	Buğday sapı	Tarım Kireci	Evet	7	15gün	Bilmiyorum	3	0.5	d	62.5 (10/16)	40 (4/10)
C12	Evet	İngiliz+Arap	Hayır	Kendi H.	Evet	Hayır	Evet	Buğday sapı	Tarım Kireci	Evet	7	21 gün	Hayır	3	0.5	d	100 (2/2)	100 (2/2)
C13	Hayır	Arap	Hayır	Kendi H.	Evet	Hayır	Hayır	Buğday sapı	Virkon S	Hayır	7	0	Hayır	24	1	c	100 (2/2)	0

Tablo 19: Verilen cevapların istatistiksel olarak birbirleri ile ilişkileri.

	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S17	S11	S14	S15	S18	S10	S13
S1	-0.426	-0.165	0.358	-0.299	-0.387	0.091	-0.165	0.000	0.406	0.020	0.165	0.772**	0.070
S2		-0.362	-0.665**	0.255	-0.248	0.467	0.060	0.358	-0.137	0.069	0.362	-0.473	-0.294
S3			0.242	0.169	0.685**	-0.344	-0.133	-0.264	-0.178	0.219	-0.433	-0.065	0.278
S4				-0.167	-0.060	-0.597*	-0.044	-0.341	-0.058	-0.121	-0.242	0.389	0.129
S5					0.116	-0.182	-0.310	-0.446	-0.318	-0.442	-0.169	-0.387	-0.202
S6						-0.236	-0.091	-0.181	-0.298	-0.112	-0.685**	-0.299	-0.027
S7							0.022	0.554*	0.268	0.456	0.344	0.070	-0.064
S17								0.066	-0.435	-0.164	0.133	-0.065	0.179
S11									0.277	0.546*	0.264	-0.043	-0.014
S14										0.508	0.178	0.492*	-0.233
S15											0.164	0.131	0.344
S18												0.065	0.278
S10													-0.052

Veriler Sperman korelasyon ile değerlendirildi. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

S1 ile S10 arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi ($p < 0.01$). Çiftlikte *R equi* enfeksiyonu görülmesi ile enfeksiyondan ölen hayvanların çiftlikte bildirilmesi arasında pozitif bir ilişki bulundu.

Padokların mekanik temizlik yapılma sıklığı ile *R equi* enfeksiyonu kaynaklı ölüm olmaması arasında pozitif bir korelasyon (+0.492) belirlendi ($p < 0.05$).

6. TARTIŞMA

R. equi enfeksiyonları dünya genelinde taylarda pnömoni etkenleri arasında şiddetli seyreden en önemli bakteriyel enfeksiyonlardan biridir. Etken bir toprak saprofiti olmasından dolayı at yetiştiriciliği yapılan yerlerde yaygın olarak bulunmaktadır (85, 94, 166). *R. equi* orijinli enfeksiyonlar, özellikle 1-6 aylık taylarda akciğerlerde meydana getirdiği pyogranülomatöz lezyonlar sebebiyle yüksek morbidite ve mortalite oranları ile seyretmekte, taylar tedavi edilse bile performans düşüklüğüne sebep olmaktadır. Bu durumda hastalığın ciddi anlamda ekonomik kayıplara yol açtığı düşünülmektedir. Dünya genelinde *R. equi* enfeksiyonlarına yönelik birçok epidemiyolojik çalışma yapılmış olmasına rağmen ülkemizde taylarda *R. equi* pnömonilerinin prevalansı üzerine yapılan çalışmalar yetersizdir. Dolayısıyla at yetiştiriciliğinde önemli bir sorun teşkil eden *R. equi* enfeksiyonu ile mücadelede daha etkin stratejiler üretilmesine katkı sunacak kantitatif verilerin temin edilmesi maksadıyla moleküler tabanlı bir epidemiyolojik çalışma gerçekleştirildi.

Çalışmamızda yarış atı yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı illerde bulunan haralardaki toprak ve su örnekleri ile bu haralarda bulunan taylardan alınan nazal ve fekal svaplarda *R. equi*'nin izolasyon ve identifikasyonu, *vapA* geni yönünden pozitif bulunan virulent izolatlar arasındaki genetik ilişkinin PFGE ile ortaya konulması, izolatların çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik/duyarlılık durumlarının belirlenmesi ve hastalığın muhtemel risk faktörlerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçlar doğrultusunda öncelikli olarak etken izolasyonu ve tür spesifik PCR ile identifikasyon aşamaları gerçekleştirildi. Bu işlemler sonucunda

beş farklı ilde bulunan haralardan toplanan nazal ve fekal svapların sırasıyla yaklaşık %10 ve %23'ünde, toprak ve su örneklerinin ise sırasıyla %29 ve %6'sında *R.equi* izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi. *R. equi* pnömonilerinin tanısında alt solunum yolu örneklerinden izolasyon yöntemi ile bakteri identifikasyonu altın standart olarak kabul edilmektedir (167). Araştırmacılar klinik belirti gösteren taylardan topladıkları farklı örneklerde *R.equi* izolasyon oranlarını karşılaştırmışlar ve nazal svaplara göre trakeal aspiratlardan çok daha yüksek oranlarda izolasyon gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir (59, 168). Bu çalışmaların verileri, hayvanlarda hastalık tablosu olsa bile nazal svap örneklerinde hatalı negatif sonuç alma ihtimalinin yüksek olduğunu ileri sürmektedir. Bu durum, alt solunum yolu örneği alınırken kullanılan tekniğin nazal boşluğa temas etmeden ve katater yardımı ile gerçekleşmesi ve özellikle enfeksiyonlu taylarda bir pnömoni etkeni olan *R.equi*'nin nazal boşluğa nazaran alt solunum yolunda daha yüksek oranda bulunması ile açıklanabilir. Çalışmamızda alt solunum yolu örneklerinin kullanılamaması, bu örneklerin invaziv bir yöntemle alınması, teknik olarak ekstra işçilik ve ekipmana gerek duyulması ve daha önemlisi hayvan sahiplerinin bu duruma sıcak bakmamasından kaynaklandı. Dolayısıyla çalışma kapsamında yer alan hayvanlardan trakeal aspirat örnekleri alınabilseydi, nazal svaplardan elde edilen %10'luk izolasyon oranından daha yüksek bir oran elde edilmesi sözkonusu olabilirdi. Bununla birlikte bu izolasyon oranının nazal svap örnekleri ile *R. equi* taraması yapan önceki çalışmaların verileri ile benzer olduğu, hatta birçok çalışmada bildirilen oranlardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Khurana ve ark. (169), klinik belirti gösteren ve sağlıklı görünen taylardan topladıkları nazal

svap örneklerinin yaklaşık %21'inde pozitiflik bulduklarını ancak izole ettikleri suşların tamamının semptom gösteren hayvanlardan elde edildiğini bildirmişlerdir. Mir ve ark. (170), 88 adet yetişkin at ile 53 adet solunum problemlili taylardan topladıkları nazal svap örneklerinde %4 civarında *R.equi* izole etmişlerdir. Yine Etiyopya'da yapılan bir çalışmada nazal svap örneklerinin %3'ünde etken izolasyonu rapor edilmiştir (171).

Araştırmamızda nazal svaplardan elde edilen izolasyon oranının yukarıda zikredilen çalışmalardan daha yüksek olmasının, kullanılan transport besiyerinin bileşiminden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda kullanılan transport besiyeri bileşiminde bulunan inorganik fosfat buffer sayesinde kontaminant bakterilerin enzimatik reaksiyonlarının önleniği, buna ilaveten içeriğindeki kömür ile bakterilerin daha uzun süre canlı kalmasının sağlandığı bildirilmiştir (172).

R.equi'nin yetişkin atların ve tayların dışkılarından, aynı zamanda topraktan da yaygın olarak izole edildiği bildirilmektedir (96).Pnömoni tablosu gösteren taylar çevresel olarak etkenin yayılmasının en önemli kaynakları olarak kabul edilmektedir (65). Çevre koşullarının uygun olması durumunda etken toprakta rahatlıkla gelişip çoğalabilmektedir.

At ve taylardan toplanan taze dışkı örnekleri ile yapılan taramalarda oldukça yüksek oranlarda (%70'in üzerinde) *R. equi* izolasyonu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (97, 110). Buna karşın fekal svap örnekleri ile yapılan çalışmalarda etken izolasyonu gerçekleştirilemediği rapor edilmiştir (160, 169). Bu tez çalışmasında ise 428 adet fekal svap örneğinin %22,9'u *R.equi* yönünden

pozitif bulundu. Literatür verileri incelendiğinde taze dışkılarından elde edilen izolasyon oranlarının fekal svap örneklerine oranla daha yüksek olduğu görülmektedir (97, Tel ve ark. 2016). Bu durum, etkenin taze dışkıda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunabilme ihtimalini akla getirmektedir. Öte yandan fekal svap örnekleri ile yapılan çalışmalara kıyasla, araştırmamızdaki izolasyon oranının daha yüksek olduğu görüldü. Bu oranın yüksek olmasının, svap numunelerinin izolasyon aşamasına kadar besiyerli ortamda muhafaza edilerek saklanmasıyla kaynaklandığı düşünülmektedir. Örneklem metodunun daha kolay olması ve örneklerin alınır alınmaz besiyerli ortamda muhafaza edilmesi nedeniyle araştırmamızda taze dışkı yerine fekal svap örnekleri kullanıldı.

Literatürlerde toprak örnekleri için izolasyon oranları %68 ve %95 aralığında değişkenlik göstermiştir (37, 110, 114, 173). Tel ve ark. (110), 105 örnek için topraktan izolasyon oranını %86,6 olarak bildirmiştir. Venner ve ark. (114), 64 adet toprak örneğinin 56 (%87)'sında *R. equi* yönünden pozitiflik bulmuştur. Buna karşılık Khurana ve ark (169) 15 adet toprak örneğinin yalnızca bir tanesinden *R. equi* izolasyonu gerçekleştirirken, yaptıkları farklı bir çalışmada 28 adet toprak örneğinin yine yalnızca bir tanesinden *R. equi* izole etmişlerdir (160). Çalışmamızda 17 adet çiftlikten toplanan toprak örneklerinin %29,4'ü *R. equi* yönünden pozitif bulundu. İzolasyon oranı yüksek olan çalışmalarda (110, 114). Toprak numuneleri toplanırken bir çiftlik için padokların birçok bölgesinden örneklem yapılmış olmasının izolasyonda başarı şansını arttırdığı düşünülmektedir. İzolasyonda başarı şansını arttıran bir diğer faktörün ise toprak örneklerinin sıvı besiyeri kullanılarak 37 °C 'de ön zenginleştirmeden sonra selektif izolasyon aşamasına geçilmesi olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda

toprak numuneleri için örneklem yapılırken her çiftlik için bir adet örnek olacak şekilde padokların birkaç bölgesinden numuneler toplandı ancak ön zenginleştirme yapılmadı. Dolayısıyla ön inkübasyon ve zenginleştirme yapılmadan selektif izolasyon yapılmasının izolasyon oranını negatif yönde etkilediği düşünülebilir.

Literatürlerde *R.equi*'nin su örneklerinden izolasyonu hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Araştırmamızda 17 adet çiftlikten toplanan su örneklerinin yalnızca bir tanesinde pozitiflik bulundu. Padoklardaki suluklardan alınan su örneklerinden yalnızca bir tanesinde pozitiflik bulunmasının tesadüfi olduğu ve hayvanların inhalasyon yolu ile suyu kontamine etmiş olabileceği düşünülmektedir.

Taylarda *R.equi*'nin hastalık oluşturmada, 85-90 kb'lık plazmidinde yer alan *vapA* geni tarafından kodlanan, virülensle ilişkili antijen olarak adlandırılan ve termoregüle olabilen VapA antijenine bağlıdır (50). 15-17 kDa ağırlığındaki bu antijen; taylardan elde edilen klinik örneklerden ve çevresel örneklerden izole edilen *R.equi* suşlarında bulunmaktadır (61, 174). *vapA* geni *R.equi* enfeksiyonlarının patogeneğinde rol oynayan önemli bir epidemiyolojik marker olup, bu geni bulunduran tüm *R.equi* izolatlarının taylar ve fareler için letal olduğu bildirilmiştir (106, 174). Virulent ve avirulent *R.equi*'lerin toprağın normal habitatında, yaygın olarak da hastalıklı veya sağlıklı atların gastrointestinal kanalında ve dışkılarında bulundukları ve çevresel örneklerde virulent *R.equi* konsantrasyonlarının diğerlerine göre daha düşük seviyede olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çevresel faktörler, çiftlik özellikleri, çiftlik yönetim koşulları ve koruyucu sağlık önlemleri gibi faktörler taylardaki *R.equi* pnömonilerinin ortaya çıkmasında

ve buna bağlı olarak virlent suşların çiftlikteki prevalansı üzerinde etkilidir (107, 150, 175).

Krewer ve ark (155), endemik, sporadik ve enfeksiyonun hiç görülmediği toplamda yedi çiftlik üzerinde virlent *R.equi*'nin varlığını araştırmış ve izole ettikleri 118 *R.equi* suşunun 17 (%14,4) tanesini *vapA* geni yönünden pozitif bulmuşlardır. Çevresel örneklerin hepsi avirlent olarak tanımlanmış ve enfeksiyonun hiç görülmediği çiftliklerde virlent *R.equi* bildirilmemiştir. Ayrıca sporadik çiftliklerde yetişkin atların dışkılarında %11,54 oranında pozitiflik bulunmuştur. Monego ve ark. (176), klinik ve çevresel örneklerden elde edilen 180 *R.equi* izolatının 32 (%17,7) tanesinde *vapA* geni yönünden pozitiflik bulmuşlardır. Çalışmamızda elde edilen 147 *R.equi* izolatının 68 (%46,2) tanesinde *vapA* geni yönünden pozitiflik tespit edildi. Nazal svaplardan elde edilen ve *R.equi* olarak doğrulanmış 43 izolatın 19 (%44,1)'unun, fekal svaplardan elde edilen 98 izolatın 47 (%48)'sinin ve toprak numunelerinden elde edilen beş adet izolatın iki tanesinin *vapA* geni yönünden pozitif olduğu saptandı. Nazal ve fekal örneklerden elde edilen virlent izolat oranlarının karşılaştırmasına yönelik herhangi bir literatür verisine rastlanmadı. Ancak alışmamızda nazal ve fekal svaplardan elde edilen izolatların *vapA* geni bulundurma oranları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Buna karşılık önceki çalışmalarda çevresel örneklerden elde edilen virlent suşların diğer örneklere göre daha az oranda olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda da toprak örneklerinden az sayıda virlent suş tespit edildi. Virlent suşların düşük oranda tespit edilmesinde örnek sayısının az olmasının rolü olduğu düşünülebilir. Ayrıca çalışmamız kapsamında yer alan ve daha önce enfeksiyon görülmediği bildirilen beş adet çiftlikten alınan örneklerin

hiçbirinden virulent *R.equi* izole edilmedi. Bu bulgu da literatür verileri ile paralellik arz etmektedir. Araştırmamızda izole edilen virulent *R. equi* suşlarının tamamı daha önce enfeksiyon görüldüğü bildirilen 12 farklı işletmeden elde edildi. *R. equi* izolatlarında *vapA* geni yönünden en yüksek pozitiflik oranı %83,8 ile Eskişehir ilinde saptandı. Bu ilde çalışma kapsamına alınan haraların birbirine oldukça yakın olması ve bu işletmelerde daha önce hastalığın görüldüğünün bildirilmesinin söz konusu yüksek oranın ortaya çıkmasında rolü olduğu düşünülmektedir. Buna karşılık *R.equi*'nin en çok izole edildiği İzmit ilinde *vapA* geni pozitifliğinin (%28,6) Eskişehir iline göre daha düşük oranda kalması, bu ilde çalışma kapsamına alınan çiftlik sayısının fazla olması, çiftliklerin birbirlerinden uzak konumlanmaları ve çiftliklerdeki hayvan sayısının çok yüksek olmaması ile açıklanabilir.

Aside dirençli olarak tanımlanan *R.equi*'nin aşırı asidik ve aşırı alkali koşullarda üremesi baskılanmaktadır. Ayrıca kireç gibi toprağın pH'sını değiştiren dezenfektanlar virulent *R.equi* kontaminasyonunun önüne geçmeye yardımcı olabilmektedir (12, 117). Çalışmamızda toprak örneklerinden birisi İzmit ve diğeri Eskişehir olmak üzere aynı işletmeye ait iki haradan iki adet virulent *R.equi* suşu elde edildi. Çiftlik bilgileri incelendiğinde Eskişehir'den elde edilen virulent suşun bulunduğu harada sanitasyon için organik asit kullanıldığı görüldü. Bakterinin aside dirençli olduğu göz önüne alındığında dezenfektanın normalden daha düşük konantrasyonda kullanılma ihtimalinin söz konusu olabileceği düşünülmektedir. İzmit'ten elde edilen virulent suşun bulunduğu çiftlikte ise herhangi bir dezenfektan kullanılmadığı bildirildi.

R. equi pnömonilerinin tedavisinde makrolid grubu antibiyotiklerin, özellikle rifampisinle birlikte eritromisin gibi diğer makrolidlerin kombine şekilde kullanılmasının başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir. Ancak subklinik enfeksiyonlarda makrolidlerin yaygın kullanımı sonucu dirençli suşlar oluşabildiği rapor edilmiştir (118, 125). Burton ve ark. (177), *R. equi* olarak doğrulanan 38 izolatın 14'ünde makrolid dirençli suşlar bulurken, Riesenber ve ark. (178), 200 adet *R. equi* izolatının %3'ünde rifampin dirençliliği bildirmişlerdir. Mir ve ark. (9), test ettikleri 12 izolatın hepsinin eritromisin ve rifampine duyarlı olduğunu bildirirken %66,7'sinin amoksisiline duyarlı olduğunu, %50'sinin Penisilin G'ye dirençli olduğunu ve %25'inin ise streptomisine dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Javed ve ark. (157), PCR ile doğrulanan üç adet *R. equi* izolatının hepsinin amoksisiline duyarlı olduğunu, izolatların iki tanesinin rifampin ve streptomisine duyarlıyken bir tanesinin bu antibiyotiklere orta derecede duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Tedavide kullanılan makrolid grubu bir antibiyotik olan rifampinin genelde yapılan çalışmalarda diğer makrolid grubu antibiyotiklere de direnç gösterdiği bildirilmiştir. Bu direnç gelişiminin *rpoB* geninde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (179, 180). Giguère ve ark (125), yaptığı bir çalışmada 24 *R. equi* izolatının 22 tanesinin rifampin ile birlikte eritromisin, azitromisin ve klaritromisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda veri toplanan bütün çiftliklerde tedavide eritromisin ve rifampin kombinasyonları kullanıldığı bildirildi. Elde edilen saha izolatlarının beşinde makrolid grubu antibiyotiklere karşı direnç saptandı. Bu suşların dört tanesi eritromisin, klaritromisin ve rifampine birlikte direnç gösterirken bir tanesinde yalnızca rifampine karşı direnç

tespit edildi. Söz konusu izolatların tamamı İzmit'teki B işletmesine bağlı bir haradan elde edildi. Bu işletmede antibiyotik tedavisinin 21 gün sürdüğü, daha önceki yıllarda enfeksiyondan ölen hayvanların var olduğu ve dezenfeksiyon için herhangi bir dezenfektan kullanılmadığı belirtildi. Bundan dolayı bu çiftlikte dirençli izolatların var olduğu düşünülebilir.

In vitro ortamda etkili olduğu bildirilen gentamisin, tetrasiklin ve vankomisin gibi antibiyotiklerin tedavide kullanımı hayati tehlike oluşturduğundan dolayı önerilmemektedir (83, 118). Çalışmamızdaki izolatların hiçbirisi vankomisine dirençli bulunmadı. Buna karşılık gentamisin ve tetrasikline dirençli birer adet izolat tespit edildi. Bu bakımdan araştırmamızın sonuçları literatür verileri ile örtüşmektedir.

Bu çalışmada test edilen izolatların %45,5'inin ampisiline dirençli olduğu görüldü. Etkenin penisilin grubu antibiyotiklere dirençli olmasında Penisilin G ile yüksek dozlu tedavilerin etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca hayati tehlike yaratmasından dolayı *R.equi* pnömonilerinin tedavilerinde taylor için penisilin grubu antibiyotikler önerilmemektedir (9, 10, 117). Etkenin *in vitro* ortamda birçok antibiyotiğe duyarlı bulunması tedavi için bu antibiyotiklerin tercih edilmesi gerektiğini akla getirmemelidir. Özellikle etkenin hücre duvarı yapısı ve hücre içi üreme özelliği göz önünde bulundurulduğunda antimikrobiyal ajanların öncelikle bu özelliklere göre seçilmesi gerekmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalarda *R.equi* izolatları arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla farklı genotiplendirme metodları kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda sonuçların birbirinden farklılık

gösterdiği ve yetersiz kaldığı görülmektedir (32, 113, 114, 115, 165, 181, 182). Çalışmalarda taylarda görülen *R.equi* enfeksiyonlarının farklı genotiplerden kaynaklandığı ve geniş çaplı yayılım gösterdiği görülmektedir. Tek bir çiftlik üzerinde yürütülen birçok çalışmada elde edilen izolatların aynı genotipte bulundukları rapor edilmiştir (31, 114, 115). Ancak yapılan başka çalışmalarda sadece çeşitli ülkelerden elde edilen izolatlar arasında değil, yine tek bir çiftlikten elde edilen izolatlar arasında da yüksek oranda genetik çeşitlilik bulunduğu bildirilmiştir (32). rep-PCR yöntemi kullanılarak yapılan tiplendirme çalışmalarında bir tayın farklı genotiplerdeki *R.equi* izolatları ile de enfekte olabildiği gösterilmiştir (183). Domuzlardan elde edilen *R.equi* izolatlarına uygulanan PFGE metodu ile sadece çiftlikler arasında değil aynı zamanda aynı çiftliklerden elde edilen izolatlar arasında yüksek oranda genetik çeşitlilik bulunmuştur. Bunun sebebinin hayvanlar arasındaki bulaşmadan değil de çevresel kontaminasyonların bir sonucu olduğu bildirilmiştir (181). Yine benzer bir çalışmada farklı çiftliklerdeki sığırlardan elde edilen *R.equi* izolatları arasında aynı restriksiyon kalıpları olduğu bildirilmiştir (182). Witkowski ve ark. (111), *R.equi*'nin genotiplendirilmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada aynı plazmide sahip suşların farklı PFGE profilleri oluşturduklarını bildirmişlerdir. Bakterinin genotiplendirilmesi için yalnızca plazmid profilinin tiplendirilmesinin yetersiz kalacağı ve total genomik DNA'nın tiplendirilmesinin daha garantili olacağı ileri sürülmüştür. *R.equi*'nin PFGE yöntemi ile genotiplendirilmesine yönelik yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar bildirilmiştir. Ülkemizde ise PFGE ile bu bakterinin tiplendirilmesi adına yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 14 çiftlikten elde edilen ve *vapA* geni yönünden pozitif 65 adet *R.equi* izolatına PFGE yöntemi uygulandı. Yapılan dendogram analizi sonucunda çiftlikler ayrı ayrı kendi içerisinde değerlendirildiğinde, her bir çiftliğin farklı genotipteki suşlarla kontamine olduğu görüldü. Yine farklı çiftliklerden ve şehirlerden elde edilen virulent *R.equi* izolatlarının aynı küme içerisinde yer aldığı tespit edildi. Her ne kadar literatür verileri birbirinden farklı sonuçlar verse de çalışmamız Cohen ve ark. (32) ile Soedarmanto ve ark. (182)'nın yaptığı çalışmalarla paralellik göstermektedir. Yine çalışmamızda aynı hayvandan alınan nazal ve fekal svaplardan elde edilen *R.equi* izolatlarının farklı kümeler içerisinde bulundukları ve farklı genotiplerde oldukları saptandı. Çalışmamızda toplamda dört tane tayın ve bir tane annenin hem nazal hem fekal örneklerinden elde edilen *vapA* pozitif izolatların, genetik olarak birbirinden farklı olduğu görüldü (Tay1, Tay4, Tay12, Tay31, Anne 32). Bu veriler, Bolton ve ark. (183)'nın bildirdiği gibi bir tayın farklı genotiplerdeki izolatlarla enfekte olabildiğini düşündürmektedir. Klinik olarak dış bakıdan şüpheli olarak değerlendirilen iki tane tay ve annelerinden alınan örneklerden izole edilen *R.equi* suşlarının aynı küme içerisinde ve aynı genotipte oldukları belirlendi (Anne3-Tay3, Anne32-Tay32). Kısrakların sürekli tayları ile birlikte bulunması ve birbirlerinden kısa süreli de olsa ayrılmamaları, birbirleri arasında bir bulaş yolu olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda iki adet kurumsal işletme (A, B) ve özel çiftliklerden (C) alınan örneklerden elde edilen virulent izolatlar PFGE ile genotiplendirildi. Kurumsal olarak gruplandırdığımız işletmelerin bünyelerinde farklı şehirlerde yer alan haralar bulunmakta ve bu haralar arasında sezon boyunca veya sezon dışı hayvan giriş çıkışı olmaktadır. Yapılan dendogram analizinde en

büyük küme olan sekizinci küme içerisinde Eskişehir Bursa ve İzmit'te B işletmesine bağlı haralardan elde edilen izolatların bulunduğu görüldü. Ancak bu verilerin aynı işletmeye ait haralar arasında hayvan giriş-çıkışları ile açıklanması mantıklı değildir. Örnek toplanırken elde edilen bilgiler çiftlik değil de tay bazında alınmış olsaydı bu sonuçlar hakkında daha sağlıklı yorum yapılabilirdi. Bu sebeple aynı işletmelere bağlı farklı şehirlerde bulunan haralardan elde edilen izolatların aynı küme içerisinde olmasının tesadüfi olabileceği ileri sürülebilir. Yapılan genotiplendirme sonucu birbirine mesafe olarak oldukça yakın çiftliklerden elde edilen izolatların genel olarak aynı küme içerisinde bulunduğu görülmektedir. İkinci kümede İzmit'te birbirine mesafe olarak oldukça yakın olan iki özel çiftlikten elde edilen izolatların yer aldığı belirlendi. Yine beşinci kümede Eskişehir'de birbirine yürüme mesafesi kadar yakın iki haradan elde edilen üç suşun bulunduğu tespit edildi. Eskişehir'deki bu haralardan biri A işletmesine bağlı olup bu kümede yer alan diğer suşun bu işletmeye bağlı olan Malatya'daki bir haradan elde edildiği saptandı. *R.equi*'nin topraktan, inhalasyon veya alimenter yolla bulaştığı düşünülmektedir (116, 117). Bu bilgiler ışığında özellikle yürüme mesafesi kadar yakın çiftliklerden elde edilen izolatların aynı kümede bulunmaları; etkenin rüzgar yolu ile veya veteriner hekimlerin, çalışanların veya araçların bu çiftliklere giriş çıkış yaparak, toprağı bu sayede kontamine edip bulaş yolunun kaynağını oluşturduklarını düşündürmektedir.

Ahırlardan veya padoklardan dışkıların mekanik olarak temizlenmesinin hastalığın prevalansı üzerindeki etkileriyle alakalı herhangi bir epidemiyolojik kanıt bildirilmemiştir (146, 147). Ancak bazı çalışmalarda dışkıların çevresel olarak birikiminin önlenmesinin etrafta virulent *R.equi*'nin çoğalmasını

geciktirecek bir etkisinin olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda çiftlik bilgileri ile ilgili yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda padokların mekanik temizliğinin yapılma sıklığı ile *R.equi* enfeksiyonlarından kaynaklı ölümlerin görülmemesi arasında pozitif korelasyon bulundu. Çalışmamızda bilgi toplanan çiftlikler arasında enfeksiyonlu hayvanları tedavi için diğer hayvanlardan ayırmadığını bildiren üç çiftlik olduğu görüldü. Virü lent *R.equi* izole edilen bu üç çiftlik, aynı zamanda enfeksiyondan dolayı ölümlerin görüldüğü çiftliklerdi. Ayrıca bunların ikisinde pozitif bulunan hayvanların tamamından elde edilen suşların virü lent *R.equi* olduğu görüldü. Geriye kalan bir çiftlikte pozitif bulunan hayvanların %12,5'inden alınan örneklerden virü lent *R.equi* elde edildi. Suşların tamamının virü lent bulunması, bu çiftliklerdeki çalışılan hayvan sayısının az olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bunun yanında enfeksiyonlu hayvanların diğerlerinden ayrılmaması, bu durumun sağlıklı görünümlü diğer taylar için potansiyel risk kaynağı olabileceğini ve virü lent suşların daha hızlı yayılabileceğini düşündürmektedir. Araştırmamızda enfeksiyonlu hayvanları diğerlerinden ayırdığını bildiren 14 çiftlik saptandı. Bunların altısında, pozitiflik saptanan hayvanlardan elde edilen suşların hiçbirinin virü lent olmadığı tespit edildi. Bu çiftliklerde çalışılan hayvan sayılarının iki ile 19 arasında olduğu göz önüne alındığında hayvan sayısının az olmasının bu oranlar üzerinde rol oynayabileceği düşünülebilir. Çalışmamızdaki 17 çiftlikten 10 tanesinde enfeksiyondan dolayı ölümlerin görüldüğü bildirildi. Bu çiftliklerin dokuzundan virü lent *R.equi* elde edilmiş olup geriye kalan bir çiftlikten elde edilen suşlar avirü lent olarak tespit edildi. Bu sonuçların daha sağlıklı değerlendirilebilmesi

için çevresel faktörler ve yönetim koşullarının daha detaylı incelenmesi gerektiği dşnlmektedir.

Çiftliklerin %88,2'si taylarına hiperimmun serum (HIP) uygulaması yapılmadığını bildirdi. Buna karşılık bir çiftlikte bütün taylara HIP verildiği ve bu çiftlikten alınan örneklerin hiçbirinden *R.equi* izolasyonu yapılamadığını saptandı. Hastalığın söz konusu çiftlikte daha önce görülmemesi de pasif bağışıklık transferinin önemini ortaya koymak açısından dikkat çekicidir. Çalışmamızdaki iftliklerin ikisinde ölen tayların annelerinin daha önceki yavrularının da büyük çoğunlukla *R.equi* enfeksiyonuna yakalandığını bilgisine ulaşıldı. Buna karşın beş çiftlikte bulunan ve önceki yavrularında hastalık bildirilmeyen annelerin taylarından elde edilen *R. equi* izolatlarının hepsinin avirlent olduğu tespit edildi. Bu veriler, hastalığa yakalanmada genetik faktörünü düşündürse de, bakterinin toprakta yıllarca canlılığını koruduğu ve virlent suşların izole edildiği bu iki çiftlikte herhangi bir dezenfektan kullanılmaması göz önüne alındığında, yönetim koşulları ve çevresel koşulların da rolü olabileceği dikkate alınmalıdır.

R.equi enfeksiyonlarının ortaya çıkmasında besleme faktörlerinin rolü ile ilgili herhangi bir epidemiyolojik veri bulunmamaktadır. Özellikle laktasyon dönemindeki kısırakların yüksek oranda proteine ihtiyaç duydukları ve kolostrumda maternal antikorların yeterince sentezlenmesi için gebeliğin sonunda rasyondaki protein düzeyinin arttırılması gerektiği bildirilmiştir (184, 185). Buna karşılık kısıraklarda aşırı düzeyde protein alımının yeni doğacak tayın direncini olumsuz etkileyeceği ve laktasyon döneminde kalsiyum, fosfor ve vitamin A'nın süt verimi üzerinde olumlu etkileri rapor edilmiştir (185). Araştırmamızda daha önce enfeksiyonun görülmediği, tayların tamamına HIP uygulaması yapılan ve

R.equi izole edilmeyen bir çiftlikte (C5), kısırlara mısır kırmısı, buğday kepeği, melas, havuç, yumurta, yonca ve fiğ karışımından oluşan rasyonun hazırlandığı bildirildi. Protein miktarı olarak verilen diğeryem gruplarından daha yüksek olan bu rasyonun, maternal antikorları ve süt verimini arttıracak düzeyde olduğu düşünölmektedir. Bu çiftlikteki hayvanların gerek HIP uygulaması gerekse rasyon kalitesi sebebiyle bağışıklık düzeylerinin güçlü olduğu düşünölmektedir. Daha önce enfeksiyon göröldüğü bildirilen ve HIP uygulaması yapılmayan, aynı zamanda virölent *R.equi* izole edilmiş bir çiftlikte (C9) ise hayvanlara konsantre hazır yem verildiğı bildirildi. Literatürlerde kısırlar için özellikle laktasyon döneminde kaba yem oranının vücut ağırlığının %1-2'si kadar ve konsantre yem oranının %0,5-1,5'u kadar olması gerektiğı bildirilmiştir (186). Söz konusu çiftlikteki hayvanların sadece konsantre yemle beslenmesinin süt verimi üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceğı, dolayısıyla tayların bağışıklığı üzerinde negatif yönde etki yaratacağı düşünölmektedir.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

R. equi'den kaynaklanan pnömoniler ülkemizde hala taylar için oldukça riskli ve ekonomik olarak ciddi kayıplara yol açan enfeksiyonlar arasındadır. Bakterinin uzun yıllar toprakta kalabilmesi, hücre duvarı yapısından dolayı çevre şartlarına oldukça dayanıklı olması ve intraselüler bir patojen olarak değerlendirilmesinden dolayı yetiştiricilik sektöründe dikkat edilmesi gereken en önemli enfeksiyonlardan biridir. Ülkemizde *R. equi* enfeksiyonlarının prevalansı, ve risk faktörleri üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Ayrıca bakterinin PFGE ile genotiplendirilmesi adına ülkemizde yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmayla öncelikle at yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı illerde hayvanlardan ve çevresel örneklerden *R. equi*'nin varlığı araştırıldı ve virulent suşların yaygın olarak izole edilmesinin potansiyel bir risk kaynağı olduğu kanısına varıldı. Virulent suşların genotiplendirmesi neticesinde çiftliklerin farklı genotipteki suşlarla kontamine olduğu saptandı ve hastalığın bulaş yolları ile alakalı boşluklar doldurulmaya çalışıldı. Çiftliklerden alınan bilgiler doğrultusunda bakım ve yönetim koşullarının oldukça önemli olduğu kanaatine varıldı. Çalışmamızda makrolid dirençli suşların varlığı nedeni ile tedavide yeni yaklaşımlar geliştirilmesi ve bakterinin direnç mekanizması üzerine daha fazla çalışma yapılması, ayrıca hastalığın etkili bir aşısının olmaması ve tedaviye çok uzun sürede cevap vermesi sebebiyle koruma ve kontrol stratejilerinin üzerinde daha çok durulması gerektiği düşünülmektedir. Bu amaçla özellikle alt solunum yolu örnekleri ile daha geniş çaplı bir tarama yapılması, yetiştiricilik yapılan çiftliklerin koşulları ve hayvanların özellikleri konusunda daha kapsamlı bilgilerin

elde edilmesi, farklı bölgelerden farklı suşların genotipik özelliklerinin karşılaştırılması önerilmektedir. Bununla birlikte elde edilen farklı suşlarla aşı geliştirme çalışmaları, dirençli suşların varlığından dolayı tedavi stratejilerinin değiştirilmesi ve geliştirilmesi, tayların genel olarak sağlık durumlarının yalnızca *R.equi* enfeksiyonları açısından değil, bütünsel olarak değerlendirilmesi gerektiğine inanılmaktadır. Yapılacak daha kapsamlı çalışmaların hastalığın kontrolü ve eradikasyonuna yönelik daha etkin stratejiler geliştirilmesine önayak olacağı düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Prescott, J F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clinical microbiology reviews 1991; 4(1): 20-34.
2. Kämpfer P, Dott W, Martin K, Glaeser SP. *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2014; 64(3): 755-761.
3. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical veterinary microbiology, 2013.
4. Aydın N, İzgür M, Diker KS ve ark. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), Ankara: İlke Emek Yayınları, 2006.
5. Boland CA, Meijer WG. The iron dependent regulatory protein IdeR (DtxR) of *Rhodococcus equi*. FEMS microbiology letters 2000; 191(1): 1-5.
6. Paradis MR. Cutaneous and musculoskeletal manifestations of *Rhodococcus equi* infection in foals. Equine Veterinary Education 1997; 9(5): 266-270.
7. Muscatello G. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal–Part 1: Pathogenesis and epidemiology. The veterinary journal 2012; 192(1): 20-26.
8. Meijer WG, Prescott JF. *Rhodococcus equi*. Veterinary research 2004; 35(4): 383-396.
9. Mir IA, Kumar B, Taku A, Bhardwaj RK, Bhat MA, Badroo GA. Prevalence and Antibioqram study of *Rhodococcus equi* in equines of Jammu and Kashmir, India. Journal of equine science 2015; 26(1): 21-24.
10. Giguère S, Berghaus LJ, Lee EA. Activity of 10 antimicrobial agents against intracellular *Rhodococcus equi*. Veterinary microbiology 2015; 178(3-4): 275-278.
11. Fuhrmann C, Soedarmanto I, Lämmle C. Studies on the Rod- Coccus Life Cycle of *Rhodococcus equi*. Journal of Veterinary Medicine, Series B 1997; 44(1- 10): 287-294.
12. Hughes KL, Sulaiman I. The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. Veterinary microbiology 1987; 14(3): 241-250.
13. Schlusshuber M, Jung S, Bruhn O et al. In vitro potential of equine DEFA1 and eCATH1 as alternative antimicrobial drugs in rhodococcosis treatment. Antimicrobial agents and chemotherapy 2012; 56(4): 1749-1755.
14. Vazquez- Boland JA, Prescott JF, Meijer WG, Leadon P, Hines SA. *Rhodococcus equi* comes of age. Equine veterinary journal 2009; 41(1): 93-95.
15. Benoit S, Taouji S, Benachour A, Hartke A. Resistance of *Rhodococcus equi* to acid pH. International journal of food microbiology 2000; 55(1-3): 295-298.
16. Sutcliffe IC. Macroamphiphilic cell envelope components of *Rhodococcus equi* and closely related bacteria. Veterinary microbiology 1997; 56(3-4): 287-299.

17. Goodfellow M, Alderson G. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the 'rhodochrous' complex. *Microbiology* 1977; 100(1): 99-122.
18. Holtman DF. *Corynebacterium equi* in chronic pneumonia of the calf. *Journal of bacteriology* 1945; 49(2): 159.
19. Goodfellow M. The taxonomic status of *Rhodococcus equi*. *Veterinary microbiology* 1987; 14(3): 205-209.
20. Mosser DM, Hondalus MK. *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic pathogen. *Trends in microbiology* 1996; 4(1): 29-33.
21. Singer ME, Finnerty WR. Construction of an *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vector and plasmid transformation in *Rhodococcus* spp. *Journal of bacteriology* 1988; 170(2): 638-645.
22. Goodfellow M, Sangal V, Jones AL, Sutcliffe IC. Charting stormy waters: A commentary on the nomenclature of the equine pathogen variously named *Prescottella equi*, *Rhodococcus equi* and *Rhodococcus hoagii*. *Equine veterinary journal* 2015; 47(5): 508-509.
23. Takai S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. *Veterinary microbiology* 1997; 56(3-4): 167-176.
24. Jensen HL. Studies on saprophytic mycobacteria and corynebacteria. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 1934; 59: 19-61.
25. Tindall BJ. The correct name of the taxon that contains the type strain of *Rhodococcus equi*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2014; 64(1): 302-308.
26. Jones AL, Sutcliffe IC, Goodfellow M. *Prescottia equi* gen. nov., comb. nov.: a new home for an old pathogen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2013; 103(3): 655-671.
27. Information on the name and the taxonomic classification. <https://bacdiv.dsmz.de/strain/134837>
28. Sangal V, Jones AL, Goodfellow M, Sutcliffe IC, Hoskisson PA. Comparative genomic analyses reveal a lack of a substantial signature of host adaptation in *Rhodococcus equi* ('*Prescottella equi*'). *Pathogens and disease* 2014; 71(3): 352-356.
29. Goodfellow M, Alderson G, Chun J. *Rhodococcal* systematics: problems and developments. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998; 74(1-3): 3-20.
30. Rahman MT, Herron LL, Kapur V et al. Partial genome sequencing of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Veterinary microbiology* 2003; 94(2): 143-158.
31. Morton AC, Begg AP, Anderson GA et al. Epidemiology of *Rhodococcus equi* strains on Thoroughbred Horse Farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(5): 2167-2175.
32. Cohen ND, Smith KE, Ficht TA et al. Epidemiologic study of results of pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Rhodococcus equi* obtained from horses and horse farms. *American journal of veterinary research* 2003; 64(2): 153-161.
33. Takai S, Watanabe Y, Ikeda T et al. Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31(7): 1726-1729.

34. Prescott JF, Nicholson VM, Patterson MC et al. Use of *Rhodococcus equi* virulence-associated protein for immunization of foals against *R equi* pneumonia. American journal of veterinary research 1997; 58(4): 356-359.
35. Rahal K, Kodjo A, Grezel D, Richard Y. Isolation of a new type of virulence plasmid DNA in *Rhodococcus equi* strains from horse and equine environment, in France. Revue de Medecine Veterinaire (France) 1999
36. Takai S, Shoda M, Sasaki Y et al. Restriction fragment length polymorphisms of virulent plasmids in *Rhodococcus equi*. J. Clin. Microbiol 1999; 37: 3417-3420.
37. Takai S, Chaffin MK, Cohen ND et al. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi* endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. Journal of veterinary diagnostic investigation 2001; 13(6): 489-494.
38. Ribeiro MG, Seki I, Yasuoka K et al. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 2005; 28(1): 53-61.
39. Takai S, Hines SA, Sekizaki T et al. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. Infection and immunity 2000; 68(12): 6840-6847.
40. Li SH, Yu XY, Park DJ et al. *Rhodococcus soli* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil using a resuscitative technique. Antonie Van Leeuwenhoek 2015; 107(2): 357-366.
41. Yager JA. The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. Veterinary microbiology 1987; 14(3): 225-232.
42. Phumoonna T, Barton MD, Vanniasinkam T, Heuzenroeder MW. Chimeric vapA/groEL2 DNA vaccines enhance clearance of *Rhodococcus equi* in aerosol challenged C3H/He mice. Vaccine 2008; 26(20): 2457-2465.
43. Johnson JA, Prescott JF, Markham RJF. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intrabronchial challenge. Veterinary pathology 1983; 20(4): 440-449.
44. Gotoh K, Mitsuyama M, Imaizumi S, Kawamura I, Yano I. Mycolic acid-containing glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi* for mice. Microbiology and immunology 1991; 35(3): 175-185.
45. Hondalus MK. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. Veterinary microbiology 1997; 56(3-4): 257-268.
46. Giguere S, Prescott JF. Virulence mechanism of, and immunity to, *Rhodococcus equi*: a review. In Proc Int Conf Equine Infect Dis 1998; Vol. 8: 103-110.
47. Garton NJ, Gilleron M, Brando T et al. A Novel Lipoarabinomannan from the Equine Pathogen *Rhodococcus equi* Structure and effect on macrophage cytokine production. Journal of Biological Chemistry 2002; 277(35): 31722-31733.

48. Von Bargen K, Haas A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. FEMS microbiology reviews 2009; 33(5): 870-891.
49. Rodríguez-Lázaro D, Lewis DA, Ocampo-Sosa AA et al. Internally controlled real-time PCR method for quantitative species-specific detection and *vapA* genotyping of *Rhodococcus equi*. Appl. Environ. Microbiology 2006; 72(6): 4256-4263.
50. Byrne BA, Prescott JF, Palmer GH et al. Virulence Plasmid of *Rhodococcus equi* Contains Inducible Gene Family Encoding Secreted Proteins. Infection and immunity 2001; 69(2): 650-656.
51. Ren J, Prescott JF. Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. Veterinary microbiology 2003; 94(2): 167-182.
52. Muscatello G, Anderson GA, Gilkerson JR, Browning GF. Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(9): 6152-6160.
53. Hines MT. *Rhodococcus equi*. Equine infectious diseases 2007; 281-295.
54. Benoit S, Benachour A, Taouji S, Auffray Y, Hartke A. H₂O₂, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. Infection and immunity 2002; 70(7): 3768-3776.
55. Takai S, Son WG, Lee DS et al. *Rhodococcus equi* virulence plasmids recovered from horses and their environment in Jeju, Korea: 90-kb type II and a new variant, 90-kb type V. Journal of veterinary medical science 2003; 65(12): 1313-1317.
56. Kanno T, Asawa T, Ito H et al. Restriction map of a virulence-associated plasmid of *Rhodococcus equi*. Plasmid 1993; 30(3): 309-311.
57. Takai S, Sekizaki T, Ozawa T et al. Association between a large plasmid and 15-to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. Infection and immunity 1991; 59(11): 4056-4060.
58. Haïtes RE, Muscatello G, Begg AP, Browning GF. Prevalence of the virulence-associated gene of *Rhodococcus equi* in isolates from infected foals. Journal of clinical microbiology 1997; 35(6): 1642-1644.
59. Hashikura S, Higuchi T, Taharaguchi S et al. Evaluation of nasotracheal aspiration as a diagnostic tool for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. Equine veterinary journal 2000; 32(6): 560-564.
60. Takai S, Lie M, Watanabe Y, Tsubaki S, Sekizaki T. Virulence-associated 15-to 17-kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens. Infection and immunity 1992; 60(7): 2995-2997.
61. Takai S, Fukunaga N, Ochiai S et al. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. Journal of clinical microbiology 1996; 34(4): 1034-1037.
62. Tan C, Prescott JF, Patterson MC, Nicholson VM. Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. Canadian Journal of Veterinary Research 1995; 59(1): 51.

63. Heidmann P, Madigan JE, Watson JL. *Rhodococcus equi* pneumonia: clinical findings, diagnosis, treatment and prevention. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2006; 5(3): 203-210.
64. Martens RJ, Takai S, Cohen ND et al. Association of disease with isolation and virulence of *Rhodococcus equi* from farm soil and foals with pneumonia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000; 217(2): 220-225.
65. Barton MD, Embury DH. Studies of the pathogenesis of *Rhodococcus equi* infection in foals. *Australian veterinary journal* 1987; 64(11): 332-339.
66. Zink MC, Yager JA, Prescott JF, Fernando MA. Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. *Veterinary microbiology* 1987; 14(3): 295-305.
67. Lührmann A, Mauder N, Sydor T et al. Necrotic death of *Rhodococcus equi* -infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. *Infection and immunity* 2004; 72(2): 853-862.
68. Garton NJ, Gilleron M, Brando T et al. A Novel Lipoarabinomannan from the Equine Pathogen *Rhodococcus equi* STRUCTURE AND EFFECT ON MACROPHAGE CYTOKINE PRODUCTION. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(35): 31722-31733.
69. Tjelle TE, Lovdal T, Berg T. Phagosome dynamics and function. *Bioessays* 2000; 22(3): 255-263.
70. Kakuda T, Miyazaki S, Hagiuda H, Takai S. Transcriptional regulation by VirR and VirS of members of the *Rhodococcus equi* virulence-associated protein multigene family. *Microbiology and immunology* 2015; 59(8): 495-499.
71. Hondalus MK, Mosser DM. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infection and immunity*, 1994; 62(10): 4167-4175.
72. Breathnach CC, Sturgill-Wright T, Stiltner JL et al. Foals are interferon gamma-deficient at birth. *Veterinary immunology and immunopathology* 2006; 112(3-4): 199-209.
73. Dawson TR, Horohov DW, Meijer WG, Muscatello G. Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. *Veterinary immunology and immunopathology* 2010; 135(1-2): 1-11.
74. Giguère S, Prescott JF. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary microbiology* 1997; 56(3-4): 313-334.
75. Falcon J, Smith BP, O'Brien TR, Carlson GP, Biberstein E. Clinical and radiographic findings in *Corynebacterium equi* pneumonia of foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1985; 186(6): 593-599.
76. Martens RJ, Fiske RA, Renshaw HW. Experimental subacute foal pneumonia induced by aerosol administration of *Corynebacterium equi*. *Equine veterinary journal* 1982; 14(2): 111-116.

77. Ramirez S, Lester GD, Roberts GR. Diagnostic contribution of thoracic ultrasonography in 17 foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2004; 45(2): 172-176.
78. Knottenbelt DC, Pascoe RR. Diseases and disorders of the horse. Mosby. An affiliate of Elsevier Science Limited 1994.
79. Hillidge CJ. Review of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* lung abscesses in foals: pathogenesis, diagnosis and treatment. *The Veterinary Record* 1986; 119(11): 261-264.
80. Reuss SM, Chaffin MK, Cohen ND. Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infection in foals: 150 cases (1987–2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2009; 235(7): 855-863.
81. Patterson-Kane JC, Donahue JM, Harrison LR. Placentitis, fetal pneumonia, and abortion due to *Rhodococcus equi* infection in a Thoroughbred. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2002; 14(2): 157-159.
82. Muscatello G, Gerbaud S, Kennedy C et al. Comparison of concentrations of *Rhodococcus equi* and virulent *R. equi* in air of stables and paddocks on horse breeding farms in a temperate climate. *Equine veterinary journal* 2006; 38(3): 263-265.
83. Hillidge CJ. Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Veterinary microbiology* 1987; 14(3): 337-342.
84. Witkowski L, Kaba J, Rzewuska M et al. Development of ELISA test for determination of the level of antibodies against *Rhodococcus equi* in equine serum and colostrum. *Veterinary immunology and immunopathology* 2012; 149(3-4): 280-285.
85. Prescott JF, Travers M, Yager-Johnson JA. Epidemiological survey of *Corynebacterium equi* infections on five Ontario horse farms. *Canadian journal of comparative medicine* 1984; 48(1): 10.
86. Weinstock DM, Brown AE. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 34(10): 1379-1385.
87. Vanniasinkam T, Barton MD, Heuzenroeder MW. B-Cell Epitope Mapping of the VapA Protein of *Rhodococcus equi*: Implications for Early Detection of *R. equi* Disease in Foals. *Journal of clinical microbiology* 2001; 39(4): 1633-1637.
88. Sellon DC, Besser TE, Vivrette SL, McConnico RS. Comparison of Nucleic Acid Amplification, Serology, and Microbiologic Culture for Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals. *Journal of clinical microbiology* 2001; 39(4): 1289-1293.
89. Woolcock JB, Farmer AM, Mutimer MD. Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. *Journal of clinical microbiology* 1979; 9(5): 640-642.
90. Muscatello G, Gilkerson JR, Browning GF. Comparison of two selective media for the recovery, isolation, enumeration and differentiation of *Rhodococcus equi*. *Veterinary microbiology* 2007; 119(2-4): 324-329.
91. von Graevenitz A, Pünter-Streit V. Development of a new selective plating medium for *Rhodococcus equi*. *Microbiology and immunology* 1995; 39(4): 283-284.

92. Rowbotham TJ, Cross T. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *Microbiology* 1977; 100(2): 231-240.
93. Makrai L, Fodor L, Vendég I et al. Comparison of selective media for the isolation of *Rhodococcus equi* and description of a new selective plating medium. *Acta Veterinaria Hungarica* 2005; 53(3): 275-285.
94. Barton MD, Hughes KL. Comparison of three techniques for isolation of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* from contaminated sources. *Journal of clinical microbiology* 1981; 13(1): 219-221.
95. Prescott JF, Hoffman AM. *Rhodococcus equi*. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1993; 9(2): 375-384.
96. Takai S, Narita K, Ando K, Tsubaki S. Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in soil on a horse-breeding farm. *Veterinary microbiology* 1986; 12(2): 169-177.
97. Takai S, Ohbushi S, Koike K et al. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. *Journal of clinical microbiology* 1991; 29(12): 2887-2889.
98. Yamshchikov AV, Schuetz A, Lyon GM. *Rhodococcus equi* infection. *The Lancet infectious diseases* 2010; 10(5): 350-359.
99. Silva PD, Miyata M, Sato DN et al. *Rhodococcus equi* isolation from sputum of patients with suspected tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2010; 105(2): 199-202.
100. Bell KS, Philp JC, Christofi N, Aw DWJ. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. *Letters in applied microbiology* 1996; 23(2): 72-74.
101. Giguère S, Cohen ND, Keith Chaffin M et al. *Rhodococcus equi*: Clinical Manifestations, Virulence, and Immunity. *Journal of veterinary internal medicine* 2011; 25(6): 1221-1230.
102. Oldfield C, Bonella H, Renwick L et al. Rapid determination of *vapA/vapB* genotype in *Rhodococcus equi* using a differential polymerase chain reaction method. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004; 85(4): 317-326.
103. Muscatello G. Effects of farm management on ecology of virulent *Rhodococcus equi* (Doctoral dissertation) 2005.
104. Takai S, Ogawa K, Fukunaga N et al. Isolation of virulent *Rhodococcus equi* from native Japanese horses. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 2001; 24(2): 123-133.
105. Becu T, Kakuda T, Tsubaki S, Takai S. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil collected from 5 horse-breeding farms in Argentina. *J Equine Sci* 2000; 11: 23-7.
106. Makrai L, Takai S, Tamura M et al. Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Vet Microbiology* 2002; 88: 377-84.
107. Martens RJ, Takai S, Cohen ND et al. *Rhodococcus equi*: prevalence and virulence in foals with spontaneous pneumonia and soil of horse-breeding farms in Texas. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 220-5.

108. Takai S, Henton MM, Picard JA, Guthrie AJ, Fukushi H, Sugimoto C. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil collected from 2 horse farms in South Africa and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in the isolates from infected foals, dog and monkey. Onderstepoort J Vet Res 2001; 68: 105-10.
109. Yuyama T, Yusa S, Yoshizumi K, et al. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* in thoroughbred horses in Kagoshima. J Vet Med Sci 2002; 64: 715-8
110. Tel OY, Keskin O, Gürbilek SE. Isolation of virulent *Rhodococcus equi* from Arabian horses in Şanlıurfa, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2016; 40(4): 417-420.
111. Witkowski L, Rzewuska M, Takai S et al. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates from horses in Poland: pVapA characteristics and plasmid new variant, 85-kb type V. BMC veterinary research 2016; 13(1): 35.
112. Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. Karaelmas Science and Engineering Journal 2012; 2(1): 53-62.
113. Soedaranto I, Zhicai W, Setyamahananit A, Lammler C. Pheno-and genotyping of *Rhodococcus equi* isolated from faeces of healthy horses and cattle. Research in veterinary science 1998; 64(3): 181-185.
114. Venner M, Meyer-Hamme B, Verspohl JS et al. Genotypic characterization of VapA positive *Rhodococcus equi* in foals with pulmonary affection and their soil environment on a warmblood horse breeding farm in Germany. Research in veterinary science 2007; 83(3): 311-317.
115. Son WG, Lee DS, Yamatoda N et al. Molecular typing of VapA-positive *Rhodococcus equi* isolates from Jeju native horses, Korea. Journal of veterinary medical science 2006; 68(3): 249-253.
116. Witkowski L, Rzewuska M, Cisek AA et al. Prevalence and genetic diversity of *Rhodococcus equi* in wild boars (*Sus scrofa*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Poland. BMC microbiology 2015; 15(1): 110.
117. Muscatello G. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal—Part 2: Diagnostics, treatment and disease management. The Veterinary Journal 2012; 192(1): 27-33.
118. Sweeney CR, Sweeney RW, Divers TJ. *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: Response to antimicrobial therapy. Veterinary Microbiology 1987; 14: 329–336.
119. Jacks S, Giguere S, Gronwall RR, Brown MP, Merritt KA. Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals. American Journal of Veterinary Research 2001; 62: 1870–1875
120. Jacks S, Giguere S, Gronwall RR, Brown MP, Merritt KA. Disposition of oral clarithromycin in foals. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics 2002; 25(5): 359-362.
121. Giguère S, Lee EA, Guldbech KM, Berghaus LJ. In vitro synergy, pharmacodynamics, and postantibiotic effect of 11 antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*. Veterinary microbiology 2012; 160(1-2): 207-213.

122. Venner M, Peters J, Höhensteiger N et al. Concentration of the macrolide antibiotic tulathromycin in broncho-alveolar cells is influenced by comedication of rifampicin in foals. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2010; 381(2): 161-169.
123. Carlson K, Kuskie K, Chaffin K et al. Antimicrobial activity of tulathromycin and 14 other antimicrobials against virulent *Rhodococcus equi* in vitro. *Vet Ther* 2010; 11(2): E1-E9.
124. Womble A, Giguere S, Lee EA. Pharmacokinetics of oral doxycycline and concentrations in body fluids and bronchoalveolar cells of foals. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2007; 30(3): 187-193.
125. Giguère S, Lee E, Williams E et al. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R equi*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010; 237(1): 74-81.
126. Stratton-Phelps M, Wilson WD, Gardner IA. Risk of adverse effects in pneumonic foals treated with erythromycin versus other antibiotics: 143 cases (1986–1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000; 217(1): 68-73.
127. Horowitz ML, Cohen ND, Takai S et al. Application of Sartwell's model (lognormal distribution of incubation periods) to age at onset and age at death of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia as evidence of perinatal infection. *Journal of veterinary internal medicine* 2001; 15(3): 171-175.
128. Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ. Chemoprophylactic effects of azithromycin against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia among foals at equine breeding farms with endemic infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2008; 232(7): 1035-1047.
129. Venner M, Reinhold B, Beyerbach M, Feige K. Efficacy of azithromycin in preventing pulmonary abscesses in foals. *The Veterinary Journal* 2009; 179(2): 301-303.
130. Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W et al. In vitro activity of citropin 1.1 alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56(2): 410-412.
131. Harrington JR, Martens RJ, Cohen ND, Bernstein LR. Antimicrobial activity of gallium against virulent *Rhodococcus equi* in vitro and in vivo. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2006; 29(2): 121-127.
132. Martens RJ, Mealey K, Cohen ND et al. Pharmacokinetics of gallium maltolate after intragastric administration in neonatal foals. *American journal of veterinary research* 2007; 68(10): 1041-1044.
133. Martens RJ, Miller NA, Cohen ND et al. Chemoprophylactic antimicrobial activity of gallium maltolate against intracellular *Rhodococcus equi*. *Journal of equine veterinary science* 2007; 27(8): 341-345.
134. Chaffin MK, Fajt V, Martens RJ et al. Pharmacokinetics of an orally administered methylcellulose formulation of gallium maltolate in neonatal foals. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2010; 33(4): 376-382.

135. Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ, O'Connor M, Bernstein L. Chemoprophylactic effects of gallium maltolate against *Rhodococcus equi* pneumonia among foals at endemic equine breeding farms. Proceedings, 55th Annu. Meet. Am. Assoc. Eq. Pract 2009; 55: 36-37.
136. Hurley JR, Begg AP. Failure of hyperimmune plasma to prevent pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. Australian veterinary journal, 1995; 72(11): 418-420.
137. Giguère S, Gaskin JM, Miller C, Bowman JL. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. Journal of the American Veterinary Medical Association 2002; 220(1): 59-63.
138. Lopez AM, Hines MT, Palmer GH, Alperin DC, Hines SA. Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2002; 9(6): 1270-1276.
139. Madigan JE, Hietala S, Muller N. Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. Journal of reproduction and fertility. Supplement 1991; 44: 571-578.
140. Varga J, Fodor L, Rusvai M, Soos I, Makrai L. Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. Veterinary microbiology, 1997; 56(3-4): 205-212.
141. Cauchard J, Sevin C, Ballet JJ, Taouji S. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. Veterinary microbiology 2004; 104(1-2): 73-81.
142. Becu T, Polledo G, Gaskin JM. Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. Veterinary microbiology 1997; 56(3-4): 193-204.
143. Chaffin MK, Martens RJ, Martens JG, Fiske RA. Therapeutic effects of immune plasma in foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. Equine veterinary journal 1991; 23(S12): 23-29.
144. Horowitz ML, Cohen ND, Takai S et al. Application of Sartwell's model (lognormal distribution of incubation periods) to age at onset and age at death of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia as evidence of perinatal infection. Journal of veterinary internal medicine 2001; 15(3): 171-175.
145. Erganiş O, Hadimli HH, Sayin Z et al. Efficacy of experimental inactivated and live *Rhodococcus equi* vaccines for thoroughbred Arabian mares in mice. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 2015; 39(3): 295-301.
146. Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ. Evaluation of equine breeding farm management and preventative health practices as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. Journal of the American Veterinary Medical Association 2003; 222(4): 476-485.
147. Cohen ND, O'Connor MS, Chaffin MK, Martens RJ. Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. Journal of the American Veterinary Medical Association 2005; 226(3): 404-413.

148. Hébert L, Cauchard J, Doligez P et al. Viability of *Rhodococcus equi* and *Parascaris equorum* eggs exposed to high temperatures. *Current microbiology* 2010; 60(1): 38-41.
149. Kuskie KR, Smith JL, Wang N et al. Effects of location for collection of air samples on a farm and time of day of sample collection on airborne concentrations of virulent *Rhodococcus equi* at two horse breeding farms. *American journal of veterinary research* 2011; 72(1): 73-79.
150. Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ, Edwards RF, Nevill M. Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia on farms with endemic infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2003; 223(12): 1791-1799.
151. Kasap S, Çatık S, Kennerman E ve ark. Alt Solunum Sistemi Hastalığına Sahip Taylarda Bronkoalveolar Lavaj Sıvısının Bakteriolojik ve Sitolojik Değerlendirilmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2015; 21(3).
152. Özsoy ŞY, Hazıroğlu R. The pathological findings of *Rhodococcus equi* infection and its diagnosis with immunoperoxidase technique in foals. *Vet. J. Ankara Univ* 2009; 56: 207-213.
153. Sonmez K, Gurel A, Takai S. Immunocytochemical detection of *Rhodococcus equi* in tracheal washes of foals. *Journal of comparative pathology* 2011; 145(1): 6-11.
154. Gressler LT, Machado G, da Silveira BP et al. Prevalence of *Rhodococcus equi* from the nasal cavity of 1010 apparently healthy horses. *Equine veterinary journal* 2018; 50(5): 667-671.
155. Krewer CDC, Spricigo DA, Botton SDA et al. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates of horse breeding farms from an endemic region in South of Brazil by multiplex PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; 39(1): 188-193.
156. Muscatello G, Gilkerson JR, Browning GF. Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. *Journal of clinical microbiology* 2009; 47(3): 734-737.
157. Javed R, Taku AK, Sharma RK, Badroo GA. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates in equines. *Veterinary World* 2017; 10(1), 6.
158. Cohen ND, Kuskie KR, Smith JL et al. Association of airborne concentration of virulent *Rhodococcus equi* with location (stall versus paddock) and month (January through June) on 30 horse breeding farms in central Kentucky. *American journal of veterinary research* 2012; 73(10): 1603-1609.
159. Chhabra S, Khurana SK, Kapoor PK et al. Characterization of *Rhodococcus equi* isolates from foals with respiratory problems using a multiplex PCR for the vap genes. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 2015; 3(1s): 28-32.
160. Khurana SK, Singha H, Malik P, Gulati BR, Singh RK. Molecular characterization of clinical isolates of *Rhodococcus equi* with PCR assay based on virulence plasmid marker. *Indian J. Anim Sci* 2015; 85(10): 1063-1066.
161. Tirosh-Levy S, Gürbilek SE, Tel OY, Keskin O, Steinman A. Seroprevalence of *Rhodococcus equi* in horses in Israel. *Journal of the South African Veterinary Association* 2017; 88(1), 1-6.

162. Haites RE, Muscatello G, Begg AP, Browning GF. Prevalence of the virulence-associated gene of *Rhodococcus equi* in isolates from infected foals. *Journal of clinical microbiology* 1997; 35(6): 1642-1644.
163. CLSI. (2004) Document M31-S1: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. 24(17): 1-33.
164. CLSI (2013) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty-Third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
165. Morton AC, Baseggio N, Peters MA, Browning GF. Diversity of isolates of *Rhodococcus equi* from Australian thoroughbred horse farms. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998; 74(1-3): 21-25.
166. Woolcock JB, Mutimer MD, Farmer AT. Epidemiology of *Corynebacterium equi* in horses. *Research in veterinary science* 1980; 28(1): 87-90.
167. Hoffman AM, Viel L. Techniques for sampling the respiratory tract of horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1997; 13(3): 463-475.
168. Venner M, Heyers P, Strutzberg-Minder K et al. Detection of *Rhodococcus equi* by microbiological culture and by polymerase chain reaction in samples of tracheobronchial secretions of foals. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 2007; 120(3-4): 126-133.
169. Khurana SK, Praveen M, Nitin V, Singh BR. Prevalence of *Rhodococcus equi* infection in foals. *Indian Journal of Veterinary Research* 2009; 18(1): 20-22.
170. Ahmad Mir I, Kumar B, Taku A et al. The study of aerobic bacterial flora of the upper respiratory tract of equines from Jammu and Kashmir region of India. *Veterinary World* 2013; 6(9).
171. Gutema DF, Duguma BE, Dinka AG. Isolation and identification of aerobic bacterial flora from the upper respiratory tract of donkeys in central Ethiopia. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 2009; 7(4): 181-189.
172. Amies CR. A modified formula for the preparation of Stuart's transport medium. *Canadian Journal of Public Health/Revue Canadienne de Sante'e Publique*, 1967; 58(7): 296-300.
173. Takai S, Tharavichitkul P, Sasaki C et al. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with acquired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2002; 66(1): 52-55.
174. Costa MM, Machado SA, Krewer CC et al. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* in mice, isolated from environment, human and horse clinical samples. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2006; 26(3): 167-170.
175. Halbert ND, Reitzel RA, Martens RJ, Cohen ND. Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the *vapA* gene. *American journal of veterinary research* 2005; 66(8): 1380-1385.

176. Monego F, Maboni F, Krewer C et al. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farms by means of multiplex PCR for the vap gene family. *Current microbiology* 2009; 58(4): 399-403.
177. Burton AJ, Giguere S, Sturgill TL et al. Macrolide-and rifampin-resistant *Rhodococcus equi* on a horse breeding farm, Kentucky, USA. *Emerging infectious diseases* 2013; 19(2): 282.
178. Riesenberger A, Feßler AT, Erol E et al. MICs of 32 antimicrobial agents for *Rhodococcus equi* isolates of animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; 69(4): 1045-1049.
179. Asoh N, Watanabe H, Fines-Guyon M et al. Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* with several types of mutations in the rpoB gene among AIDS patients in northern Thailand. *Journal of clinical microbiology* 2003; 41(6): 2337-2340.
180. Fines M, Pronost S, Maillard K, Taouji S, Leclercq R. Characterization of Mutations in the rpoB Gene Associated with Rifampin Resistance in *Rhodococcus equi* Isolated from Foals. *Journal of clinical microbiology* 2001; 39(8): 2784-2787.
181. Ribeiro MG, Takai S, Guazzelli A et al. Virulence genes and plasmid profiles in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. *Research in veterinary science* 2011; 91(3): 478-481.
182. Soedarmanto I, Oliveira R, Lämmle C, Dürrling H. Identification and epidemiological relationship of *Rhodococcus equi* isolated from cases of lymphadenitis in cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology* 1997; 286(4): 457-467.
183. Bolton T, Kuskie K, Halbert N et al. Detection of Strain Variation in Isolates of *Rhodococcus equi* from an Affected Foal Using Repetitive Sequence–Based Polymerase Chain Reaction. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2010; 22(4): 611-615.
184. Şehu A. (2002). At Besleme.
185. Küçük O. Koşu ve iş atlarının beslenmesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2006; 3(1): 43-51.
186. National Research Council (NRC). *Nutrient Requirements of Horses* 1989; Washington DC: National Academy Press.

9. ÖZGEÇMİŞ

29.10.1989 tarihinde Elazığ ilinde doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi aynı ilde tamamladıktan sonra 2008 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandım ve 2013 yılında Veteriner Hekim unvanıyla mezun oldum. Aralık 2013'de Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım. Şubat 2014 döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora programını kazandım. Halen Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.