T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATLARDA *RHODOCOCCUS EQUI'*NİN SEROLOJİK TEŞHİSİ İÇİN *R. EQUI* VAP A PROTEİNİNDEN ELISA KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

Merve Seyyide TEMİMHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ

KONYA-2018

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATLARDA *RHODOCOCCUS EQUI'*NİN SEROLOJİK TEŞHİSİ İÇİN *R. EQUI* VAP A PROTEİNİNDEN ELISA KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

Merve Seyyide TEMİMHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ

KONYA-2018

ÖNSÖZ

Rhodococcus equi, tüm dünyada yaygın olarak görülen özellikle 1-6 aylık tayları etkileyen fakültatif hücre içi bakteridir. Primer konakçısı olan taylarda granülomatöz pnömoni oluşturmaktadır. Bunun sonucu taylarda yüksek oranda performans düşüklüğü gerçekleşmektedir. Bu durum özellikle yarış atı olarak yetiştirilen taylarda büyük problemlere neden olmaktadır. Ülkemizde de arap atı yetiştiriciliğinin yapıldığı haralarda ve at yetiştirme çifliklerinde değişik derecelerde mortalite ve mobidite neden olan Rhodococcus pnömonisi görülmekte ve bu durum büyük ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır. O nedenle, hastalığın erken teşhisi hastalıkla mücadele açısından önemlidir.

R. equi enfeksiyonlarının teşhisinde, hasta hayvanlardan alınan bronko-alveolar lavaj (BAL) örneklerinden etken izolasyonu ve identifikasyonu altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, şüpheli hayvanlardan tam kan sayımı, akciğer radyografisi gibi klinik muayene yöntemleri teşhisi desteklemek için yararlanılan metotlardır. Klinik bulgulara dayanan teşhis metodlarının *R. equi* pnömonisine spesifik olmaması, hastalığın teşhisinde yeni metodların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Bu çalışmada, *R. equi*'nin Vap A proteini kullanılarak bir ELISA kiti geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Böylece, erken teşhiş için daha yüksek doğrulukla ve hızlı sonuç verebilecek teşhis kiti geliştirilerek erken dönemde hasta hayvanların teşhisi ile etkenin diğer taylara bulaşması engellenerek ekonomik kayıp önlenecek ve eradikasyona katkı sağlanacaktır.

Bu araştırmanın yapılmasında araştırmayı maddi olarak destekleyen Bilimsel Araştırma Projesi Koordinatörlüğü (BAP)' ne, yüksek lisans eğitimi süresince yapılacak bilimsel çalışmaların kaliteli, özgün, zorluk derecesi gözetmeksizin daha önce yapılmayanı gerçekleştirmek, zoru başarmak ve sonrakilere faydalı olmak amacı ile gereklilikleri ön plana çıkaran, deneysel çalışmaların her aşamasında bana destek olan benden yardımlarını, desteğini, sabrını ve bilgisini esirgemeyen değerli

hocam, danışmanım Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ'ye, yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yardım ve tavsiyelerini hiç esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasında bana desteğini sunan değerli hocam Prof. Dr. Osman ERGANİŞ'e, yüksek lisans eğitimim süresince bana destek olan Prof. Dr. Sibel YAVRU hocama ve son olarak Doç. Dr. Zafer SAYIN hocama teşekkürleri bir borç bilirim.

Ayrıca bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan dualarını üzerimden hiç eksik etmeyen aileme çok teşekkür ederim.

Seyyide Merve TEMİMHAN

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI
ÖNSÖZ
İÇİNDEKİLER
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
ÖZET ix
SUMMARY x

1. GİRİŞ 1
1.1. TARİHÇE 3
1.2. TOKSONOMİ 4
1.3. ETİYOLOJİ 6
1.4. EPİDEMİYOLOJİ 8
1.5. VİRÜLENS 10
1.6. PATOGENEZ 13
1.7. BAĞIŞIKLIK 17
1.7.1. Hücresel Bağışıklık 17
1.7.2. Humoral Bağışıklık 17
1.8. KLİNİK BULGULAR 22
1.8.1. Atlardaki Klinik Bulgular 22
1.8.1.1. Taylarda Klinik Bulgular 22
1.8.1.2. Yetişkin Atlarda Klinik Bulgular 24
1.8.2. Diğer Hayvanlardaki Klinik Bulgular 25
1.8.3. İnsanlardaki Klinik Bulgular 27
1.9. TEŞHİS METODLARI 28
1.9.1. Klinik Labaratuar Yöntemleri 28
1.9.2. Bakteriyoskopi ve Kültür 29
1.9.3. Serolojik Laboratuvar Yöntemleri 31
1.9.3.1. Agar jel immünüdiffüzyonu (AGID) 31
1.9.3.2. *Rhodococcus equi* Opsonizasyon Testi 31
1.9.3.3. Western Blot Analiz Testi 32
1.9.3.4. Sinerjik Hemoliz Baskılanması (SHI) 32
1.9.3.5. *Rhodococcus equi* Süpernatant Protein Deri Testi 33

1.9.3.6. Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 33
1.9.4. Moleküller Metodlar 34
1.9.4.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 34
1.10. TEDAVİ 35
1.11. KORUNMA 36
1.11.1. Hipper İmmun Plazma 36
1.11.2. Aşılama 38
2. GEREÇ VE YÖNTEM 43
2.1. GEREÇ 43
2.1.1. Hayvan Materyali 43
2.1.2. Serum Örnekleri 43
2.1.3. Vap A Antijeni 44
2.1.3.1. BHI Buyyon 44
2.1.3.2. TBS Yıkama Solüsyonu 44
2.1.4. ELISA 44
2.1.4.1. Kaplama Antijeni 44
2.1.4.2. Antjen Kaplama Bufferi 45
2.1.4.3. Serum ve Konjugat Diluenti 45
2.1.4.4. Yıkama Solüsyonu 45
2.1.4.5. Bloklama Solüsyonu 45
2.1.4.6. Konjugat 1/5000 45
2.1.4.7. Substrat Solüsyonu 46
2.1.4.8. Enzim Stop Solüsyonu 46
2.1.4.9. ELISA okuyucu 46
2.2. YÖNTEM 46
2.2.1. Vap A antijeni'nin Yapılışı 46
2.2.2. Antijen Miktarı ve Serum Titresinin Belirlenmesi 47
2.2.3. Konjugat Titresinin Belirlenmesi 48
2.2.4. Pozitif ve Negatif Kontrol Serum Örnekleri 48
2.2.5. ELISA Yapılışı 48
2.2.6. Sonuçların Değerlendirimesi 49
2.2.6.1. OD ve Titre hesaplama 51

3. BULGULAR 53

3.1.1. *Rhodococcus equi* ile Aşılanan Kısrakların Antikor Titreleri 53

4. TARTIŞMA 57

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 61

6. KAYNAKLAR 62

7. EKLER 75

8. ÖZGEÇMİŞ 76

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
AGID	Ağar jel immünüdiffüzyonu
BAL	Bronko alveolar lavaj
BALB/c	Albino laboratuvar fare türü
CD	Yüzey farklılaşma molekülleri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
Fc reseptörü	İmmunglobulinlerin Fc yüzey almacı
G	Guanin nükleotidi
H_2S	Hidrojen Sülfür
IFN-ɣ	İnterferon gama
Ig	İmmunglobulin
IL	İnterlökin
Kb	Kilo Baz
kDa	Kilo Dalton
Mac	Membran atak kompleksi
MHC	Mayör doku uyuşum kompleksi
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NANAT	Nalidiksik asit-novabiosin, siklohekzimid-potasyum tellürit
NK hücreler	Doğal öldürücü hücreler
NLRs	Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi
NOD	Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon bölge reseptörleri
NOS	Nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NRAMP	Doğal direnç ilişkili makrofaj proteinleri
NRAMP1	Doğal dirençle ilgili makrofaj molekülü
OD	Optik dansite
PAMPs	Patojen ilişkili moleküler kalıplar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

ReqLAM	*Rodococcus equi* lipoarabinomannam'ı
SC	Subkutan
SHI	Sinerjik hemoliz baskılanması
T	Timin nükleotiti
TBA	Trakeobronşial aspirasyon
Th	Yardımcı T hücreleri
TLR	Toll like reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-alfa

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Atlarda *Rhodococcus equi* 'nin Serolojik Teşhisi için R. Equi Vap A proteininden ELISA kiti Geliştirilmesi

Merve Seyyide TEMİMHAN
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2016

Rhodococcus equi 1-6 aylık taylarda prulent granülomatöz pnömoniye neden olan fakültatif hücre içi bir patojendir. *R. equi* taylarda ciddi ekonomik kayıplara sebep olamsından dolayı teşhisi önemli olmaktadır. Bu çalışmada, *R. equi*'nin Vap A proteini kullanılarak bir ELISA kiti geliştirilmesi ve değerlendirilmesi amaçlandı.

R.equi suşundan Vap A proteini pürifiye edildi. Vap A ile mikropleytler kaplandı, ELISA kiti ve protokolü hazırlandı. Bakteri+VapA+Montanid IMS 3012 aşısı ile 3 kez aşılanan kısrakların ve HI plazma verilen tayların serum örnekleri hazırlanan ELISA kiti ile test edildi.

Aşılamalar ve doğum sonrası alınan serum ve kolostrum örneklerinde ELISA ile OD değerlerinin veya antikor titrelerinin oldukça yüksek olduğu tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştığında; aşılanan kısrakların serum örneklerinin OD değerinin veya antikor titrelerinin daha yüksek ve anlamlı olduğu gözlendi.

Sonuç olarak, antijen olarak Vap A proteini kullanılarak hazırlanan ELISA kitinin; *R. equi* hücre+Vap A aşısı ile aşılanan kısrakların ve taylaının serum örnekerinde Vap A antikorlarının belirlenmesinde uygun ve yeterli olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar sözcükler: *Rhodococcus equi*, seroloji, ELISA, Vap A protein

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL of HEALTH SCIENCES

The Development of ELISA Kit from *Rhodococcus* equi Vap A protein for Serological diagnosis of *R. equi* in Horses

Merve Seyyide TEMİMHAN

DEPARTMENT of MICROBIOLOGY (VET)

Danışman

Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ

MASTER THESIS/ KONYA-2016

Rhodococcus equi is a facultative intracellular pathogen that causes prulent granulomatous pneumonia at 1-6 months of age. *R. equi* is important because it causes serious economic loss in the foals. In this study, it was aimed to develop and evaluate an ELISA kit using *R. equi* Vap A protein.

The Vap A protein was purified from *R. equi* S1 2002 strain. Microplate coated with Vap A, ELISA kit and protocol were prepared. Serum samples of mares vaccinated 3 times with Bacteria + VapA + Montanid IMS 3012 vaccine and HI plasma-fed sera were tested by ELISA kit prepared.

In the vaccination and postnatal serum and colostrum samples, the OD values or antibody titers were found to be very high by ELISA. When compared with the control group; it was observed that the OD value or antibody titers of the serum samples of the vaccinated mares were higher and more significant.

As a result, ELISA kit prepared using Vapa protein as antigen; it was concluded that mares vaccinated with *R. equi* whole cell + Vap A vaccine were suitable and adequate in the detection of Vap A antibodies in serum samples.

Keywords: *Rhodococcus equi*, serology, ELISA, Vap A protein

1. GİRİŞ

Rhodococcus equi 1-6 aylık taylarda purulent granülomatöz pnömoniye neden olan fakültatif hücre içi bir patojendir. Tayların *R. equi* pnömonisi dünyada yaygın olarak görülmekte olup son yıllarda ülkemizde de problem olmaya başlamıştır (Atilli ve ark. 2006, Çetin ve Karaman 1997, Karadaş ve ark. 1997, Özgür ve ark. 2002).

R. equi, memelilerde ilk olarak 1923 yılında Magnusson tarafından İsviçre'de piyogranülomatöz pnömoni tanısı konulan taylardan izole edilmiş ve *Corynebacterium equi* olarak adlandırılmıştır (Rajagopalan ve Gopalakrishman 1938, Holtman 1945). Daha sonra Avustralya, Amerika ve Hindistan'daki taylarda da saptanmıştır (Sönmez 2007). İlerleyen süre zarfında 1939 yılında Bendixen ve Jepsen domuzlarda pulmonel lezyonlarda ve 1940 yılında da Karlson, Moses ve Feldman domuzların submaxillar lenf yumrularında *R. equi*'yi tanımlamışlardır (Holtman 1944). *Corynebacterium equi'*nin nümerik taksonomi, genetik, kimya ve ekoloji çalışmaların sonuçlarına dayanılarak *Nocardia, Corynebacterium* ve *Mycobacterium* cinsine benzeyen fakat bu cinse girmeyen '*Rhodococcus'* cinsine yerleştirmişlerdir (Goodfellow ve Alderson 1977).

R. equi Gram pozitif, sporsuz, hareketsiz, zorunlu aerobik 05-1 µm ile 1-2µm uzunluğunda olan pleomorfik bir bakteridir. Her durumda polisakkarit bir kapsülü mevcuttur. Optimal olarak 28-30°C'de üremektedir (Sönmez 2007). *R. equi* karbonhidratı fermente etmezken, jelatinaz, DNAaz, elastaz, lesitinaz, preyeaz, Sitokrom C ve oksidaz negatiftir. Bunun yanı sıra katalaz, nitrat, proteaz, H_2S, lipaz, fosfotaz ve çoğu kez üreaz pozitiftir. Ayrıca, virülansa bakmaksızın kolesterol oksidaze üretmektedir (Prescott ve ark. 1982, Barton ve Hughes 1980, Kahraman 1997, Weinstock ve Brown 2002, Puthucheary ve ark. 2006).

R. equi'nin aglütinasyon testi ile 27 serotipi olduğu gösterilmiştir (Weinstock ve Brown 2002, Kanat 2006). Farklı hayvan türlerinden izole edilen suşların kapsüler antijenleri ile türe özgü olduğu ve *R. equi'nin* farklı gruplara ayrıldığını tespit edilmiştir (Tan ve ark. 1995, Kanat 2006, Sönmez 2007).

R. equi, virülens ve nonvirülens türleri toprakta yaygın olarak bulunmaktadır (Jubb ve Kennedy 1970). Dışkı içerisinde bulunan *R. equi* sıcak ve kuru havanın etkisi ile çevreyi kontamine etmesi nedeniyle en önemli bulaşma kaynağı kontamine topraktır. Virülens *R. equi* içeren toz partiküllerin inhalasyonu ile tay ve yetişkin atlar arasında yayılma olmaktadır (Takai ve ark 2002). Ayrıca, tayların enfekte balgamları yutmaları ile de etken intestinal dokuya ulaşmaktadır (Takai ve ark. 1986, Takai ve ark. 1991, Tkachuk- Saad ve ark 1991).

R. equi'de taylarda ve yetişkin atlarda temel olarak üç sistem etkilenmektedir. Bunlar solunum sistemi, sindirim sistemi ve iskelet kas sistemidir (Collatos ve ark 1990, Chaffin ve Martens 1997, Giguere ve ark 1999b, Takai ve ark. 2000a, Heidmann ve ark. 2006). Solunum formunda solunum sayısında artış, vücut ısısında yükselme gibi asemptomatik bulgular görülürken, enfeksiyon ilerledikçe iştahsızlık, halsizlik, ateş, solunum sayısında artış ve karın kaslarının solunuma katıldığı solunum güçlüğü gibi bulgular oluşmaktadır (Giguere ve Prescott 1997). Sindirim sistemi bulguları; ateş, halsizlik, iştahsızlık gibi genel bulgularının yanında şiddetli daire ve kolik oluşmaktadır. *R. equi* ayrıca septisemi sonucu karaciğer ve böbrek gibi organları da etkiliyebilir. Bununla birlikte, immün sistemi deprese olmuş insanlarda *R.equi* hastalık oluşturmaktadır (Prescott 1999, Puthucheary 2006).

R.equi enfeksiyonun oluşmasında etkili olan faktörler enfekte doz, enfekte dozun virülensi ve immun cevabın gelişimidir (Takai ve ark. 1985, Zink ve ark 1987). *R.equi,* makrofajların içerisine girerek ve fagozom-lizozom füzyonunu inhibe ederek immun sistemi başarısızlığa uğratmaktadır. *R.equi* konakçıya ilk kez girdiğinde humoral bağışıklık olmadığından, bağışıklık için kısrakların aşılanması ve taylara maternal antikorların transferi veya hiper immün plazma ile hücresel bağışıklığın oluşturulması ile mümkündür (Hines ve ark 1997). T lenfositler ile *R. equi'nin* yok edilmesi iki temel mekanizma ile gerçekleşmektedir; enfekte hücrenin direk sitotoksisitesi ve sitokin sentezlenmesidir (Dawson ve ark 2010). Enfeksiyonun eliminasyonu için antijene karşı spesifik Th1 immun cevabın gerekli olduğu ve Th2 cevabının ise lezyon oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (Hines ve ark 1997).

Teşhis metotları humoral bağışıklığı, adezyon, toksisite ve fagositozdan kaçınmayı tetikleyen virülens faktörlerini belirlemeyi amaçlamaktadır (Hines ve ark 1997). *R. equi*'nin en önemli virülens faktörü 85-90 kb virülens plasmidi tarafından kodlanan 15-17 kDa ağırlığındaki VapA lipoproteinidir. VapA lipoproteinin dikkat çeken özellikleri virulent suşlarda bulunması, 37°C'de (memeli konakçılarının vücut ısılarında) sentezlenmesi, konakçı ile etkileşime girebileceği hücre yüzeyinde bulunması ve etkenin makrofajlar içinde yaşaması için virülent plazmitlerin varlığının gerekliliğidir (Takai ve ark. 1992, Giguere ve Prescott 1998, Lopez ve ark 2002). Ayrıca, VapA IFN-üretimini belirgin olarak uyarmaktadır ve VapA'nın akciğerdeki T lenfosit cevabında hedef antijen olduğunu kanıtlanmıştır (Lopez ve ark 2002). Buda VapA antijeninin önemini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, *R. equi*'nin Vap A proteini kullanılarak bir ELISA kiti geliştirilmesi amaçlandı. Böylece, erken teşhiş için daha yüksek doğrulukla ve hızlı sonuç verebilecek teşhis kiti geliştirilerek erken dönemde hasta hayvanların teşhisi ile etkenin diğer taylara bulaşması engellenerek ekonomik kayıp önlenecek ve eradikasyona katkı sağlanacaktır.

1.1. TARİHÇE

Cins adı olarak *Rhodococcus* terimi ilk kez alman bitki bilimci Wilhelm Friedrich Zopf tarafından 1891 yılında pigment üreten mantar ve bakteriyel organizma sınıflandırılmasında kullanılmıştır (Yamshchikov ve ark 2010). Memelilerde *Rhodococcus equi*, ilk olarak 1923 yılında İşveç'te Magnusson tarafından pyogranülomatöz pneumonisi olan bir tayda izole edilmiş ve *Coryneobacterium equi* olarak isimlendirilmiştir (Rajagopalan ve Gopalakrishnan 1938, Holtman 1944, Prescott 1991, Hondalus 1997). Bununla birlikte, purulent pneumonili taylarda 1923 yılında Miessner ile Wetzel ve Liltje, 1931'de Amerikalı Dimock ile Edwards ve 1937 yılında da Amerikalı Rajagopalan tarafından idendifiye edildiği belirtilmiştir (Holtman 1944). Ayrıca, Liltje etkenin sadece atlarda enfeksiyon oluşturduğunu ve *Corynebacterium pyogenes equi roseum* isimlendirilmesi gerektiğini ileri sürmüştür (Barton ve Hughes 1980).

Daha sonra 1939 yılında Bendixen ve Jepsen domuzlarda pulmoner lezyonlarda ve 1940 yılında da Karlson, Moses ve Feldman domuzların submaxillar lenf yumrularında *R. equi*'yi tanımlamışlardır (Holtman 1944). *R. equi'*nin domuzlarda da enfeksiyon oluşturduğu anlaşılınca Pulm 1940 yılında mikroorganizmanın adının *Corynebacterium Magnusson Holth* olarak değiştirilmesini önermiştir (Barton ve Hughes 1980). Domuzlar ve atlar dışında 1943 yılında Kelser ve Shoening *R. equi* pnömönili buzağıda pulmoner lezyonlarda izole etmişlerdir (Holtman 1944). Ayrıca, pnömonili bir buzağıdan etkeni izole etmiş ve konakcıya bağlı kalmaksızın *R. equi*'nin enfeksiyon oluşturduğu belirtmek için de *Corynebacterium prulentus* ismini önermiştir (Barton ve Hughes 1980).

Corynebacterium equi, nümerik taksonomi, genetik, kimyasal yapısına göre *Nocardia, Corynebacterium* ve *Mycobacterium* cinsine benzeyen fakat bu cinse girmeyen 'rhodococcus' cinsine yerleştirmişlerdir (Goodfellow ve Alderson 1977). Etken, 1987'de gen analizlerine dayanarak *Rhodococcus equi* olarak adlandırılmıştır (Goodfellow 1987, Heidmann ve ark 2006).

Türkiye'de ilk kez 1997 yılında bursa bölgesinde at çifliğinde purulent pnömoniden ölen arap tayında *R. equi* izole edilmiştir (Çetin ve Karaman 1997). Daha sonra, 2000 yılından itibarende Türkiye'de virülens *R. equi* izolasyonu ile hastalığın epidemiyolojisi, klinik belirtileri, tanısı, sağaltımı ve kontrolüne yönelik çalışmalar başlamıştır.

1.2. TOKSONOMİ

R. equi; Rhodococcus cinsine bağlı bir türdür. *Rhodococcus* cinsi *Actinomycetales* takımının *Mycobactericeae* ailesindendir (Tablo 1.1). *Actinomycetales* takımın diğer ismide mycolata'dır ve bu takım ortak özellik olarak kırmızı pigment üreten toprakla ilişkili dokuz türden oluşmaktadır (Sönmez 2007, Meljer ve Prescott 2004, Hines 2007). *Mycolata* takımı yüksek G+C içeren Gram pozitif bakterilerden oluşmaktadır, ayrıca arabinogalaktan duvar polisakkarid ve glikolipidlerine bağlı mikolik asitlerden oluşan benzersiz bir hücre zarfı ile nitelenirler (Meljer ve Prescott 2007).

*Rhodoccou*s cinsi filogenetik grup olarak nocardioform *Actinomycetes* olarak adlandırılan ve bünyesinde *Caseobacter, Coryneobacter, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus* ve *Tsukamurella* cinslerini barındıran gruba dâhildir (Prescott 1991, Heidmann 2006). Nocardioform *Actinomycetes* mikroskopik ve makroskopik olarak çok çeşitliliğe sahiptir ve biyokimyasal özellikleri ile tanımlanırlar. Spesifik özellikleri hücre duvarlarında mikolik asit bulunmasıdır (Goodfellow 1987, Sönmez 2007).

Tablo 1.1. *Rhodococcus* equi taksonomik konumu (Sönmez 2007)

Üst Alem	Bacteria
Şube	Actinobacteria
Sınıf	Actinobacteria
Takım	Actinomycetales
Alt Takım	Corynebacterinae
Aile	Mycobactericeae
Cins	Rhodococcus
Tür	*Rhodococcus equi*

Rhodococcus cinsi heterojen olarak nitelendirilir ve iki gruba bölünebilir. Bu türlerden 48-66 karbon atomlu mikolik asit ve 9 izopren dihidrojen menakinon'a sahip olup, mikobaktin üretenler (*R. bronchialis, R. Rubropectinus ve R. terrae*) ile 34- 52 karbonlu, sayıları ikiye kadar çıkabilen çift bağlı mikolik asit ve 8 izopren dihidrojene menakinon üretirken mikobactin üretemeyen gruptur (Prescott 1991).

1.3. ETİYOLOJİ

R. equi fakültatif, intrasellüler özellikle 3-5 aylık taylarda subakut veya kronik suppuratif pneuminiye neden olan saprofitik olarak toprağa yerleşen insanlar içinde fırsatçı patojendir (Weinstock ve Brown 2002, Puthucheary ve ark. 2006).

R. equi optimum üreme sıcaklığı 28-30°C'dir (Weinstock ve Brown 2002). İrinden yapılan frotilerde ve katı besi üreyenlerde Gram pozitif kok görünümde, bunun yanı sıra eski kolonilerden ve sıvı besi yerinde üreyenlerde Gram pozitif basil şeklinde görülmektedir (Barton ve Hugher 1980, Takai ve ark. 1991b, Puthucheary ve ark. 2006, Kanat 2006). Birbirinden farklı lameller polisakkarit kapsülü ve pilusları vardır (Takai ve ark. 1991c, Puthucheary ve ark. 2006). Yaklaşık olarak 0.5-1x1-2 µm boyutlarında aerobik, hareketsiz ve sporsuzdur (Kanat 2006).

R. equi hücre duvarı arabinogalaktan polisakkarid ve glikolipidleriyle bağlantılı mikolik asitten oluşmaktadır. Lipoarabinomannan'ı terminal mannoz içeren yan zincirleri vardır (Garton ve ark. 2002, Yamshchikov ve ark. 2010). Bu özellik hücre duvarında periplazmik aralık meydana getirmekte ve hidrofilik birleşenlere bir geçirgenlik engeli oluşturmaktadır (Meljer ve Prescott 2004). Hücre duvarındaki mikolik asit varlığı kendisi gibi hücre duvarında mikolik asit bulunan *Mycobacterium* ve *Nocardia* cinsleri ile karışmasına neden olmaktadır. *Rhodococcus* ssp. diğer cinslerden ayırmak için alfa presipitojenler den yararlanılmaktadır (Kahraman 1997).

R. equi konakçısına göre bazı biyokimyasal özellikleri farklılık gösterebilmektedir. Domuz, sığır, kedi, köpek ve insandan alınan bazı virülens *R. equi* suşları sitokrom C üretmiş, eskülin ve sodyum hippuratı hidrolize edebilmişlerdir. Bu farklılığın nedenleri tam olarak ortaya konulamamıştır (Prescott ve ark 1982).

R. equi; glukoz maya özeti ağar, trypticase soy agar, kanlı ağar ve selektif olan nalidiksik asit-novabiosin, siklohekzimid-potasyum tellürit agar (NANAT) gibi katı besiyerinde üreyebilmektedir. (Kanat 2007). Kanlı agarda 37°C'de 24-48 saatlik

inkübasyondan sonra 2 mm büyüklüğünde, nemli, parlak ve pembe renkli mukoid koloni meydana getirmektdir. Koloni inkübasyon sonrası zamanla pembe renkten kızıla, somon rengine döner ve 2-4 mm arası gözyaşı damlası şeklini alır (Prescott ve ark. 1982, Yamshchikov ve ark. 2010). NANAT'ta aerobik ortamda 37°C de 24-72 saatte gri renkte, çeşitli boyutlarda, mukoid, parlak koloniler oluşturur (Woolcock ve ark 1979), glukoz maya özeti agarda kenarları düzgün, portakal renginden kırmızıya değişen S tipi koloni oluşturur ve tryticase soy agarda 30°C'de 48-72 saatlik inkübasyon sonunda parlak, mukoidik S koloni oluşturmaktadır (Barton ve Hughes 1980). *R. equi* sıvı besi yerinde ise yaygın olarak bulanık, dipte tortulu ve yüzeyde granüllü bir görüntü oluşturmaktadır (Barton ve Hughes 1980).

Aglütinasyon testi ile *R. equi'nin* 27 adet serotipi olduğu bildirilmiştir (Nakazawa ve ark. 1983, Weinstock ve Brown 2002, Kanat 2006). Çesitli hayvan türlerinden izole edilen *R. equi* izolatların da 7 kapsüller serotipi olduğunu, serotiplerin dağılımının izolatların orjinine bağlı olduğunu ve serotipler ile virülens arası herhangi bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir (Presscot 1981). Kısacası serotipler arasındaki çeşitlilik virülens farklılıklardan çok çoğrafi farklılıkları yansıtmaktadır. Çünkü aynı serotipte hem virülens hemde avirülens suşlar tanımlanabilmektedir (Takai ve ark. 1996, Hondalus 1997, Kanat 2006). Bununla birlikte, Japonya ve Kuzey Amerika'da yapılan yeni çalışmalarda daha fazla sayıda serotipi olduğu belirtilmiştir (Sönmez 2007).

R. equi'nin ürettiği fosfolidaz C ve kolesterol oksidaz (equi faktör), *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in fosfolidaz D'si, *Staphylococcus aureus*'un beta toksini ve *Listeria monocytogenes*'in hemolizini ile sinerjik oluşturarak koyun, sığır ve tavşan eritrositlerini hemolize etmektedir (Prescott ve ark 1982, Takai ve ark 1991b, Takai ve ark 1991c, Hondalus 1997, Weinstock ve Brown 2002, Puthucheary ve ark 2006, Sönmez 2007). Tek başına eritrositleri lize etmeyen *R. equi* ile *C. pseudotuberculosis* birlikteliğinde eritrositlerde lizis özelliğinin artması 2 şekilde olmaktadır. Birincisi, fosfolipaz D yapısının etkinliği ile eritrosit membranındaki seramit fosfatı hidrolize edebilen aktif fosfat varlığının ortaya çıkması ve ikincisi *C. pseudotuberculosis* 'teki kolesterol oxidaz ile eritrosit membranındaki kolestrolü Cholest-4-en-3-one haline dönüştürülmesidir. Her iki yol sonucu *C.*

pseudotuberculosis ile *R. equi* eritrositlerde liziz gerçekleştirir (Prescott ve ark 1982).

R. equi % 0,5 formaldehite, güneş ışınlarına ve kuruluğa karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Kanat 2006).

1.4. EPİDEMİYOLOJİ

Altı aylıktan küçük taylar *R. equi* enfeksiyonuna yatkındır ve vakaların çoğunluğu üç aylıktan küçük yaştaki taylarda görülmektedir. Bununla birlikte, özellikle immün sistemi zayıflamış yetişkin atlarda da enfeksiyon şekillenmektedir (Zink ve ark 1985, Hondalus 1997). *R. equi* enfeksiyonları çoğunlukla yaz aylarında görülmektedir (Hondalus 1997). İlkbahar sonu yaz başında hava sıcaklığının artması buna ek olarak havadaki nem oranı bakterinin üremesi için optimal koşullar sağlarken, toz particülleri aracılığı ile etken aerosol yolla hayvanlara bulaşmaktadır.

R. equi dağılımı değişken olup bazı at çifliklerinde nadir veya sporadik olarak görülürken, bazen de enzootik ve ölümcül olabilir. Bazı çifliklerde morbidite oranı % 40 geçebilmektedir (Giguere ve ark 2002). Çifliklerde görülen dağılım düzeyindeki farklılıkların nedeni tay topluluğunun yoğunluğu, çiflik yönetimi, sıcaklık, kuru hava, toprak, ph gibi çevresel faktörlerin yanı sıra toprakta *R. equi*'nin virülens suşların yüksek oranda bulunabilmektedir (Zink 1984, Bowles ve ark. 1987, Hondalus 1997, Chaffin ve ark 2003, Heidmann ve ark 2006, Meljer ve Prescott 2004). Taylarda *R. equi* enfeksiyonunu önlemek için tayların erken dönemde yetiştirmeye alınması gerekmektedir. Dört haftalık yaşa kadar bireysel alanlarda kalan taylarda enfeksiyonun riski düşükken 2 hafta sonrasında ortak kullanılan ortama alınan taylarda enfeksiyon oranı yüksektir (Heidmann ve ark 2006).

R. equi suşları virülent, orta virülent ve avirülent olarak 3'e ayrılmaktadır. Taylarda doğal enfeksiyon kaynağı 15-17 kDa'lık VapA proteine ve bunu sentezleyen 85-90 kb'lik plazmide sahip virülent suşdur. Avirülent suşta VapA proteini ve plazmit DNA'sı bulunmamaktadır (Takai 1997, Takai ve ark. 2000,

Makrai ve ark. 2002, Giguere 2010a). Genellikle yetişkin atlarda ve enfeksiyonu taşımayan tayların sindirim sistemlerinde avirülent *R. equi* kommensal olarak bulunmaktadır (Takai 1997). Aynı zamanda, enfekte tayların dışkısında milyonlarca virülent *R. equi* suşu bulunmaktadır (Özsoy 2007). *R. equi* zorunlu aerob mikroorganizma olmasına rağmen yaşamın ilk 8 haftasında tayların sindirim sistemi florası gelişmediği için normalde anerobik olması gereken kalın bağırsaklarda gelişim gösterebilmektedirler. Daha sonra kontamine yem ve suyun alınması ile aerobik ince bağırsakta gelişim gösterebilmektedir (Takai ve ark. 1986b, Takai ve ark. 1986c). Patojen *R. equi* sindirim yolu ile alınıp sonrasında kana geçerek pnömöniye neden olmaktadır (Takai 2002).

Enfekte dışkı ile toprağın kontamine olması ve etkenin kontamine toz partiküllerinin solunum veya oral alımı enfeksiyonu oluşmaktadır (Takai ve ark 2002, Makrai ve ark 2002). *R. equi* çevre koşullarına karşı dayanıklı olmasından dolayı gübre içeriğindeki uçucu organik asitler ile etken toprağın yüzeyinde hızla çoğalmaktadır (Hughes ve ark 1987). Buda kısa sürede hayvanlar arasında enfeksiyonun yayılmasına neden olmaktadır. Ayrıca, *R. equi* toprak yüzeyinin 30 cm altında veya daha derin katmanlarında ısı ve nemin etkisi ile üreyememektedir. *R. equi* ile kontamine olmuş topraktan bir yıl sonra dahi etken izole edilebilmektedir (Barton ve Hughes 1980). At çifliklerinde *R. equi* enfeksiyonu görülme sıklığı ile toprak dışkı izolatların patojenite arasında ilişki doğru orantılıdır (Takai ve ark 1991b). Padokların uzun süre iyi temizlenmeden kullanılması etkenin yoğun bir şekilde üremesine sebep olmaktadır (Prescott ve ark 1984, Takai ve ark 2000).

Enfeksiyonu görülme sıklığı kuru ve sıcak yaz mevsimlerinde artış göstermektedir (Kanat 2006). Bunun nedeni yaz mevsiminin bakteri çoğalması için ideal olmasıdır. Bununla birlikte, kontamine toz partüküllerini inhale etmeleri ile özelliklede 1 ile 6 aylık risk grubundaki taylar patojen etkeni almış olur (Giguere 2010b). İnkübasyon periyodunun süresi maruz kalınan etken miktarına göre değişmektedir. Çelinç sonrası inkubasyon periyodu inokulumun dozunun şiddetine göre 9 günden 2-4 haftaya kadar değişmektedir (Giguere ve ark 1999b, Giguere 2010).

Taylar etkeni kontamine gıda ve su ile de alimenter yolla alınmaktadır. (Barton ve Hughes 1980, Johnson ve ark 1983, Prescott 1991, Meljer ve Prescott 2004). Ancak, yoğun miktarda etken alınmasına rağmen nadiren enfeksiyona sebep olmaktadır (Johnson ve ark 1983, Sönmez 2007, Giguere 2010). Bazende *R. equi* sonucu gelişen primer pnömonik enfeksiyonu ile oluşan kontamine balgamın yutulması ile de sindirim sisteminde lezyonlar görülebilir (Prescott 1991, Meljer ve Prescott 2004). Ayrıca, mukozal yüzeyler ve göbek kordonu yoluyla da *R. equi* kongenital olarak bulaşmabilmektedir (Weinstock ve arthur 2002, Sönmez 2007).

Özellikle üç aylıktan küçük tayların enfeksiyona duyarlı olmaları; doğal bağışıklığın yetersizliği, maternal antikorlar, viral, paraziter ve diğer mikroorganizmalar ile birlikte seyreden enfeksiyonlar ve strese sebep olan çevresel faktörlerdendir (Martens ve ark. 2005, Prescott 1991).

Tay çifliklerinde enfeksiyon riskini azaltmak için bireysel enfeksiyon farklılıkları, patojenite değişiklikleri, tayların doğal ve kazanılmış bağışıklıkları ve çevresel faktörler göz önüne alınmalıdır (Heidmann ve ark 2006).

1.5. VİRÜLENS

R. equi' nin virülense bağımlı elemanları; hücre dışı enzimi olan 74 kDa ile tanımlanan kolesterol oksidaz, kolin fosfohidrolaz ve fosfolipaz C, patojenite adacığını oluşturan Vap ailesinin bağlı olduğu 8 geni kodlayan 27 kb'lik plazmit, hücre duvarı mikolik asit ve kapsül polisakkaritlerdir (Prescott 1991, Tan ve ark 1995, Hondalus 1997, Giguere 2001, Meljer ve Prescott 2004, Hines 2007, Phumoonna ve ark 2008). *R. equi* için virülens ilişkili plazmitler

Patatojenik adacığı VapA, VapB, VapC, VapD, VapE, VapF, VapG ve VapH'den ibaret 8 Vap proteini ve 4 hücre proteinini kapsamaktadır (Hines 2007). Vap proteinlerinden VapF ve VapE pseudoplazmatik olarak tanımlanmış ve işlevşel değillerdir (Dawson ve ark. 2010). Patojen adacığını oluşturan virülens plazmitin üç işlevsel bölgesi vardır. Bu bölgelerin ikisindeki genler konjugasyon ve plazmid replikasyonunda, stabilite ve segregasyonda rol oynayan proteinlerdir. Üçüncü

bölgede ise (27.5 kb'lik) G+C içeriği düşüktür ve Vap A, Vap C ve Vap H için virülensle ilgili proteinleri kodlayan geni barındırmaktadır (Takai ve ark. 2000b, Meljer ve Prescott 2004, Giguere 2010).

R. equi neden olduğu suppuratif pnömonili taylarda ve enfekte at serumlarında VapA'ya karşı yüksek titrede antikor bulunmuştur (Vanniasinkam ve ark. 2001, Cauhard ve ark 2011). VapA'lı *R. equi* suşunun plazmidi uzaklaştırılınca makrofajara replikasyon özelliğini kaybetmekte, kısa ömürlü olmakta veya çoğalamamakta, taylarda ve farelerde çelinç sonrasında enfeksiyon şekillenmemekte dir (Hondalus ve Mosser 1994, Hondalus 1997, Giguere ve ark. 1999, Jain ve ark. 2003, Meljer ve Prescott 2004, Heidman ve ark. 2006, Giguere 2010). VapA proteini *R. equi*'nin tay makrofajların içinde canlı kalabilmesi, bölünebilmesi ve hastalık tablosunun şekillenebilmesi için önemlidir (Hondalus 1997, Giguere ve Prescott 1998, Giguere ve ark. 1999, Giguere 2001, Vanniasinkam ve ark. 2001, Giguere ve ark. 2002, Taouji ve ark. 2004). Bu neden ile Vap A proteine sahip *R. equi* suşu virülens suş olarak tanımlanmaktadır (Takai ve ark. 2000a, Makrai ve ark. 2002). Ayrıca, VapA'nın yanı sıra diğer plazmit kaynaklı ürünlerde *R. equi*'ye virulens kazandırmaktadır. VapC, VapD ve VapE proteinleri VapA ile aynı sıcaklıkta yani konakçı vücut sıcaklığında sentezlenmektedir (Byrne ve ark. 2001). Bunun yanısıra bütün Vap genleri içinde VapA, VapD ve VapG hem akciğer dokusunda hemde in vitro ortamda en fazla üreyen proteinlerdir (Jacks ve ark 2007, Giguere 2010). Diğer plazmit kaynaklı ürünler ile Vap A %30-40 oranında aynı aminoasitleri içermektedir. Örneğin, VapB ile VapA nın %79 aminoasit dizilimi benzemektedir (Byrne ve ark. 1998, Giguere ve ark. 1999). Ancak, hem VapA hem de Vap B sentezleyen *R. equi* suşu bulunmamaktadır. Ayrıca, anti-VapA antikorları VapB ile çapraz reaksiyon vermektedir. VapC, VapE ve VapD 'de % 50 VapA protein ile benzer aminoasitlere sahiptirler ve VapA ile aralarında çapraz reaksiyon bulunmamaktadır (Byrne ve ark. 2001).

VapA tripsin ile parçalanabilir (Meljer ve Prescott 2004). VapA 34°C ile 41°C arasında ve pH6,5'da aktiftir (Bynre ve ark 2001).

VapA proteini lipit modifiyeli, hidrofobik ve yüzey çıkıntılı bir proteindir (Tan ve ark 1995, Vanniasinkam ve ark. 2001). Belirgin iki epitopu bulunmaktadır. Birincisi; N terminal B hücre epitopu (TSLNQKDEPNGRASDTAGQ) VapA sekansındaki 62-81 amino asitleri arasındaki 11 aminoasitlik bölgedir. Bu peptidlerin aminoasit sekansları sırası ile TSLNLQKDEPN (peptid 11), NLQKDEPNGRA (peptid 12), KDEPNGRASDT (peptid 13) ve PNGRASDTAGQ (peptid 14)'dır. VapA peptid 11-14 arası bölge baskın olarak hidrofilik rezidüler içermektedir (Hopp ve Woods 1981), hücre yüzeyinde ve konakçı bağışıklık sistemi ile etkileşime geçebilmektedir. Ayrıca, *R. equi* ile enfekte olan tayların serumlarında yüksek oranda tanımlanmaktadır. Bu nedenle, immunodominant epitop olarak kabul edilmiş ve diagnostik testlerin geliştirilmesinde kullanılmışlardır (Vanniasinkam ve ark 2001). Bu bölgedeki önemli proteinler *groEL1* ve *groEL2*'dir. *groEL2* proteini humoral ve hücresel bağışıklıkta immunodominant hedeftir (Phumoonna ve ark 2008). VapA'nın diğer epitopu VapA sekansında 152-168 aminoasit arasındaki 41-43 peptidlerine karşılık gelen bölgedir (Vanniasinkam ve ark 2001).

Diğer Vap proteinlerinin özellikleri incelendiğinde VapF harici Vap proteinleri VapA'ya benzemektedir. VapA hücre duvarında salgılanmasına rağmen VapC, VapD ve VapE proteinleri hücre duvarında bulunmamaktadır (Meljer ve Prescott 2004, Hines 2007). VapB proteini ise enfekte taylarda bulunamazken, enfekte domuzların submaksillar lenf nodüllerinden izole edilen izolatlarda bulunmuştur. VapB proteini 79-100 kd patojen plazmit ile tanımlanmıştır ve 20 kDa ağırlığındadır (Nicholson ve Prescott 1997, Takai ve ark. 2003, Meljer ve Prescott 2004).

Etkenin patogenezinde önemli bir rolü olmayan Equi faktör 74 kDa ile tanımlanan kolesterol oksidaz, kolin fosfohidrolaz ve sifingomiyarilinaz C'dir. *R. equi* tüm suşlarında benzer antijenite göstermektedir (Prescott ve ark. 1982, Takai ve ark. 1991a).

R. equi arabinogalaktan duvar polisakkariti ve glikolipidleriyle bağlantılı mikolik asitlerden oluşan hücre duvarı makrofaj içinde veya antibiyotiklere karşı bakterinin sağ kalması açısından önemlidir (Meljer ve Prescott 2004, Hines 2007).

Hücre duvarından ekstrakte edilen mikolik asit içeren glikolipid kobaylara verildiğinde granülom oluşturmuştur. Uzun karbon zincirli mikolitik asit içeren suşlar kısa karbon zincirli mikolitik asit içerenlere göre daha virülenttir (Gotoh ve ark. 1991, Hondalus 1997). Hücre duvarının virülensteki rolü ise makrofaj içine alınmadan önce IL-10 ve IL-1'i aktifleştirerek Th2 cevabının oluşmasına sebep olmaktadır (Giguere ve Prescott 1998).

R. equi patojenitesi için 85 kb VapA lipoprotein varlığının gerekliliği kadar hücre duvarındaki glikolipidlerde in vivo granülom oluşumu için gereklidir. Ancak, mikolitik asit içeren hücre zarfı ve polisakkarit kapsül, equi faktör ve diğer plazmit ürünleri gibi virülens faktörlerin VapA proteininin virülens etkisinin yanında önemsiz olduğu belirtilmiştir (Giguere ve ark 1999). Avirulet *R. equi* suşları ile taylarda yapılan deneysel trakea çelinç uygulamalarında sitotoksisite oluşmadığı ifade edilmiştir (Luhnmann ve ark 2004, Heidmann ve ark 2006).

1.6. PATOGENEZ

R. equi pnömoni şeklinde 1-6 aylık taylarda gözlenmektedir (Giguere 2001, Giguere 2010). *R. equi* karşı duyarlılığının temel nedeni doğal bağışıklık sistemindeki eksikliklerdir. Bu eksikliklerden ilki yetersiz TLR reseptör sinyalizasyonudur. Doğal bağışıklık sistemi patojen etkenleri patojene bağlı moleküller (PAMPs) ile, TLR reseptörleri, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi (NLRs) ve bu bölgedeki reseptörlerle (NOD) tanır (Beutler ve ark. 2004, Amati ve ark 2006). Bu reseptörler çeşitli transkripsiyon yollarına sinyal göndererek sitokin ve diğer immun sistem unsurlarının üretimini uyarırlar (Netea ve ark. 2004, Steinman ve Hemmi 2006). Yeni doğan taylarda yetersiz TLR reseptör sinyalizasyonu immun sistem hücrelerinin yetersiz üretimine sebep olmaktadır (Dawson ve ark 2010).

Diğeri duyarlılık faktörü de nötrofil ve makrofajların yetersizliği oluşturmaktadır. Yetişkin atlarda *R. equi* enfeksiyonunda nötrofiller dokulardan

virülent patojeni etkili bir şekilde azaltabilmektedir (Martens ve ark. 2005). Fakat tay nötrofillerinin fagositik yetenekleri yetişkin atlarınkine benzer bulunsa da 3-4 haftalık yaşa kadar serumlarında opsonize edici faktörlerin eksikliğinden dolayı nötrofillerin fagositoz aktivitesi yetersizdir (Dawson ve ark 2010). Bununla beraber, tayların IFN-γ ve TNF-α seviyeleri düşüktür (Breathrach ve ark 2006). Yeni doğan taylarda yeterli IFN-γ seviyelerine ulaşmaları 3 ayda mümkün olabilmektedir. Taylarda 4 aylığa kadar IFN-γ ve IL-4 seviyesinde yaşa bağlı bir değişiklik şekillenmemektedir (Dawson ve ark 2010). IFN-γ yetersizliği tam olarak kesinleşmemiş olsada bireysel olarak yeni doğan taylarda dendritik hücre eksikliğine bağlı olabilmektedir (Kotiranto-Ainamove ve ark 2004). IFN-γ ve TNF-α makrofaj ve nötrofilleri aktive etmektedir ve sitokinlerin düşük seviyede olması nötrofillerde kısıtlı fagositoz yeteneğine sebep olmaktadır. Taylarda 8 haftalığa kadar sitotoksik T lenfosit seviyesi düşük olması IFN-γ'nın seviyede olması ile açıklanabilir. Aktive edici sitokinlerin azlığı, nötrofil ve makrofajların fagositoz aktivitesinin yetersizliği ve lenfosit seviyesindeki düşüklük birleştiğinde *R. equi*'nin hücre içi çoğalmasını kolaylaşmaktadır (Dawson ve ark. 2010).

Taylarda makrofaj ve dendritik hücre gibi antijen sunan hücrelerdeki MHC klas2 molekülünün sayısının azlığıda *R. equi* enfeksiyonunun oluşumunu kolaylaştırır (Dawson ve ark 2010). Dendritik hücreler ekzojen patojenleri tutar ve hücre yüzeyinde parçalanmış peptid antijenlerini MHC tip 2, CD86 ve benzer moleküllerin sinyal verdiği yardımcı uyarıcı mekanizması aracılığı ile CD4+ ve T lenfositleri aktive etmek için kullanılmaktadır (Flamino ve ark. 2010). Bu durumda taylarda özellikle ilk üç ayında *R. equi* enfeksiyonuna duyarlılık artmaktadır (Lopez ve ark 2003, Dawson ve ark 2010).

Patojen *R. equi* yüklü toz partiküllerinin solunum yoluyla alınmaktadır (Meljer ve Prescott 2004, Hines 2007). *R. equi* makrofajlarda hücre içi üreyebilmekte ve hücreyi parçalayabilmektedir. R. equi'ye karşı makrofajlar etkisiz kalabilirken nötröfiller etkindir. Ancak, *R. equi* nötrofilleri bertaraf edemese de hücre kapsülü aracılığı ile nötrofillerden korunmuş olur (Takai ve ark 1991a, Hondulus 1997, Meljer ve Prescott 2004, Hines 2007).

Tayların ilk 4 haftada anneden aldıkları maternal antikorlarda düşüş gerçekleşmektedir. Maternal antikorlar *R. equi* gibi bakteriyel etkenleri oksidatif patlama ve yangı öncesi Fc reseptörleri ile makrofajlara alınımını sağlarlar. Maternal antikorların azalması sonucu *R. equi* Fc haricinde reseptörlerle makrofajlara giriş yapmaktadır (Meljer ve Prescott 2004).

R. equi makrofaj içine alım yolları çeşitlilik gösterir. Giriş yolları *R. equi* hücre duvarında bulunan lipoarabinomannam'ı (ReqLAM) aracılığı ile gerçekleşmektedir. Aktive olmuş makrofajlar salgıladıkları sitokinler hepatositleri uyarır ve hepatositlerden rekombinant mannoz bağlayan protein salgılanır. Bu protein ile ReqLAM bağlanır. Rekombinant mannoz bağlayan protein C_1 benzeri etki göstermektedir ve C_4 ve C_2 komplement elementlerini parçalar. Bunun sonucu *R. equi* üzerinde C_{3b} birikimi aktifleşmiş olur. Böylece makrofaj içine *R. equi* CR_3 ile Mac1 aracılığı ile girer (Hondalus ve ark 1993, Handulus 1997, Garton ve ark 2002). Ayrıca, makrofajların mannoz reseptörüne direk ReqLAM bağlanması ile de *R. equi* makrofajlara girişi gerçekleşir (Meljer ve Prescott 2004). ReqLAM hücre duvar yapısının en önemli etkilerinden biride T lenfosit farklılaşması sırasında Th2 bağışıklık cevabının şekillenmesine neden olmasıdır (Garton ve ark 2002). Bunu da sitokinlerde IL-10 ve IL-1 aktifleştirerek yapmaktadır (Giguere ve Prescott 1998).

R. equi Fc dışı reseptörlerle makrofajlara alınması ile birçok öldürücü faktörden korunmaktadır (Hondalus 1997). Korunduğu mekanizmalardan biride IFN-γ ve TNF-α makrofajları aktive ettiği mekanizmadır. Bu sistemde IFN-gama ve TNF-α makrofajları aktifleştirip nitrik asit sentetazlardan INOS transkripsiyona uğramasını sağlayarak makrofajların nitrik asit üretmesini sağlar. Bakteriler Fc reseptörü aracılığı ile alındığında makrofajlar için ikinci sinyal oluşur. Ardından solunum patlaması devamında reaktif nitrojen ve reaktif oksijen oluşur. Bu duruma oksidatif stres denir. Oluşan reaktif nitrojen ve reaktif oksijen tepkimeye girer ve radikal peroksinitrit oluştururlar. Peroksinitrit makrofaj içine alınan bakterinin ölümüne yol açar. *R. equi* makrofaj içine Fc dışı reseptörlerle alındığı için oksidatif stresten korunmaktadır. Ayrıca, tay makrofajları Fc dışı reseptör alımı ile NG-monomethily-L-arjinine blokları kullanarak aktive olurlar. Bunun sonucuda makrofaj aldığı patojen etkeni öldürmesi için gereken peroksinitrit form oluşamaz. Çünkü reaktif nitrojen üretimi engellenir (Darrah ve ark 2000, Meljer ve Prescott 2004).

Bu yollar dışında *R. equi* tay makrofajlarınca Fc reseptörleri aracılığı ile alınsa dahi virülens *R. equi* sahip olduğu 15-17 kDa ağırlığındaki lipoprotein yapıdaki VapA ile VapG oksijen soylarından hidrojen peroksite karşı dirençlidirler. Bu özellik ile oksidatif stres durumlarında *R. equi* canlı kalmasını sağlar (Darrah ve ark 2000, Meljer ve Prescott 2004).

Makrofaj içine alındığında *R. equi* büyük oranda membranla kaplı vakuollerin içine yerleşmektedir (Hondalus ve Mosser 1994, Hondalus 1997). Makrofajın patojen etkeni aldıklarında etkeni yok edebilmek için fagolizozomları oluşturabilmektir. Fagozom endositoz mekanizması vezikülleri ile çeşitli birleşme ve bölünme olayları art arda yapılarak meydana getirilir. Makrofaj içinde büyümeye bağlı olarak NRAMP1 (Doğal dirence eşlik eden makrofaj proteini) makrofajdaki fagozomun içine bir miktar demir pompalar. Bunun sonucu fagozom biyotoksik reaktif oksidatif soylarını oluşturur. Fakat oluşan reaktif oksidatif soylarından nitrik oksik nedeni ile demir uzaklaşır ikinci olarak NRAMP1 fagositik vakuolun asitleşmesine neden olur. *R.equi* de demire bağlı gen ekstresyonunu kontrol edebilen bilinen iki transkripsiyonel baskılayıcıdan IdeR bulunmaktadır. *R. equi* bulunduğu vakuollerde pH azalması ve sıcaklığa mağruz kalması sonucu virülens faktörler tetiklenmektedir. Demirinde uzaklaşması IdeR aracılığı ile protein bağlama bölgeleri serbestleşir ile VapA için ideal pH ortamı oluştuğunda Vap adacığı böylece transkripsiyona uğrar (Meljer ve Prescott 2004). Makrojaf *R. equi* yok etmek için uğrasırken aslında virülens gücünü arttırmış olur. Mikolik asit içeren polisakkarit kapsülü lizozom ve fagozom arasındaki füzyonu engelleyerek patojen etkenin makrofaja yerleşmesine yardımcı olur (Zink ve ark 1985, Hondalus ve Mosser 1994, Hines ve ark. 1997).

R. equi sahip olduğu hücre kapsülü, equi faktör ve lipoprotein VapA ile monosit ve makrofajlardaki iyonizasyon ve oksidatif reaksiyonları baskılamış olur. Böylece makrofaj içinde sağ kalabilir ve çoğalabilir (Hietela ve Ardans 1987, Takai ve ark 1991b, Takai ve ark 2000a, Meljer ve Prescott 2004, Puthucheary ve ark 2006, Hines 2007, Phumoonna ve ark 2008). VapA proteine ek olarak pneumonili taylarda VapA ile yakın ilişkili VapC ve VapH'de tanımlanmıştır (Giguere 2001, Mangan ve Meijer 2001).

Enfeksiyon başlangıcında spesifik lezyonlar görülmemekle birlikte ilerleyen zamanda tayların akciğer dokusunda suppuratif granülomlu pnömoni ve mediastinal lenf yumrularında irinli lenf adenitis gözlenmktedir (Zink ve ark 1987, Prescott 1991, Giguere ve Prescott 1997, Heidmann ve ark 2006).

1.7. BAĞIŞIKLIK

1.7.1. Hücresel Bağışıklık

T lenfositler *R. equi* in vivo bertarafında mutlaka gereklidirler. T lenfosit eksikliği olan ve olmayan atipik kobaylara virülent ve avirülent *R. equi* suşları ile çelinç uygulamalarında; T lenfosit eksikliği olan kobay grubunda dalak, karaciğer ve akciğerde virülent *R. equi* görülme oranı artış gösterirken, avirülens *R. equi* suşu bir hafta gibi kısa sürede temizlenmiştir. Bununla birlikte virülent ve avirülent suşlar arasındaki çoğalma oranındaki farklılıklarla T lenfositlerin *R. equi* için önemli savunma etkenlerinden olduğu belirtilmiştir (Madarame ve ark 1997, Giguere ve Prescott 1998).

R. equi gibi hücre içi yerleşim gösteren bakteriyel patojenlerin klerensine T lenfositlerin aracılık ettiği iki mekanizma vardır. Bunlar; sitokinlerin salınması ve direk sitotoksisitedir. Yangı hücrelerinin gelişimi uyarılır ve enfekte makrofajlar tanınarak öldürülür (Hines ve ark. 1997, Meljer ve Prescott 2004, Dawson ve ark. 2010). Fakat *R. equi* ile ilgili bağışıklık mekanizması çalışmalarında CD4+ ve CD8+‘in enfeksiyonu arındırmaktaki anahtar rolü fare modellerinde ve yetişkin atlarda göşterilmiştir (Nordmann ve ark 1992, Hines ve ark 1997). Bu mekanizmanın temelini CD4+ Th1 hücrelerinden salgılanan IFN-γoluşturduğu görülmektedir (Hines ve ark 1997, Lopez ve ark 2003). Bunun yanı sıra CD8+ T lenfositlerin kısıtlıda olsa katılımcı etkileri mevcuttur. CD8+ T lenfositlerin katılımcı etkileri bu lenfositlerden salgılanan IFN-γ ve enfekte makrofajların klasik MHC sınıf I ile kısıtlı olarak etkeni öldürmesidir (Hines ve ark 2001).

T lenfositlerin farklılaşıp Th1 lenfosit veya Th2 lenfosit oluşması etkenle temas kuran makrofajlardan veya dendritik hücrelerden salgılanan sitokinlerin varlığı

ile olmaktadır. Örneğin IL-12 yardımcı T lenfositleri kuvvetli şekilde uyararak Th1 cevabının oluşmasını sağlar. Buna karşı birçok patojen etkende T yardımcı lenfositlerin bu farklılaşmasını değiştirerek bu süreci engellemeye çalışır. Th1 lenfositin bağlı olduğu sitokinler IL-2, IL-12, IL-18, IFN-γ, TNF-α ve immunglobulinleride profilleri IgGa ve IgGb dir. Th2 lenfositlerin bağlı olduğu sitokinler IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-β ve immunglobulinler ise IgGc, IgG(T) , IgA, IgE dir (Hines ve ark. 1997,Taouji ve ark. 2004, Dawson ve ark. 2010).

R. equi vücuttan temizlenmesi için Th1 lenfosit cevabının oluşması istenmektedir. Bu görev için en önemli sitokin IFN-γ'dir. IFN-γ bir çok hücre tarafından üretilebilsede esas kaynağı Th1 , CD8+ ve NK hücreleridir. IFN-γ reaktif oksijen ve azot ara ürünlerinin üretilmesini sağlıyarak, triptofanı katalize etmek için indolamin 2,3 deoksinejazı ortaya çıkartarak, fagolizozom füzyonunu uyararak ve Fc reseptör sunumunu arttırarak makrofaj ve nötrofilleri aktive edebilmekte, öldürme güçlerini arttırabilmektedir (Nathan ve ark. 1983, Mosmann ve Coffman 1989, Hines ve ark 1997, Hondalus 1997).

Bunların yanı sıra endotel hücrelerdeki adhezyon moneküllerinin yoğunluğunu arttırarak nötrofillerin damar dışına çıkış yolunu kolaylaştırması, MHC sınıf I molekül miktarını arttırması en önemliside Th1 T lenfosit dönüşümünü sağlayarak Th2 hücre dönüşümünü başkılıyabilme özelliği vardır. Taylarda ve yetişkin atlarda *R. equi* ile mücadele esnasında artan IFN-γ varlığıda bu durumu desteklemektedir (Giguere ve ark 1999, Hines ve ark 2003).

İlk altı aylık yaş aralığında tayların *R. equi*'ye duyarlıdırlar. Genç tayların IFN-γ yönünden yetersizlikleri, sitotoksik T lenfosit seviyesinin düşüklüğü, yetersiz TLR reseptör sinyalizasyonu, nötrofillerin fagositoz aktivitesi yetersizliği ve MCH sınıf II molekül azlığı gibi faktörlerdir (Garton ve ark. 2002, Lopez ve ark. 2003, Katiranta-ainamo ve ark 2004, Beutler ve ark 2004, Amati ve ark 2006, Dawson ve ark 2010).

R. equi'nin sahip olduğu ReqLAM olarak adlandırılan hücre duvar yapısı IL-10 ve IL-1 gibi sitokinleri aktifleştirerek T lenfositlerin farklılaşması sırasında Th2

bağışıklık cevabının şekillenmesine neden olabilmesidir (Giguere ve Prescott 1998, Garton ve ark. 2002). Ayrıca, virülent *R. equi'*de suşları avirülent suşlara göre CD4+ T lenfositlerin IFN-γ sunumunu azaltarak sitokin cevabını değiştirmektedirler (Giguere ve ark 1999).

R. equi'nin bağışıklık cevabını engellemek için kullandığı yollardan biri de antijen sunumunu engelemesidir. T lenfositler antijen sunumunda MHC-1 yanı sıra CD1 gibi klasik olmayan sıradışı lipit gibi antijenlerin sunumunda rol oynayan MHC molekülerinide kullanırlar ve CD1b *R. equi*'nin hücre duvarında tanımlanmış lipoarobinomannan ve mikolik asit gibi antijenlerin sunumunda rol almaktadır (Garton ve ark 2002). Fakat atların alveoler makrofajlarında düşük düzeyde CD1 bulunmaktadır buna ek olarak yetişkin atların monosit merkezli makrofajları taylarda göre çok daha fazla CD1 sunabilmektedirler (Pargass ve ark 2009). Yaş faktörü dışında *R. equi* ile enfekte olan monosit merkezli makrofajlarda enfekte olmayanlara göre CD1b sunumu çok daha düşüktür.

1.7.2. Humoral Bağışıklık

R. equi antikorları *Rhodococcus* enfeksiyonuna karşı atlarda patojenin makrofajın içine girdiği yolu değiştirerek veya bakterinin fagozom-lizozom füzyonunu inhibe etme yeteneğini baskılamaktadır (Hines ve ark. 1997).

Atların immunglobulinleri IgG, IgA, IgM, IgE ve IgD'dir. İg'lerin %80'ini IgG oluşturmaktadır (Wagner ve ark 2004). IgG çeşitleri IgGa, IgGb, IgG(T) ve IgGc'dir ve önemleri büyüktür. Yarılanma ömürlerine göre sıralanırsa IgA 3,4 gün IgM 5 gün, IgGa 17,6 gün, IgG(T) 21 gün IgGb'de 32 gündür (Sheoran ve ark 2000, Langner ve ark, 2008, Wagner ve ark 2006).

IgM ve IgGa'nın üretilmesine tayların intrauterin gelişim döneminde rastlanılmıştır (Sheoran ve ark. 2000, McGuire ve Crawford 1973). Özellikle IgGa anne karnında son 3 ayda üretilmeye başlanabilir (Heidmann ve ark 2006). Yeni

doğan taylardaki IgM ile IgG arası kantitatif ilişki yetişkin atların serumlarındaki ilişkinin tam tersidir. IgM'in deneysel inkübasyonu takiben ilk 4 haftada üretiminin düşük olduğu ve takibindeki 4 ile 9 haftada ise hızlı bir yükseliş sergilediği ifade edilmiştir (Takai ve ark 1986a).

Maternal antikorların kaybolmasının ardından 5 ile 8 haftalık yaşta endojen olarak IgGa, IgG(T) ve IgA antikorları üretilmektedir (Holznagel ve ark. 2003). Bunlardan farklı olarak endojen IgGb antikorları 12 haftalık ile 8 aylık yaş döneminde IgGa ve IgG(T) antikorlarına göre çok daha az seviyede üretilmektedir (Sheoran ve ark 2000, Holznagel ve ark 2003). IgGb'nin bakteriyel ve viral patojenlere karşı önemli bir direnç unsuru olmasıyla birlikte yarılanma ömrü en uzun olan antikor olduğu için tayların *R. equi* etkenine karşı aşılamaya gösterdiği bağışıklıkta başrolü almasıdır (Taouji ve ark. 2004, Dawson ve ark 2010). Vap proteinine spesifik IgGa'nın işlevsel olarak koruyucu olduğu ve Th1 yanıtına eşlik ettiğide göşterilmiştir (Heidmann ve ark. 2006). IgGa ve IgGb *R. equi* enfeksiyona karşı şekillenen en önemli Ig'lerdir.

Yetişkin atlarda ve taylarda *R. equi* enfeksiyonunun 7. gününde *R. equi*'ye ve VapA'ya karşı kuvvetli IgGa ve IgGb antikor cevabı gözlemlenmiştir (Lopez ve ark 2002). IgGa ve IgGb at serumunda ve kolostrumda en fazla bulunan IgG tipidir. Yetişkin atlarda IgG'nin diğer serotiplerine göre IgGb daha hızlı yükselmiştir. Bu durum IgGb tarafından başlatılan *R. equi'*nin artan komplement opsonizasyonuna bağlanmıştır. Diğer çalışmada ise 7 farklı Ig türünün (IgA, IgM, IgGa, IgGb, IgG(T), IgE ve IgM) efektör işlevleri incelenmiş ve IgGa ile IgGb alt tiplerinin komplementi aktif hale getirip, antikor merkezli sitotoksiteyi sağladığı belirtilmiştir (Jacks ve ark 2007).

Tüm Vap proteinleri immunojenik olsada, VapA ve VapC'ye karşı oluşan antikorların taylarda koruma sağladığı ifade edilmiştir (Meljer ve Prescott 2004, Jacks ve ark 2007b). Özellikle anti-VapA antikorunun korumada başrolu aldığı ve kısmen saflaştırılmış VapA ile bağışıklanan atların serumunda opsonizasyon aktivitesi rapor edilmiştir (Tan ve ark 1995, Giguere ve ark 1999).

Aşılı atlardan elde edilen IgG'ler, aşısız atların IgG'lerine göre *R. equi* periton içi çelınçlerında daha koruyucudur. Buna ek olarak VapA ile bağışıklanmış atlardan elde edilen plazmalar taylara intravenöz uygulandığında VapA antikoru olmayanlara kıyasla *R. equi* ile enfekte edildiklerinde akciğerlerindeki bakteri sayısı belirgin oranda düşüktür (Giguere ve ark. 1999). VapA ve VapC antikorlarının uygulandığı taylarda korunma sağlandığı gözlenmiştir (Hooper-Mcgrevy ark 2005). Hatta bu korumanın hiper immun plazma ile sağlanana eş değer olduğu belirtilmiştir. Ancak, aşılı kısraklardan doğan taylarda *R. equi* antikorlarının pasif aktarımına rağmen enfeksiyon şekillenmiştir. Bunun nedeni aşılama sonucu oluşan antikorun izotipi olduğu belirtilmiştir (Higuchi ve ark 1999, Meljer ve Prescott 2004).

Primer antijen VapA'ya karşı oluşan IgG izotipleri incelendiğinde; IgGa ve IgGb izotipleri çelınç sonrasında artmaktadır. İlginç olan IgGa ve IgGb komplement oranı sabitlenirken IgG(T) için bu durum geçerli değildir. Aslında IgG(T), IgGa ve IgGb izotiplerinin sabitlenmesini baskılıyabilmektedir. Fakat sonuçlarda IgG(T) artarken IgGa ve IgGb sabittir (Meljer ve Prescott 2004).

R. equi'nin vücuda giriş yoluda humoral bağışıklıkta farklılıklar oluşturmaktadır. Solunum yolu ile patojen *R. equi* etkenin alınması ile mukozal IgA daha fazla sentezlenmektedir Trakeiçi *R. equi* ile enfekte edilen taylarda akciğer sıvılarında yüksek oranda IgA ve IgM gösterilmiştir (Taouji ve ark 2004). IgA'nın tayların burun mukozasında ilk 28 günden önce IgA antikorunun şekillenmemesi tayların *R. equi'*ye duyarlılığını göstermektedir (Dawson ve ark 2010).

Antikorların tayları *R. equi* istilasına karşı koruma yolları; *R. equi* opsonizasyonu ve makrofajların içine alındığında enfekte makrofajları öldürme yollarının geliştirilmesidir. Fakat birçok durumda *R. equi* karşı oluşan antikorlar etkisiz kalmaktadır (Fontanals ve ark 1997).

1.8. KLİNİK BULGULAR

1.8.1. Atlarda Klinik Bulgular

R. equi taylarda ve yetişkin atlarda solunum, sindirim ve iskelet kas sistemini etkilemektedir. Etkilenen solunum sisteminde piyogranülomatöz bronkopnömoni ve mediastinal lenf düğümlerinde süpüratif lenfadenit şekillenirken, sindirim sisteminde piyogranülomatöz ülseratif enterit ve mezenterik lenf düğümlerinde lenfadenit oluşmaktadır. İskelet kas sisteminde osteomyelit, septik artrit, septik olmayan poliosinovit şekillenebilmektedir. Ayrıca üveyit, selülit, lenfanjit, abdominal lenfadenit, piyogranülomatöz dermatit ve infertilite gibi hastalıklar da görülebilir (Chaffin ve Martens 1997, Hondalus 1997, Giguere ve Prescott 1997, Takai ve ark. 2000a ve Heidmann ve ark. 2006).

1.8.1.1.Taylarda Klinik Bulgular

Çoğunlukla 2-6 aylık taylarda görülmekle birlikte 6 aylıktan büyükler de enfeksiyona yakalanabilmektedirler (Prescott 1991). *R. equi* enfeksiyonu daha çok sıcaklıkların arttığı yaz ayında oluşmakta etken aerosol olarak toz ve rüzgar ile alınmaktadır. Bununla birlikte, virülens *R.equi* taşıyan taylar viral solunum hastalıklarına da yatkındır (Roney 1966, Hondalus 1997).

Taylarda en dikkat çeken bulgu kronik supüratif bronkopnömonidir (Giguere ve Prescott 1997, Heidmann ve ark.2006). Enfekte akciğerlerde multiple granülamatöz apseler gözlenir, bronşiyal ve mediastinal lenf düğümlerinde supüratif lenfadenit eşlik eder (Zink ve ark. 1985, Prescott 1991, Giguere ve Prescott 1997, Hondalus 1997, Heidmannve ark. 2006). Abseler çoğunlukla her iki akciğer lobunda görülmektedir (Zink ve ark. 1987, Prescott 1991). Histopatolojik olarak erken dönemde şekillenen akciğer lezyonlarını alveolar boşluklarında *R. equi* bulunduran makrofaj, dev hücreler ve nötrofillerden oluşan hücresel yığılmalar şekillenmektedir. (Johnson ve ark. 1983, Hondalus 1997, Heidmann 2006). Hastalığın ilerlemiş evrelerinde akciğer paranşiminin bakteri ve dejenere makrofajlarla dolması sonucu nekroz ve irinli apse oluşmaktadır (Hondalus 1997). Erken klinik bulgular;

iştahsızlık, uyuşukluk, vücut ısısında yükselme, hızlı soluk alıp vermedir. Klinik belirtilerin hafif olması nedeniyle yanlış teşhis ve tedavi sonucunda *R. equi* enfeksiyonu kronik forma geçer (Falcon 1985, Giguere ve Prescott 1997, Takai ve ark. 2000a). Kronik formda akciğerlerde geriye dönüşümsüz hasarlar, 41-41,5 °C'de ateş, hırıltı, öksürük, soluk alıp verirken tıslama, bilateral burun akıntısı, hareket etmede isteksizlik ve artan eforda soluk alıp verme hızının artması ve özellikle de abdominal solunum ile beraber burun deliklerinin genişlemesi görülmektedir (Falcon 1985, Prescott 1991, Giguere ve Prescott 1997). Ancak klinik bulguların hiçbiri *R. equi* pnömonisi için patognomonik belirti değildir (Prescott 1991). Bununla birlikte enfekte tayın akciğerinde soluk alıp vermede etkilenen akciğer loblarından hırıltı veya çatırdama sesleri duyulmaktadır (Giguere ve Prescott 1997). Radyografide alveollerdeki abseler ve intestinal alanda bakteriyel infiltrasyon ile birlikte bronşiol, mediastinal lenf düğümlerinde lenfadenopatiler görülebilmektedir. Kan tahlillerinde trombositopeni, hemolitik anemi, hiperlipidemi, plazma fibrinojen oranında artış ve lökosit değerinde nötrofil kaynaklı artış gözlenebilmektedir (Prescott 1991, Chaffin ve Martens 1997).

R. equi pnömonisi nadiren subakut formda görülmektedir. Bu vakalar diffüz miliyer piyogranülomatöz pnömoni ve klinik belirtiler görülmeden akciğere lezyonların hızla yayılması ve kısa sürede ölüm ile karakteristiktir (Giguere ve Prescott 1997).

Akciğerde lokalize olan lezyonların yanı sıra tayların *R. equi* içeren balgamı yutmaları veya kontamine olmuş yemleri yemeleri sonucu patojen etken intestinal sisteme yerleşip bu bölgeyi enfekte edebilir (Prescott 1991, Hondalus 1997). Pnömonilerin %50'si intestinal enfeksiyonlarla beraber seyretmekle birlikte (Zink ve ark. 1987), vakaların sadece % 4'ünde intestinal bulgular gözlenebilir (Giguere ve Prescott 1997). Sindirim sisteminde *R. equi* peyer plaklarına yerleşmekte ve plakların ülserleşmesine sebep olmaktadır (Hondalus 1997). Sindirim sistemin etkilenmesi sonucu multifokal ülseratif enterokolit ve mezenter lenf nodüllerinde granülomatöz suppüratif lenfadenit gelişmektedir (Zink ve ark. 1987, Prescott 1991,Giguere ve Prescott 1997, Chaffin ve Martens 1997, Heidman ve ark. 2006). Lezyonlar özellikle ileo-sekal bölgede gözlenmekte ve nadiren abdominal abseler de şekillenbilir. Ayrıca, mezenterik lenf düğümlerinde lenfadenopatiler oluşmaktadır. Rektumda

yapışmalar, (Zink ve ark 1985), depresyon, anoreksi, ishal ve kolik görülebilmektedir (Prescott 1991, Giguere ve Prescott 1997, Hondalus 1997, Chaffin ve Martens 1997). Kolon bölgesinde mukoza, submukoza ve mezenterik lenf düğümlerinde granülomatöz yangı nedeniyle gastrointestinal lenf dolaşımı engellenir. Bunun sonucunda peritonal sıvıda protein konsantrasyonu artar ve hipoproteinemi gözlenebilir. Üstelik, *R. equi* peritonite neden olabilir ve enfekte tay şiş göbekli bir görünümü sahiptir (Giguere ve Prescott 1997).

İskelet kas sisteminde; septik olmayan polisinovit, osteomiyelit, selülit, septik artrittir (Giguere ve Prescott 1997, Heidmann ve ark 2006). Septik olmayan polisinovit, *R.equi* pnömonilerinin üçte birinde görülmektedir ve nadiren tüm eklemler etkilenebilir (Giguere ve Prescott 1997). *R. equi*'nin bakteriyemik döneminde nadiren osteomiyelit şekillenir. Etken daha çok kemiklerin metafiz bölgesinin korteksinde yerleşir. Enfeksiyonun çevredeki kemiklere yayılması sonucuda selülit ve septik artrit meydana gelebilir. En çok etkilenen metatarsal eklem kemikleridir. Taylarda bazı vakalara *Strongyloides westeri* eşlik eder ve miks enfeksiyon oluşur (Collates ve ark. 1990, Giguere ve Prescott 1997, Caffin ve Martens 1997, Heidmann ve ark. 2006). Klinik belirtiler topallık, etkilenen kemik bölgesi üstünde şişlik ve hareketsizliktir. Etkenin vertebralara yerleşmesi sonucu şekillenen klinik bulgular ise ateş, laterji, eklem üzerine basarak yürüyüş ve elle muayanede dirençtir. *R. equi*'nin epidural boşluğa yayılması durumunda omurilik ve sinirlere baskı oluşur ve paraliz, ataksi, felç ve şiddetli ağrı gözlenir (Prescott 1991, Giguere ve Prescott 1997).

R. equi bakteriyemi döneminde taylarda nadiren subkütan abseler, üveyit, keratoüveyit, hepatik piyogranülomlar, septik sinüzit, perikardit, plevral effüzyon, piyogranülomatöz dermatit ve piyelonefrit gözlenebilir (Zink ve ark. 1987, Chaffin ve Martens 1997, Hondalus 1997, Heidmann ve ark. 2006).

1.8.1.2. Yetişkin Atlarda Klinik Bulgular

Yetişkin atlar taylara göre *R. equi*'ye karşı dirençlidir. Bununla birlikte, immün sistemi baskılanmış veya sistemik bir enfeksiyonu bulunan yetişkin atlarda

enfeksiyon görülebilmketedir (Hondalus 1997). Primer olarak akciğer, kolon ve bunlarla ilişkili lenf düğümleri etkilenir (Zink ve ark. 1984, Prescott 1991, Vengust ve ark. 2002). Klinik bulgular akciğerde nekrotik plevropnömoni, kolonda enterit ve bunlara eşlik eden lenfadenitlerdir (Zink ve ark. 1984, Vengust ve ark. 2002). Nadiren açık yaralara, kısraklarda aborta ve infertilite neden olabilmektedir (Zink ve ark. 1985, Giguere ve Prescott 1997, Vengust ve ark. 2002).

Enfekte gebe kısraklarda *R. equi*'nin kan yolu ile fetusa geçişi nadiren görülmektedir. *R. equi* amniyotik sıvıya geçer daha sonra direkt olarak damar yapısı üzerinden solunum/sindirim fetal membran etkeni alır. Bunun sonucu abort meydana gelir. Enfekte olan fetusun akciğerlerinde yangılı nekrotik odakların görüldüğü pnömoni şekillenmektedir. (Fitzgerald ve Yamini 1995, Szeredı ve ark. 2006). Abortu takiben yedi gün sonra *R. equi* vajinadan izole edilememektedir. Genellikle şekillenen abort sonrası komplikasyon şekillenmemektedir (Szeredi ve ark 2006).

1.8.2. Diğer Hayvanlarda Görülen Klinik Bulgular

R. equi taylar ve insanlar dışında fırsatçı patojen olarak birçok memeli hayvanda hastalığa sebep olmaktadır. Patojen etken taylar dışında ilk kez domuzların akciğerinde tüberküloz benzeri lezyonlardan izole edilmiştir. Bununla birlikte, nadir olmakla birlikte sığır, kedi, köpek, geyik, keçi, buffalo, koala, fok balıkları ve maymunları etkileyebilmektedir (Prescott ve Zubaidy 1979, Hondalus 1997).

Etken domuzlarda submaksiller lenfadenitese (Precott 1991, Makrai ve ark. 2002) ve nadiren de pnömoniye neden olmaktadır (Woodroofe 1950). Domuzlardan izole edilen suşlarda 20 kDa ağırlığındaki VapB proteine sahip olduğu gözlenmiştir (Nicholson ve Prescott 1997, Takai ve ark. 2003). Bunun yanı sıra VapA'ya sahip virülent *R. equi* suşları da domuzlarda enfeksiyon oluşturmaktadır (Makrai ve ark. 2002, Ribeiro ve ark. 2011). Bu durum domuzlardan insana enfeksiyonun bulaşmasına sebep olabilmektedir (Giguere 2010).

Koyunlarda *R. equi* pürülent apseli pnömoni ve plörite ve nadiren de osteomiyelite neden olurken (Roberts 1957, Dennis ve Bamford. 1966, Davis ve

2013), sığırlarda piyometriye, retrofaringeal, submaksiller ve respiratuar lenf nodüllerinde pürülent lenfadenite sebep olmaktadır. Ayrıca, özellikle altı aylık ve daha küçük buzağılarda mukopürülent pnömoniye ve boynuz kaynaklı deri yaralarını takiben ülseratif lenfanjite neden olmaktadır (Holtman 1944, Prescott ve Zubaidy 1979, Prescott 1991, Meljer ve Prescott 2004). Sığırlardan izole edilen suşların çoğunda VapA ve VapB proteinlerini kodlayan plazmitler bulunmamaktadır (Giguere 2010).

Keçilerde ilk önce barsak dokusuna yerleşen *R. equi* devamında akciğerde pürülent abseli pnömoni şekillenmesine neden olmaktadır (Prescott 1991). Ayrıca, karaciğer, dalak ve kemiklerde purulent çoğunlukla çok odaklı kapsüllü abselere (Whitford ve ark. 1974, Fitzgerald ve ark 1994, Davis ve ark. 1999, Rodriguez ve ark. 2000, Meljer ve Prescott 2004) ve vertebral osteomyelite (Kabongo ve ark 2005, davis ve ark. 2013) sebep olabilmektedir. Keçi izolatlarının çoğu VapA ve VapB proteinlerini kodlayan plazmitleri içermemektedir (Giguere 2010).

Köpek ve kedilerde *R. equi* madiren enfeksiyon yapmasına rağmen immun sistemi yaş, stres veya çesitli viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlardan dolayı zayıflamış kedi ve köpeklerde görülebilmektedir (Takai ve ark. 2003). Kedi ve köpeklerde *R. equi* ön ve arka patilerde piyogranülomatöz görünümlü lezyonlar, vajinit, hepatit, miyozit, osteomiyelit, eklem enfeksiyonları ve çok nadir olarakta mediastinal ve mezenterik lenf düğümlerinde lenfadenite neden olmaktadır (Cantor ve ark. 1998, Takai ve ark. 2003). Ayrıca, köpeklerde çok odaklı piyogranülomatöz pnömonide oluşabilmektedir (Cantor ve ark. 1998). Köpeklerdeki enfeksiyona neden olan *R. equi'nin* VapA proteine sahip olmadığı belirlenmiştir (Cantor ve ark. 1998, Takai ve ark. 2003). Bunun yanısıra kedilerden izole edilen suşlar VapA proteinine sahiptir (Giguere 2010).

Memeliler dışında *R. equi* vahşi doğada *Saguinus oedipus* türü maymunlarda tanımlanmıştır. Tamarinlerde enfeksiyon halsizlik, kilo kaybı, iştahsızlık ve piyogranülomatöz bronkopnömoni şekillenmekte (Stein ve Stott 1979, Prescott 1991), buffalolardada mastit ve piyometriye (Rajagopalan 1938, Prescott 1991) ve foklarda kütanöz nodüllere neden olmaktadır (Bauwens ve ark. 1987).

1.8.3. İnsanlarda Klinik Bulgular

Rhodococcus ailesi genel olarak bitki ve evcil hayvanlarda enfeksiyona neden olsa da insanlar için fırsatcı patojenlerdir. İnsanlardaki klinik örneklerden *R. luteus, R. erythropolis, R. rhodochrous, R. aichiensis, R. chlorophenicolus, R. chubuensis R. coprophhilus, R. fascians, R. globerulus, R. marinonascens, R. maris, R. obuensis, R. rhodnii, R. roseusve R. ruber* izole edilsede, enfeksiyona en çok neden olan tür *Rhodococcus equi'*dir (Hasçelik 2002).

İlk kez 1920 yılında atlarda bronkopnömoni etkeni olarak tanımlanan *R. equi* 1967 yılında kronik hepatit için kortikosteroid tedavisi gören bir insanda akciğer enfeksiyonunda ilk kez izole edilmiştir (Golup ve ark. 1967, Hondalus 1997, Puthucheary ve ark. 2006,Yamshchikov ve ark 2010).

R. equi enfeksiyonlarının primer konakçısının atlar olmasına rağmen mikroorganizma insanlarda fırsatçı patojendir. AIDS, kortikosteroid kullanımı olan, alkol bağımlıları, lenf ve kan tümörleri veya organ transferi uygulamaları sonucu hücresel immun yetmezlik gelişmiş kişilerde duyarlılık gelişniştir (Prescott 1991, Takai 2003, Yamshchikov ve ark 2010). Enfeksiyon özellikle at çifliklerinde veya büyükbaş hayvan çifliklerinde çalışmakta olan kişilerde daha sıklıkla görülmektedir. Bu kişilerin enfekte gübre veya gübreyle kontamine olmuş toprağın solunması ile etkeni aldıkları tahmin edilmektedir. Ayrıca, *R. equi* ile enfekte hayvanlarda kullanılan tıbbı aletler aracılığı ile de bulaşma gerçekleşebilmektedir (Prescott 1991, Takai ve ark. 2003). Bunların yanı sıra çevresel etmenlerle *R. equi*'yi alan kedi ve köpeklerin de insanları enfekte etmekte bir kaynak olduğu düşünülmektedir (Takai 2003).

Enfeksiyon insanlarda subakut veya kronik seyirlidir (Guerrero ve ark. 1999), büyük oranda akciğerde lokalize olmakta akciğer abseleri, pnömoni ve pnömotoraks geliştirmektedir. Enfeksiyon kendini halsizlik, ateş, prodüktif olmayan öksürükle ve göğüs ağrıları sikayetleri ile göstermektedir (Prescott 1991, Puthucheary ve ark. 2006, Yamshchikov ve ark 2010). Akciğer dışında beyin, deri, göz, kolon ve kemiğe yayılma göstererek bu bölgelerde selülit, septik artrit, osteomiyelit, otitis media,

tiroid abseleri, servikal lenfadenit, plevral effüzyon, kanlı ishal, paraspinal abseler, gözde açık yaralara, prostetik veya deri altı abselerinin oluşması ile kendini gösterebilir (Prescott 1991).

İnsanlarda *R. equi* suşları çeşitlilik içermektedir (Makrai ve ark 2002). Enfeksiyonların sadece %20'si virülens suşlardan kaynaklanmaktadır (Takai ve ark. 1994, Nicholson ve Prescott 1997, Giguere ve ark. 1999, Makrai ve ak. 2002, Takai ve ark. 2003, Giguere 2010). İnsanlarda enfeksiyonu Vap B antijenine sahip orta dereceli virülent suşlar ve toprakta yaygın bulunan virülent olmayan suşlardır (Nicholson ve Prescott 1997, Giguere 2010). Ayrıca, Vap A antijeni negatif suşlarda beta laktam direnci mevcuttur (Hondalus 1997).

R. equi'ye yönelik kesin bir tedavi olmamasına karşın antimikrobik tedavi ile cerrahi tedavinin birlikte uygulanması ile hastanın yaşam süresinin uzatılması hedeflenmektedir. Öncelikli tercih edilen antimikrobik ilaçlar kinolon, rifampin, eritromisin, levofloksakin, ciprofloksasin makrolidlerdir. Alternatif antimikrobik ilaçlar ise tetrasiklin, kilindamisin, sefolosporin ve vankomisindir (Puthucheary ve ark. 2006, Yamshchikov ve ark 2010). Bunun yanında immun sistemi baskılanmış hastalarda ilk tedaviden sonra sürekli baskılayıcı tedavi uygulanması gerekmektedir.

1.9. TEŞHİŞ METOTLARI

R. equi oluşturduğu pnömonilerin streptococcus türleri gibi çeşitli patojen etkenlerden ayırt edilmelidir Bunun için tam kan sayımı, radyografive ultrosongrafi, bakteriyolojik ve serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Teşhis metotları içinde trakeal-bronşial lavaj örneğinin bakteriyolojik olarak incelenmesi altın standar kabul edilmektedir (Giguere ve Prescott 1997).

1.9.1. Klinik Laboratuvar Yöntemleri

R. equi pnömonisi ilk olarak spesifik olmayan öksürük ve vücut ısısının yükselmesi ile kendini göstermektedir. Fakat bu belirtiler *R. equi* ile beraber ruam akciğer formu ve *Streptococcus zooepidemicus* enfeksiyonlarında da görülmektedir

(Giguere 2001). Erken teşhiş için yapması gereken; sabahları çiftlikte bulunan tüm tayların solunum hızı ve solunum kuvveti değerlendirmeli, solunum hızı artan tayların rektal vücut sıcaklığı ölçülmeli, rektal vücut sıcaklığı 39°C yüksek olanların vücut sıcaklığı artmış kabul edilmeli ve tam kan sayımına bakılmalı ve son olarak tam kan sayımında lenfosit ve fibrinojen değerlerindeki artış dikkate alınmalıdır (Heidmann ve ark. 2006). *R. equi* diğer mikroorganizma enfeksiyonlarından ayıran hiperfibrinojenemi'dir. Bunun dışında genel bir enfeksiyon olduğunu isaretini veren monositlerle beraber nötrofil ve lökositlerdeki artış spesifik değildir (Giguere ve Prescott 1997, Giguere 2001).

Klinik teşhis için radyografi ve ultrosongrafiden yararlanılır. Erken lezyonlarda yapısal intestisiyal biçim ve konsolidasyon görülürken kronik formda değişken boyutlarda nodüller olarak akciğer apseleri görülmektedir. Fakat *Streptococcus zooepidemicus ve* diğer anaerob bakterilerde akciğerde apse oluşumuna neden olmaktadır (Giguere ve Prescott 1997, Heidmann ve ark. 2006, Özsoy 2007). Uygulanan klinik teşhiş metotlarının hiçbiri kesin teşhis için yeterli değildir (Heidmann ve ark. 2006).

1.9.2. Bakteriyoskopi ve Kültür

Klinik teşhis metotlarının yetersizliği, serolojik testler için gerekli ekipmanın zor bulunması ve uygulamanın zaman alması, hiperimmun plazmanın yaygın kullanımı ve endemik bölgelerde neredeyse tüm tayların yaşamın ilk 2 ile 3 ayında *R. equi* antikor titrelerinin yüksek olması sonucu serolojik testlerin yorumlanması zorlaşmaktadır (Heidmann ve ark. 2006). Bu nedenlerden dolayı trakeobronşial aspirasyon (TBA) sıvısından, bronkoalveolar lavaj (BAL) veya nekropsiden elde edilen akciğer dokusu ile mezenteriyal lenf düğümlerinden bakteri kültürü ve fenotipik testler *R. equi* pnömonileri için altın standart kabul edilmektedir (Giguere ve Prescott 1997, Giguere ve ark. 2002, Heidmann ve ark. 2006, Özsoy 2007, Hines 2007). Bazı vakalarda eklem sıvısı ve peritonel sıvıda kültüre edilmelidir (Hines 2007). TBA sıvısı fiberoptik endoskopun trakeal kanaldan geçirilerek steril polietilen tüp ile alınır (Giguere ve Prescott 1997). Bu uygulama esnasında nazal veya frangeal kökenli bakteri kontaminasyonuna dikkat edilmelidir. Ağır solunum sıkıntısı olan

taylarda TBA sıvısı alınması kontrendikedir. Burun ve dışkı örneklerinin *R. equi* kültürü pozitif sonuçlar kanıt olarak kabul edilmemektedir (Giguere ve Prescott 1997). Çünkü inhalasyon sırasında çevredeki tozların alınması ile kontaminasyon şekillenebilir (Hines 2007). Dışkı örnekleri virülens olmayan *R. equi* bulunma oranından dolayı bakteriyoskopide örnek olarak kabul görmemektedir.

Alınan örnekler *R. equi* izolasyonu için Glukoz maya özeti ağar, Mac Conkey, Trypticase Soy, Kanlı ve selektif besi yeri olan Nalidiksik asit-Novabiosin Siklohekzimid-potasyum Tellürit (NANAT) agara ekilmektedir (Giguere ve ark. 2002, Kanat 2007, Özsor 2007). Kanlı agarda aerobik 37°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrası S tipi parlak, hemolizsiz ve mukoid koloniler oluşmaktadır (Hines 2007). *R. equi* kolonilerinin karakterislik özelliği zamanla somon pembesi renginde damla şeklini almalarıdır (Hines 2007). Gram boyamada mikroskopta Gram pozitif kok görünümündedir (Prescott ve ark. 1982, Takai ve ark. 1991c, Özsoy 2007, Yamshchikov ve ark. 2010). Ayrıca doku kesitleri üzerinde uygulanan immunoperoksidaz boyama tekniğinde de benzer görüntü elde edilir (Özsoy 2007). Sıvı besi yerinde bulanık dipte tortulu bir görünüm oluştururlar ve Gram boyama ile mikroskopta çomak görünündedirler (Barton ve Hughes 1980, Takai ve ark. 1991c). NANAT'ta ise *R. equi* aerobik ortamda 37°C'de 24-72 saatte gri renkte ve mukoid, koloniler oluştururken (Woolcock ve ark 1978), glukoz maya ekstraklı agarda portakal renginden kırmızıya değişen S tipi koloni oluşturmaktadır. Triptik soy agarda ise 30°C'de 48-72 saatte mukoid S koloni oluşturmaktadır (Barton ve Hughes 1980).

Yakın zamanda antibiyotik uygulanmış taylarda kültürün üremesi 72 saatten fazla sürebilir veya sadece anaerobik bakteriler izolasyonu gerçekleşebilir (Prescott ve Hoffman 1993, Giguere ve Prescott 1997, Hines 2007). Bir diğer dejavantajıda kontamine ortamlara maruz kalmış klinik hastalığı olmayan taylarda kontamine toz inhalasyonu sonucunda trakeadan *R. equi* izolebilir (Giguere ve Prescott 1997).

Sitoloji ve kültür *R. equi* için altın standart olarak kabul edilsede serolojik test metotları ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi daha duyarlı ve kesin test

metotlarıdır. Bu test metotlarında özellikle Vap A proteinin tesbiti temel oluşturmaktadır (Giguere ve Prescott 1997, Heidmann ve ark. 2006, Hines 2007).

1.9.3. Serolojik Laboratuvar Yöntemleri

1.9.3.1. Agar jel İmmünodiffüzyonu (AGID)

Agar jel İmmünodiffüzyon testi jel içerisinde antijen ve antikor moleküllerinin diffüz olarak yayılmaları ya da elektrikli ortamda belirli yöne hareket ettirilerek birleşmeleri sonucu presipite olarak görüntülenme esasına dayanmaktadır (Erganiş ve İstanbulluoğlu 1994).

Bu yöntemde; *R.equi* suşlarının büyük çoğunluğunun sahip olduğu membranolitik ekzoenzimlere karşı tetikleyici olan antikorların saptanmasıdır (Giguere ve Prescott 1997). *R. equi* sahip olduğu membranolitik ekzoenzimler kolesterol oksidaz, kolin fosfohidrolaz ve fosfolipaz C'den oluşmakta ve equi faktör olarak isimlendirilmektedir. Taylarda doğumun itibaren beş aylık oluncaya kadar 2 hafta aralıkla yapılan AGID testi bazen erken tanıda başarılı olabilmektedir. Ancak enfekte tayların çok azı AGID ile belirlenebilecek düzeyde antikor oluşturabilmektedir (Giguere ve Prescott 2014). Bu yöntemin bir diğer dezavantajı da maternal antikorlaradan kaynaklanan yalancı pozitifliktir (Gaskin ve ark 1990).

1.9.3.2. *Rhodococcus equi* Opsonizasyon Testi

Süpheli serumların opsonik kapasitelerini belirlemek amacı ile uygulanan bir test olup opsonin-fagositoz süresi belirlenmeye çalışılmaktadır. *R. equi* için bu teste klinik açıdan sağlıklı olan atlarda polimorfonükleer lökositler tarafından fagosite edilmiş *R. equi* sayısı sayılarak serumun opsonik kapasitesi belirlenir (Prescott 1991, Cauchard ve ark. 2004).

1.9.3.3. Westernblot Analiz Testi

Westernblot analiz testi; araştırılacak etkenin (bakteri, virüs, kanserojenik doku) protein çözelitisinde belirlenen spesifik protein olup olmadığını ve ne oranda bulunduğunu belirlenmesi oluşturur. Şüpheli etkeni içeren örnekler ve kontrol örneği jel katmanının belirlenen noktasına yerleştirilir. Elektrik akımı ile numunelerdeki proteinlerin jel boyunca hareket etmesi sağlanır. Böylece proteinler şekil ve büyüklüklerine göre ayrılmış olurlar. Bakıldığında portatif merdivenin basamaklarına benzer bantlar görülür, devamında süpheli numuneler ince bir membranın üstüne aktarılır. Membrana bağlanmış proteinlerin tespiti içinde süpheli patojene karşı oluşan ve işaretlenen antikorlar kullanılır.

R. equi için bu test metodunda; VapA içeren saflaştırılmış *R. equi* protein çözeltisi elektroforez jelleri ile ayrılmıştır. Daha önceden belirlenen VapA ve *R. equi* karşı oluşan işaretli antikorlar aracılığı ile hem VapA hem *de R. equi* gösterilir (Cauchard ve ark 2004).

1.9.3.4. Sinerjik Hemoliz Baskılanması (SHI)

R. equi'nin equi faktörü, *C. pseudotuberculosis*'in fosfolidaz D'si, *S. aureus*'un beta toksini ve *L. monocytogenes'in* hemolizini ile sinerjik oluşturarak memeli eritrositini hemoliz eder. Bu özellik *R. equi* hızlı idendifikasyonu için kullanılan testlerin temelini oluşturmaktadır (Linder ve Bemheimer 1982, Prescott ve ark. 1982, Timoney ve ark. 1988, Takai ve ark. 1991b, Takai ve ark. 1991c, Hondalus 1997, Giguere ve Prescott 1997, Weinstock ve Brown 2002, , Puthucheary ve ark. 2006, Sönmez 2007). *R. equi'nin* equi faktörüne karşı antikor varlığı sinerjik hemolizin başkılanması ile sonuçlanacaktır. Bu test metod ile doğal olarak *R. equi* pnömonisine yakalanan taylar ile sağlıklı tayları ayırt edilebilinmiştir (Prescott ve ark 1984). Fakat, deneysel olarak enfeksiyon oluşturulan taylarda hastalığın erken evresindeki tayların tanımlanmasında başarısız olunmuştur. Daha duyarlı bir SHI testi ile taylarda subklinik enfeksiyon tanımlanmıştır (Skalka ve Svastova 1985).

1.9.3.5. *Rhodococcus equi* Supernatant Protein Deri Testi

R. equi'nin hücre duvarı karakterislik olarak tek bir lipitten, lipoproteinlerden ve glikolipidlerden oluşmaktadır. Makrofajların içine fagozomla girerek hayatta kalabilmektedir ve akciğerde özellikle de taylarda pyogranülomatöz lezyonlara neden olmaktadırlar. Hücreiçi bakteri oluşu ve hücre duvarının yapısı ile *Mycobacterium tuberculosis'*e benzerlik göstermektedir. R. *equi'den* elde edilen supernatant protein antjenleri ile deri testi antijeni hazırlanmıştır (Al-Salihi 2011). *R. equi*'nin avirülent suşunun toprakta çok yaygın olmasından dolayı özellikle yaz aylarında tozlu ve kuru havalarda virülent suşlar kadar avirülent *R. equi* suşların taylar ve yetişkin atlar tarafından oral veya solunum yolu ile alınması gerçekleşmektedir. Bu nedenle, bu testte *R. equi'*nin avirülent suşunuda alan konakçılarda pozitif sonuç vermektedir.

1.9.3.6. Enzim Bağımlı İmmünoserbent Assay (ELISA)

ELISA, antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir. Test metodun temelini 1960 yılında Solomon Aoron Berson ve Rosalyn Sussman tarafından geliştirilen RIA (Radioimmunoassay) oluşturmaktadır. RIA yönteminde radyoaktif ajanlarla işaretlenmiş antijen, bu antijene bağlanabilen belirli miktarda antikor ile karıştırılır. Bu karışıma hasta serumu eklenir. Hasta serumundaki antijen ile radyoaktif etiketli antijen yarışmalı olarak antikor ile birleşmeye çalışırlar. Antijen-antikor kompleksindeki isaretli antijen ile serbest haldeki isaretli antijenlerin oranı ölçülür. ELISA yöntemide RIA'daki antijen ve antikorların sıvı ortamdaki hareketsiz partiküllere bağlanma yeteneği gözlemlenerek geliştirilmiştir. ELISA metodunda antijenlerin yanı sıra antikorlarda ölçümde kullanılabilinmektedir. Ayrıca radyoaktif ajan kullanılmadığı için maliyeti daha düşük ve daha kolay test metodudur.

R. equi 'ye karşı hümoral bağışıklık yanıtının ölçülmesinde dört farklı ELISA temel olarak belirlenmiştir. Bu dört farklı ELISA metodu farklı antijenler kullanılarak geliştirilmiştir. Kullanılan antijenlerden biri ATCC 6939 tip suşudur (Giguere ve Prescott 1997, Vanniasinkam ve ark. 2001). Bu ELISA metodunda

avirülens *R. equi* suşları tanımlanmıştır (Takai ve ark. 1986, Giguere ve ark. 2003). Kullanılan diğer antijen 33701 suşu dur. Bu ELISA metodunda ise virülens plazmit içeren *R. equi* ortaya konmuştur. Son olarak ELISA VapA'da *R. equi* dominant antijenik determinantı rekombinant VapA proteini kullanılırken, ELISA California metodundada *R. equi* suşlarının klinik izolatların süpernanatları antijen olarak tanımlanmıştır (Giguere ve ark. 2003). Bu test metotlarından en ideallerinin ELISA California ve ELISA VapA olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. VapA protein sahip *R. equi* suşların makrofajlarda canlı kalabildiği bölünebildiği ve taylarda hastalık tablosunu oluşturduğu kanıtlanmıştır (Giguere ve ark. 1999). ELISA ile yarı saf VapA proteine karşı oluşan ciddi antikor titresinin ölçülebilmesidir (Vanniasinkam ve ark. 2001).

1.9.4. Moleküler Teşhiş Metolar

1.9.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

R. equi teşhisinde şüpheli numunelerden *R. equi* plasmid DNA'sı veya kromozomal yapısı kullanılarak PCR'dan yararlanılır. PCR'da VapA için spesifik primer kullanılır (Hines 2007). Çünkü özellikle atlarda oluşan pnömoni nedeni VapA sahip virülent *R.equi'*dir. PCR yöntemi sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir yöntemdir. Bir çalışmada 56 tane akciğer enfeksiyonu şüphesi olan taydan alınan trakeal sıvı örneklerinde PCR ile VapA proteini tespitinin sensitivitesi %100 ve spesifitesi %96,6 olarak belirlenmiştir . Virülent ve avirülent şuşlar 12 -24 saat gibi kısa sürede ayırt edilebilmektedir (Sellon ve ark 2001, Hines 2007).

Bununla birlikte, PCR *R. equi* için daha doğru ve hızlı sonuç vermesine rağmen çeşitli dezavantajları mevcuttur. Bunların başında saha koşullarında uygulanamaması ve uygulama için labaratuar ortamını gerektirmesidir. Ayrıca, özellikle trakeal-bronşial aspirasyon uygulanan PCR metotlarında çevresel kontaminasyonlar yalnış pozitiflik verebilmektedir. Bazende numunedeki diğer bakteriler *R. equi*'nin ortaya çıkmasını engelleyebilir (Cohen 2014).

1.10. TEDAVİ

Tedavi için ilk yapılması gereken enfekte tayın veya yetişkin atın bulunduğu alanın iyi havalanmasının sağlanması gerekmektedir. Bunun yanı sıra başka enfeksiyon etkeni girişide engellenmelidir. Hipoksemi oluşan atlarda nemlendirilmiş oksijen ile solunuma destek verilmeli non steriod antienflamatuar ilaçlar uygulanmalıdır. Bu durum için bronkodilatörler nadiren işe yaramaktadır. Bunlarla beraber alveoller makrofajlar içindeki *R. equi'*ye etkili biçimde nüfus edebilecek antimikrobiyal ajan kullanılması gerekmeketdir (Giguere ve Prescott 1997, Giguere 2010). İdeal etkiyi oluşturacak mikrobiyal ajanlar *R. equi* polisakkarit duvarına etkileyenlerdir (Buckley ve ark 2007).

R. equi pnömonisi olguları için tek başına antibiyotik tedavisi yerine birleşik antibiyotik ilaç tedavisi yöntem olarak kabul edilmiştir. Tedavi için 1980'lerde ilk tercih edilenler eritromisin ve rifamisinin birlikte kullanılmasıdır (Giguere ve ark. 2002, Heidmann ve ark 2006, Giguere 2010b). Bu tercihin nedeni organizmanın konak defanslarından kaçıp makrofajlar içinde çoğalabilme becerisinden dolayı hem eritromisin(25 mg/kg) hem de rifamisin (5mg/kg) granülositlerde ve makrofajlarda konsantre olabilmesidir (Heidmann ve ark 2006). Fakat eritromisin ağız yoluyla verildiğinde taylardaki emilimi değişkendir ve kolit, idiosenkrazik hipertermi ve değişen oranlarda ishal gibi istenmeyen etkiler oluşabilmektedir (Heidmann ve ark. 2006, Giguere 2010b). Ayrıca, virülent *R. equi* suşlarının eritromisine direnç kazanmaya başladığını (Buckley ve ark. 2007) ve rifamisine %4 oranında dirençli olduğu belirtilmiştir (Giguere 2010b).

İnsanlarda *R. equi* pnömonisinin tedavisinde klaritromisin veya azitromisin/rifampin birlikte kullanımının daha iyi sonuç vediği göstermektedir. Son zamanlar *R. equi* enfeksiyonuna karşı taylarda da bu kombinasyonlar kullanılmaya başlanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Çünkü klaritromisin ve azitromisin, eritromisine kıyasla yarılanma ömrüleri daha uzundur. Ayrıca bronşiol alveolere ve akçiğer hücrelerine daha düşük dozlarda daha yüksek konsantrasyonlarda etki edebilmektedirler (Davis ve ark. 2002, Giguere 2010b).

Alternatif tedavi olarak doksisiklin (10 mg/kg) ile rifamisinin birlikte kullanılabilir. Doksisiklin- rifamisiin ve diğer makrolitler ile yüksek düzeyde sinerjik etkisi vardır. Bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde; antibiyotiklerin sıralaması vankomisin, imipenem, ve rifampin olarak belirtilmiştir. Ancak, vankomisin ve imipenem insanlara *R. equi* enfeksiyonlarında kullanıldığı için direnç oluşumunu engellemek amacı ile tercih edilmemektedirler (Giguere 2010b).

Taylarda meydana gelen karın bölgesindeki apselerde uzun süren antibiyotiklere cevap vermeyebileceklerinden apselerin cerrahi olarak uzaklaştırılması gerekmektedir (Valdes ve Johnson 2005, Giguere 2010b).

1.11. KORUNMA

1.11.1. Hiperimmun Plazma Uygulaması

Hiperimmün plazma bilinen en iyi opsonin olan IgG'yi sağlamaktadır. Hiperimmun plazmanın koruma sağladığı mekanizmanın IgG harici diğer molekülleri fibronektinler, komplement birleşenleri kollektinler, sitokinler ve akut faz proteinleridir (Giguere ve ark 2002). Bunlar konağın hücrelerini aktifleştirerek sitokinlerin, diğer kemotaktik moleküllerin, toksik oksijen ürünlerinin ve prostaglandinlerin serbestleşmesini ve bir yangı cevabı sağlar (Cauchard ve ark. 2004). Bu etkilerinden dolayı taylarda *R. equi* karşı direnç sağlamak için hiperimmun plazma uygulanır. Hiperimmun plazma uygulaması ile azalan materyal antikorlara bağlı olarak *R. equi* enfeksiyonuna karşı hassasiyeti yüksek olan 4- 6 aylık yaştan küçük taylar patojen etkene karşı anti-*R. equi* antikorlarına ve humural bağışıklık cevabını geliştirecek immun modülatörlere sahip olmuş olurlar (Hines ve ark 1997, Dawson ve ark 2010).

Hiperimmun plazma uygulanan taylarda *R.equi* etkenine karşı morbiditede ve mortalitede azalma olduğunu (Martens ve ark 1991, Becu ve ark 1997) ve ancak *R. equi* pnömonisine karşı etkin koruma yöntemi olmadığını belirtilmektedir (Giguere ve ark. 2002, Dawson ve ark. 2010). Bu durumun kullanılan hiperimmun plazmanın kaynağı, bileşimindeki farklılıklar ve nakledilen antikorların tüketiminden

kaynaklandığı ifade edilmektedir (Giguere ve ark. 2003, Heidmann ve ark. 2006). Hiper immun plazma uygulamasının esas dezavantajı uygulama ile elde edilen pasif bağışıklığın hem pahalı hemde geniş kitlelerde kullanılmayacak kadar zor olmasıdır (Phumoona ve ark 2008). Bunun yanısıra *R. equi* karşı koruma için hiperimmun serum uygulamalarının ile aşı uygulamaları birlikte düşünülmelidir.

Hipperimmun plazma uygulamalarında başarıyı etkiliyen faktörler; plazma elde edilecek donörlerin bağışıklanma yöntemleri, donörden hiperimmun plazma elde etmek için kullanılan antijen, uygulanan hiperimmun plazmanın dozu ve uygulama zamanı, alıcının doğal bağışıklık sistemi, bölgedeki şuşların virülensi ve sürü yönetimidir (Giguere 2002, Dawson 2010). Hiperimmun plazmada koruyucu cevabı şekillendiren unsurun immunoglobulinler olduğu ortaya konulmuştur (Hopper-Mcgravy ve ark 2001) . *R. equi* VapA ve VapC proteini ile bağışıklanmış olan atlardan alınan saflaştırılmış Ig'lerin uygulandığı taylarda koruyucu olduğu belirtilmiştir (Hopper-Mcgravy ve ark 2001). Farklı bir çalışmada ise VapA ile zenginleştirilmiş antijenlerle bağışıklanmış atlardan alınan saflaştırılmış anti-VapA IgG'leri kobaylarda koruyucu bir etki oluşturdugu gözlemlenmiştir (Fernandez ve ark. 1997, Giguere ve ark. 2002, Cauchard ve ark. 2004). Hiperimmun plazmanın tayları *R. equi* karşı korumaktaki rolü iyi opsonizan aktivitesi olan antikorların taylara geçmesini sağlamasıdır. *R. equi* 'nin hücre dışında bu opsonizan antikorlar ile birleşmesi sonucu makrofajlarca fagozom edilerek öldürülme oranı artmaktadır (Heitala ve Ardans 1987, Cauchard ve ark. 2004).

R. equi karşı hiperimmun plazma uygulamalarındaki başarısızlığın esas nedenleri ise hipper immun plazmada VapA ve VapC gibi proteinlerine karşı spesifik antikorlarının yetersiz oranda bulunmasıdır (Lopez ve ark. 2002). Aşı suşlarının yalnış seçimi, saha suşlarına göre genetik olarak farklı veya virülensini üretim esnasında kaybetmiş suşların kullanılması, atların yetersiz dozda aşılanması, yanlış adjuvant seçilmesi ve atın immunogenetik yapısıdır. Bu uygulama hatalarının yanında hiper immun plazma istenilen düzeyde anti *R.equi* VapA ve VapC spesifik antikorları içersede hiperimmun plazma uygulaması sürü idaresi uygulamalarına bağlı istenilen sonuçu veremeyebilir. Sürü idaresindeki en temel problem ise bir yandan hipperimmun plazma ile sürüde korunma sağlanırken diğer yandan enfekte tayların dışkıları ile çevreye ortalama 10^{6} ^{CFU} virülent *R. equi*/gram suşlarının

saçılmasıdır. Dışkı bulunan ucucu yağ aşitlerini kullanma becerisi ile *R. equi* sayısını binlerce kat arttırmakta ve sürekli yayılmaktadır (Hughes ve ark. 1987, Takai ve ark 1994).

Uygulamanın zamanın belirlenmesinde; taylarda antikor ve diğer plazma bağışıklık unsurlarının seviyeleri azalmalıdır (Dawson ve ark. 2008). Hiperimmun plazma *R. equi* etkenin alınmasından önce uygulanması gerekmektedir. Fakat erken uygulanırsa hem anneden klostrumla geçen maternal bağışıklıktan dolayı aktarılan antikorlar yeteri kadar etkili olmayacak hemde taylar *R. equi* karşı duyarlı iken aktarılan antikorlar koruyucu olmayan düzeylere olacaktır. Bunun için, birinci uygulamada ilk 10 günde bir kez ve ilk 30 ile 50 gün arasında ikinci kez hiperimmun plazma verilmelidir (Giguere ve Prescott 1997, Giguere ve ark. 2002). Ayrıca, *R. equi* enfeksiyonunun yoğun görüldüğü endemik çiftliklerde daha çok tercih edilmekte olup doğumu takiben ilk 24 saatte birinci uygulama ve 3-4 haftalık iken ikinci uygulama da yapılabilir (Heidmann ve ark. 2006).

1.11.2. Aşılama

R. equi hücre içi fakültatif bir bakteri olduğu için hücre aracılı bağışıklık mekanizmalarının dirençteki rolü büyüktür (Meljer ve Prescott 2004). Sağlıklı taylar yetişkin atlar da olduğu gibi aynı lenfoproliferatif cevapları oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra taylar *R. equi'*ye 6 aylık ile 1 yaş aralığında duyarlılığı devam etmektedir (Cauchard ve ark. 2011). Bu nedenle endemik çifliklerdeki morbidite ve mortaliteyi azaltmak için; anti-*R. equi* antikorlarının hiper immun at plazması ile pasif aktarılmasına ek olarak yeterli antikor oluşması ve Th1 cevabının arttırılması için taylara ve etkili klostrum elde edilebilmesi için yetişkin atlara aşı uygulaması önemlidir (Meljer ve Prescott 2004; Cauchard ve ark. 2011).

Tayların aşılanmasının önemi solunum sistemi patojenlerine karşı etkili bağışıklık cevabının gelişmesi için akçiğerdeki ve bölgesel lenf yumrularındaki mevcut bellek hücrelerin uyarılması gereksiniminden gelmektedir. Kısrakların aşı ile aktif bağışıklanması ve kolostrum yolu ile maternal bağışıklığın taylara pasif aktarılması, tek başına tayları *R. equi* pnömonisi gelişiminden koruyamamaktadır

(Lopez ve ark. 2003). Kolostrum ile etkili bağışıklık oluşmamasının nedenleri kısraklardan immunglobulin izotiplerinin kolostruma yeterince aktarılamaması, immunojen ve immunization protokollerinin yeterli antikor sağlayamaması veya spesifik antijen spesifitesine sahip olmayan antikor sağlanması olduğu ifade edilmektedir (Hines ve ark. 1997). Ayrıca kolostrum ile alınan maternal antikorlar taylarda immunolojik uyumsuzluk ile hemolitik hastalığının şekillenebilmesi ve *R. equi'*ye istenen aktif bağışıklığın baskılanmasıdır (Takai ve ark. 1986).

Aşılamadaki sorunlar yeni doğan tayların sahip olduğu olgunlaşmamış antijen sunan hücre foksiyonları, yeni doğan tayların doğal bağışıklığının Th2 eğilimli oluşu, maternal antikorların varlığının asıl bağışıklık cevabının şekillenmemesini ve sınırlı kapasite ile hücre içi patojeni temizlemek kolay değildir (Lopez ve ark 2003). Bağışıklıkta başarılı olunabilmesi aşının ve adjuvantın tayın doğal bağışıklık sisteminin engelleyici unsurlarını etkisizleştirmesi, CD4+ ve CD8+ T lenfosit hücrelerinin düzeyini serumda arttırması ve sitokin üretim devamlılığı sağlanmasına bağlıdır.

Aşının başarısını etkileyene faktörler yetişkin atlara ve taylara uygulanan aşı için seçilen antijen ve adjuvant, aşının uygulama yolları, uygulama zamanı, aşı için ayarlanan antijenin dozu gibi çeşitli unsurlar içermektedir (Dawson ve ark. 2010). Aşı tohumu olarak seçilen antijen aşının etkinliğinde önemlidir. Etkin aşılar doğru antijen seçimine dayanmaktadır (Heidmann ve ark. 2006). *R. equi* inaktif veya zayıflatılmış antijenlerin kullanılması *R.equi* pnömonisinin oranının azaltılmasında farklılık olmadığı ifade edilmiştir (Takai ve ark 1998). Fakat aşı denemelerinde ise avirülent yada ısı ile öldürülmüş olan suşlara kıyasla canlı virülent *R. equi* suşları ile hazırlanan aşıların farelerde daha koruyuculuğunun daha iyi olduğu rapor edilmiştir (Takai ve ark 1999).

Son zamanlarda tüm hücre *R. equi* antijeni yerine VapA, VapD, VapF ve VapG proteinleri aşı materyali olarak kullanılmaktadır. Saha çalışmasında gebe kısraklara su bazlı nanoparçacıklı IMS 3012 adjuvatlı VapA aşısı ile inaktif *R. equi* aşısının karşılaştırılmasında; inaktif *R. equi* ile aşılanan kısraklara göre VapA ile aşılanan kısraklarda yüksek titrede IgG içeren ve opsonize antikorların kolostrumla

taylara verilebildiği ve Th1/Th2 cevabı şekillendirdikleri belirtilmiştir (Cauchard ve ark. 2004, Dawson ve ark. 2010). Diğer bir çalışmada VapA proteini ile bağışıklanan atların serumlarında IgGa ve IgGb izotip antikorlarının yüksek titrede bulunduğu ve akciğerlerde etkenin immün temizliğinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yetişkin atlardaki dalaktaki T lenfositlere kıyasla solunum sisteminde T lenfositlerin daha az oranda olduğu ve VapA'nın çok iyi bir tetikleyici olduğu ifade edilmiştir. (Takai ve ark. 1992, Hines ve ark. 2001, Lopez ve ark. 2002). Doğuma yakın dönemde gebe kısraklara yapılan VapA ve inaktif *R. equi* ile aşılanması mortaliteyi ciddi oranda azalttığı gösterilmiştir (Becu ve ark 1997). Fakat kolostrumdaki antikorların hiperimmun plazmadakiler kadar koruyucu olmadığı da belirtilerek profilaktik olarak tek başına kısrakların aşılanmasının yetersiz olduğu belirtilmiştir (Dawson ve ark. 2010). *Lactococcus lactis* bakterisine *R.equi*'nin VapA'sıaktarılarak LL-VapA ile *L. lactis'in* fleotropik leptin hormonu salgılıyabilen rekombine suşu LL-lep ile birlikte kombine olarak intranazal olarak farelerde uygulandığında; Th1 cevabı oluştururken intragastrik uygulamada Th1/Th2 bağışıklık cevabı oluşturmaktadır (Cauhard ve ark 2011).

Vap proteinleri *R. equi* enfeksiyonlarına karşı önemli bir immünojen olup kobay modellerinde etkin bir Th1 yanıtı oluşturmaktadır (Prescott ve ark. 1997, Taouji ve ark. 2004). Bu özelliklerinin yanında VapA ile zenginleştirilmiş antijenlere karşı yönelmiş antikorlar enfeksiyonun ilk aşamalarını engelleyerek tayları enfeksiyondan korumaya eşlik etmektedirler (Fernandez ve ark. 1997, Hooper-McGrevy ve Prescott JF 2001, Taouji ve ark. 2004). *R. equi* pnömonisinden iyileşen taylarda Vap A'ya karşı belirgin bir antikor yanıtının oluşmaktadır (Takai ve ark. 1991c, Taouji ve ark. 2004). Vap protein aşıları denemelerinde adjuvant seçimi de başarıyı etkilemektedir. Farelerde adjuvant olarak alümiyum hidroksit kullanılan aşıların uygulanması sonrası farelerin eprüvasyonunda Th2 cevabının yüksek olmasına rağmen bakterilerin immün temizliği gerçekleşmemiştir (Prescott ve ark. 1997, Dawson ve ark. 2010). Başka bir çalışmada ise tayları alümiyum hidroksit adjuvantl ve VapA ekstresi ile aşılanması sonrası yapılan eprüvasyonda IgGb ve IgG(T) cevabı oluşmasına rağmen suppüratif pnömoni şekillenmiştir. Bununla birlikte eprüve edilmeyen taylarda ise baskın IgGa cevabı tespit edilmiştir (Prescott ve ark. 1997, Hines ve ark. 1997, Meljer ve Prescott 2004). Kısacası alümiyum

hidroksit adjuvant seçiminin *R. equi*'nin immün temizliğinde bir fayda sağlamadığı görülmüştür.

Son zamanlarda aşı çalışmalarında tercih edilen ISCOM adjuvantı kullanımında ise kuvvetli Th1 ve Th2 bağışıklık cevabının şekillendiği (Cox ve Coulter 1997) ve maternal antikorların etkisininde yok olduğu gözlenlenmiştir (Nordengrahn ve ark 1996). Bunun önemi maternal antikorların B lenfositlerin cevabını engelleyememesi ile olup T lenfositlerle beraber B lenfositler *R. equi'*ye karşı savaşabilmektedirler (Dawson ve ark. 2010). Diğer bir çalışmada ise düşük IFN- **γ ve** yüksek IL-2 oranı ortaya çıkmıştır. Ayrıca atlarda yağ bazlı adjuvantlarda yangı reaksiyonları daha sık görülmektedir (Cauchard ve ark. 2004). Su bazlı nanoparcacıklı adjuvant (az miktarda yağ içeren IMS 2211 veya çok daha az miktarda yağ içeren IMS 3012) ise yangı reaksiyonları oluşturmamakta, kobay ve yetişkin atlarda Th1 ve Th2 cevabı için VapA antijenine karşı antikor cevabını tetiklemektedir. Ayrıca elde edilen antikorların opsonik kapasitesi yüksek olduğu gösterilmiştir (Taouji ve ark. 2004, Cauchard ve ark. 2004).

Yetişkin atlarda uygulanan VapA temelli DNA aşısı sonrası VapA spesifik antikor artışı ve *R. equi'*nin immün temizliği şekillenmiş olsa da taylarda aşılama sonrası VapA spesifik antikorları denek grubundan yalnızca iki tayda tespit edilmiştir ve aşılamanın taylar için optimal koruma sağlamadığı belirtilmiştir (Lopez ve ark 2003). Yeni doğan taylarda antijen sunan hücrelerin sayıca yetersizliği ve T hücre aktivitesinde yetersiz kalınması olarak öne sürülmüş ve eksikliğin CD40 stratejisinin aktivite edilmesi ve IL-12 salınımı ile giderilebileceği ifade edilmiştir (Lopez ve ark. 2003). VapA DNA aşılarına IL-12 eklenmesi ile BALC/c farelerde Th1 bağışıklık cevabını uyardığı belirtilmiştir (Vanniasinkam ve ark 2005, Haghighi ve Prescoot 2005). Bu aşının fareleri *R.equi'*den korunduğu gösterilirken (Haghighi ve Prescoot 2005) diğer çalışmada aşının bakteriyel replikasyonu engelleyemediği (Vanniasinkam ve ark 2005) belirtilmiştir. İki çalışma arasında farklılığın nedeni olarak uygulanan antijen dozunun olabileceği ifade edilmiştir. DNA aşısı için kullanılan diğer *R. equi* antijenide ısı şok proteini GroEL'dir. GroEl2 ile VapA kombine hazırlanan DNA aşısı Th1 bağışıklık cevabının şekillendirebilmesine karşın canlı *R. equi* aşısına kıyasla DNA aşısı farelerde koruyu etki gösterememiştir (Phumoonna ve ark. 2008, Dawson ve ark. 2010).

DNA teknolojisi kullanılarak geliştirilmeye çalışılan bir diğer aşıda peptid aşılarıdır. Antijen çoğunlukla Vap A protein immünodominant B hücre epitopu bölgelerinden seçilen peptidlerdir. Aşı çalışmalarında daha çok su bazlı nanoparçacıklı adjuvant tercih edilmiştir. *R. equi* ATCC 33701 suşunun VapA iki major immünodominant B hücre epitopu antijen olarak kullanılmıştır (Taouji ve ark 2004). Peptid ile aşılan taylarda IFN-γ ve IgGb seviyelerinde belirgin olarak artış gözlemlenmiş ve ayrıca IL-4 ekspresyonunda baskılanma eşlik etmiştir. Bununla beraber, IL-10 ekspresyonunda anlamlı artış ve sonuç olarak Th2 cevabı şekillenmiştir. Ancak, çalışmanın 15. gününde IgGa ve IgG (T) seviyeleri düşük olarak belirlenmiştir (Taouji ve ark. 2004).

R. equi aşısının istenilen verilme yolu oral uygulamadır. Oral uygulamasının pratikliği, mukozal bağışıklığı sürekli uyarması ve intestinal virülent *R. equi* suşlarının kontamine haralarda taylar için önemli antijenik uyarıcılar olmasıdır. Sonuç olarak, taylarda serum *R. equi* VapA antikor etkinliği, hayatın ilk üç ayındaki fekal *R. equi* miktarı ile korelasyon oluşturacak şekilde görülmesi ve patojen etkenin giriş kapılarında enfeksiyonun engellenmesi istenmektedir (Cauchard ve ark. 2011). Fakat canlı virülent oral aşı uygulamalarında yalnış doz uygulaması sonucu tayların bağışıklık sisteminin zarar görebileceği ve virülent *R. equi* suşunun yayılma riskinin yüksekliğidir (Dawson 2010, Cauchard ve ark. 2011). Canlı virülent *R. equi* aşısının $1x10^8$ CFU/ml dozda intrabronşiyal uygulaması güvenli ve etkili bağışıklık oluşturduğu belirtilmiştir (Hooper ve ark. 2005).

Sunulan yüksek lisans tez çalışmasında, deneysel olarak *Rodococcus equi* etkenine karşı Bakteri+Vapa+Montanid IMS 3012 aşısı ile aşılanan ve aşılanmayan kısrakların ve hiperimmun plazma uygulanan tayların serum ve klostrum örneklerinde Vap A antijeni kullanılarak geliştirilen ELISA yöntemi ile bu etkene karşı gelişen antikor titrasyonunun ortaya konmasında yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmaştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.GEREÇ

2.1.1 Hayvan Materyali

Bu çalışmada, TUBİTAK–KAMAG-108G030 nolu "Taylardaki *Rhodococcus equi* Enfeksiyonu için Aşı, Hiperimmün Plazma ve Bağışıklık Ölçüm Kiti Geliştirilmesi" isimli proje kapsamında; Bakteri+Vapa+Montanid IMS 3012 aşısı ile aşılanan ve aşılanmayan kısraklar ve taylarından alınan serum ve klostrum örnekleri kullanılmıştır.

2.1.2. Serum Örnekleri

Kısraklar gebeliklerinin 7., 8. ve 9. ayında Bakterin+Vap A+IMS 3012 aşısı ile aşılandı. Birinci, 2. ve 3. aşılama sonrasında ve doğumda serum ve kolostrum örnekleri alındı.

Taylara 5. ve 25. günlerde SC yolla 200'er ml hiperimmün plazma verildi. Hiperimmün serum verilmeden öncesi ve 2 saat sonrasında taylardan kan örnekleri alındı.

Negatif kontrol olarak aşısız ve enfekte olmayan kısrakların ve tayların serum örnekleri, pozitif kontrol olarakta aşılı ve enfekte olmayan kısrakların ve tayların serum örnekleri kullanıldı.

2.1.3. VapA Antijeni

2.1.3.1. BHI Buyyon

Distile su	1000 ml
Brain heart infusion broth	37 gr
%5 Steril at serumu	50 mililitre
% 0,1 Dekstroz	1 gr
% 0,5 Yeart Power Maya	5 gr

1000 ml distile suya belirtilen oranda Brain heart infusion broth ilave edilir. Bu karışıma 5 gr maya katıldıktan sonra otoklava konur. Otoklavdan çıkartılan karışıma 10 mililitre distile suya 1.2 gr hesabı ile steril at serumu ve steril dekstroz ilave edilir. Böylece BHI buyyon elde edilmiş olunur.

2.1.3.2. TBS Yıkama Solüsyonu (pH: 8,4)

Tris $H_2NC(CaH_2OH)_3$	6,1 gr
NaCl	9 gr
Distile su	1000 ml

2.1.4.ELISA

2.1.4.1. Kaplama Antijeni

ELISA testinde kullanılacak pleytlerin kaplanmasında Sultansuyu TİM' de ölen bir taydan üretilmiş olan *R. equi* VapA S1 2002 suşu kullanıldı.

2.1.4.2. Antijen Kaplama Bufferı

Karbonat-bikarbonat tamponu (pH :9,6)

0,2 M $NaCO_3$	16 ml
0,2 M $NaHCO_3$	34 ml
Distile su	1000 ml

2.1.4.3. Serum ve Konjugat Diluent: PBS (Fosfat buffer solüsyonu), pH 7,2

NaCl	8,5 gr
$K2HPO_4$	1,121 gr
$KH2PO_4$	0,34 gr
Distile Su	1000ml

2.1.4.4. Yıkama solüsyonu (%0,02 PBS-T w/v) pH 7,4

Twen 20	0,2
PBS	1000 ml'ye tamamlandı

2.1.4.5. Bloklama solüsyonu

Yağsız Süt Tozu	5 gr
PBS	100 ml

2.1.4.6. Konjugat 1/5000

Yağsız Süt Tozu	5 gr
PBS	100 ml
Anti –horse IgG HRPO	20µl

2.1.4.7. Substrat Solüsyonu

Fosfat-sitrat buffer (Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, Sigma P4922, USA)'da taze olarak hazırlanan δ-Fenildiamin dihidroklorid (δ-phenylenediamine dihydrochloride tablet Sigma P8287, USA) tablet kullanıldı.

2.1.4.8. Enzim Stop Solüsyonu

H2SO4	26,5 ml
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı

2.1.4.9. ELISA Okuyucusu

MWGt Lambda Scan 200 Bio- Tek inst. Ins. USA

2.2.YÖNTEM

2.2.1. Vap A Antijenin Yapılışı

Sultansuyu TİM' de ölen bir taydan üretilmiş olan *R. equi* VapA S1 2002 suşu kanlı agara ekildi. 3 gün mikroaerofilik etüvde tutuldu. Kontaminasyon olmadığı tespit edildikten sonra steril falkoma *R. equi* toplandı. % 5 steril at serumu, %0,1 Dekstroz ve %0,5 maya içeren BHI buyyonda hazırlandı. Steril falkomda bulunana R. equi BHI buyyona eklendi, 37^0C de 5 gün çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Etüvde inkübasyona bırakılan bakteriler santrifüj ile toplanmıştır. TBS ile 5000 devirde 15 dakkika 3 kez yıkandıktan sonra %2 TRİON X-114'li TBS ile 50 mg/ml olacak şekilde tekrar sulandırılmıştır. 4^0C de 1 gece bekletildikten sonra erimeyen materyal olursa tekrar 4^0C'de 5000 devirde 15 dk santrifüj edilerek erimeyen materyallerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Ardından üstteki sıvı kısım alınıp 37^0C 'de 10 dk ılıtılmış ardından tekrar bu sefer 25^0C 5000 devirde 15 dk boyunca santrifüj edilerek VapA dan zengin olan kısmın dipte toplanması sağlanmıştır. Dipteki kısım %2 Triton X-114'li TBS ile 3 kez yıkanıp, -20^0C da 10 kısım aseton

ile bir gece prepititasyona bırakılmıştır. Pelet bu sefer 9000 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra TBS ile dilüe edilemiştir (Lopez ve ark. 2002, Tan ve ark. 1995). Bu işlemler bitikten **k**aplama antijenlerinin protein oranları Lowry ve ark (1951)' nın önerdiği metoda dayanan BIO-RAD *DC* Protein Assay (Cat No. 500-0116, Bio-Rad Lab. USA) ile ölçülmüştür. (Lopez ve ark. 2003).

2.2.2. Antijen Miktarı ve Serum Titresinin Belirlenmesi

Süpernatantın protein konsantrasyonu ölçüldü, karbonat-bikarbonat tampon çözeltisi (pH 9,6) içerisinde; 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µg/ml antijen içeren solüsyonlar hazırlandı. Herbir serum için 2 çukur (antijen kaplı ve boş) kullanıldı. Düz tabanlı mikropleytin yatay çukurlarına her bir antijen sulandırmasından 8'zer adet çukura 100 µl aktarıldı. Onikinci dikey sütuna % 0,02 PBS eklenerek, kör olarak boş bırakıldı. Antijen eklenen pleytler, 37°C'de 1 saat ardından +4 °C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün, % 0,02 PBS-T ile üç kez yıkandı. Özgül olmayan bağlanmaları engellemek ve antijenin yapışamadığı polystyren yüzeylerin bloklanması için 200 µl süt tozu PBS (%5) eklenerek, 24°C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından, pleytlere 3 kez %0,02 PBS-T ile yıkama işlemi yapıldı.

R. equi pozitif at serumunun PBS içerisinde 1/50, 1/100, 1/200, 1/400…1/12800 sulandırmaları yapılarak, antijenle kaplanan mikropleytin çukurlarına 100 µl eklendi**.** Pleytler 37°C'de 30 dakkika inkübe edildi. PBS-T ile üç kez yıkandıktan sonra, çukurlara; 1/5.000 sabit sulandırma oranında Goat anti-horse IgG HRP konjugat (KPL, Catalog No 14-21-06, Gaithersburg, MD, USA), ilave edilerek 24°C'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlanarak, 100 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma, T0440) substrat eklendi. Pleytler oda ısısında 24°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için 50 µl, (0,5 M), H_2SO_4 eklenerek vakit geçirmeksizin ELISA okuyucuda 450 nm'de okundu.

Pleytlerin kaplanmasında en uygun antijen konsantrasyonu 1 µg/çukur, serum sulandırması 1/400 olarak belirlendi.

2.2.3. Konjugat Titresinin Belirlenmesi

Bir µg Vap A antijeni ile kaplanan mikropleytlerin A, C, E, G sütunlarının çukurlarına 100 µl, 1/100 oranında sulandırılan pozitif serum, B, D, F, H sütunlarının çukurlarına negatif serum konuldu. Pleytler 37°C'de 30 inkübe edilerek, 4 kez PBS-T ile yıkandı. Goat anti-horse Ig G HRP konjugat, PBS içerisinde 1/4.000, 1/5.000, 1/6.000, 1/8.000, 1/10.000 oranında sulandırmaları yapılarak antijen ile kaplanan mikropleytin çukurlarına 100'er µl aktarıldı. Pleytler 24°C'de (oda ısısında) 1 saat inkübe edildi. 3 kez PBS-T ile yıkanarak, 100 µl substrat eklendi. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon 50 µl (0,5 M) H_2SO_4 ile durdurularak 450 nm'de okundu. En uygun konjugat sulandırılmasının 1/ 5.000 olduğu tespit edildi.

2.2.4. Pozitif ve Negatif Kontrol Serum Örnekleri

Negatif kontrol serumu olarak tay serumu ve pozitif kontrol serumu olarakta aşılanmış ve yüksek titre veren at serumu kullanıldı.

2.2.5. ELISA Yapılışı

Kaplama antijenlerinin protein oranları Lowry ve ark (1951)' nın önerdiği metoda dayanan BIO-RAD *DC* Protein Assay (Cat No. 500-0116, Bio-Rad Lab. USA) ile ölçülmüştür.

96 gözlü düztabanlı pleytler carbonte- bicarbonate buffer ile 1 µg/ml oranında dilue edilerek hazırlanan VapA antijenleri ile kaplandı, 37°C'de 1 saat ardından da 4^0C'de bir gece bekletilerek inkübe edildi (böylece her çukur 100 µl antijenle kaplanmış oldu). Ertesi gün kaplanan pleytler %0.02 Tween 20 içeren PBS ile 4 defa yıkandı. Antijenin yapışamadığı polystyren yüzeylerin bloklanması için süt tozu PBS (%5) 200 µl pleyt çukurlarına eklenerek, 24°C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından %0.02 PBS-T ile 4 kez yıkama işlemi yapıldı. Test serumları önceden 1/100 oranında & %1 bovine serum albümin veya %10 fötal calf serum içeren PBS (pH:7,2) ile dilüe edilerek 56^0C de 30 dk. inaktive edildi. Serum sulandırılmasında pleytin iki sütununa ilk çukurlara 200µl serum diğerlerine 100 µl PBS (%1 BSA veya %10 FCS içeren)

içericek biçimde konuldu. Sekizinci çukura kadar serumlar sırasıyla 1/50, 1/100, 1/200 ve 1/400 gibi iki kat sulandırılarak en son 1/12800 oranında dilusyonu yapıldı. Sulandırılmış serumlardan her mikropleyt gözlerine 100 µl ilave edildi, 37^0C de 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 4 defa %0,02 PBS-T ile yıkama işlemi yapıldı. Önceden dilüe edilen konjugat (peroxidase-labeled goat anti- horse IgG, KLP, USA) tüm çukurlara 100 µl kadar ilave edilerek 24^0C de (oda ısısı) 60 dk inkübasyona bırakıldı. Süre dolduktan sonra pleytler 4 defa %0,02 PBS-T ile yıkandı. O-phenylene-diamine dihidrochloride (OPD) (Sigma P-4809) phosfate-citrate buffer (pH 5) içinde %0,5 H_2O_2 ilave edilerek hazırlanan substrat solüsyonundan her bir çukura 100µl ilave edildi. Pleytler 24^0C de 30 dk alimiyum folya sarılarak inkübe edildi. Süre dolduktan sonra reaksiyonu durdurmak için çukurlara 100 µl 3 H_2SO_4 ilave edildi ve süre dolduktan sonra vakit geçirmeksizin serumlar ELISA kuyucusunda 450 nm'de okundu. Pozitif kontrol için titresi önceden belirlenen yüksek OD degeri bulunan serumlar kullanıldı. Değerlendirmede antijen konulan çukurlardaki serumların OD değeri ile antijen konulmayan çukurlardaki serumların OD değerleri çıkartılarak yapıldı. OD değeri 0,3 üzeri olanlar pozitif kabul edildi.

2.2.6. Sonuçların Değerlendirimesi

ELISA testinde kullanılacak eşik değerin doğru bir sekilde hesaplanması için 10 adet aşısız ve hastalık geçirmemiş kısrak taylarından alınan serum örnekleri negatif serum (NK) olarak kullanıldı. Pozitif serum (PK) olarak, aşılanmış atın serumu kullanıldı.

Negatif kontrol serumlarının OD değerlerinin aritmetik ortalamaları validasyon metodu ile belirlenen cut-off değerinden düşük olmalıdır.

Pozitif kontrol serumlarının OD değerlerinin aritmetik ortalamaları 1.0 absorbans değeri büyük olmalıdır.

Pozitif kontrol serumlarının absorbans değerleri arasındaki fark 0.15 ünit absorbans değerine eşit veya küçük, negatif kontrol serumları arasındaki absorbans değeri arasındaki fark ise 0.05 ünit absorbans değerine eşit veya küçük olmalıdır.

$$\text{ELISA-index örnek (\%)} \quad \frac{\text{OD örnek - OD blank x100}}{\textit{OD pozitif kontrol – OD blank}}$$

Negatif / şüpheli eşik değeri 20 adet negatif kontrolün aritmetik ortalamasına +3 kat standart hata değeri (NK ort + 3 SH) eklenerek elde edilen Optik Dansite (OD) eşik değeri olarak hesaplandı.

Eşik değeri (Cut-off) (şüpheli/pozitif eşik değeri) negatif kontrollerin aritmetik ortalama değerine + 6 kat standart hata (NK ort + 6 SH) eklenerek hesaplandı.

ELISA'da Kullanılan Cut-Off Değerleri

OD Blank : 0,041±0,00037

R. equi Negatif/şüpheli Eşik Değeri : 0,169±0,033

Negatif / şüpheli eşik değeri : 0,278

Cut-Off değeri: 0,367

Antijen konulan çukurlardaki serumların OD değeri antijen konulmayan çukurdaki serumun OD değerinden çıkarıldı. OD değeri 0.3 ve üzeri pozitif kabul edildi. Bir serumun en son dilüsyonundaki 0.3 ve üzerinde bulunan OD değeri o serumun pozitif titresi olarak kabul edildi. Eşik değer olarak OD 0.3, negatif kontrol serumların OD değeri ortalamasına 3 SD ilave edilerek belirlendi.

2.2.6.1. OD ve Titre hesaplama

ELISA iel alınan OD değerlerinin titre olarak karşılığının yazılması için aşağıdaki formül uygulandı. Formüle OD değeri girildiğinde gerçek titre değeri olarak karşılığı verilmektedir (Tablo 2.1, 2.2 ve Grafik 2.1).

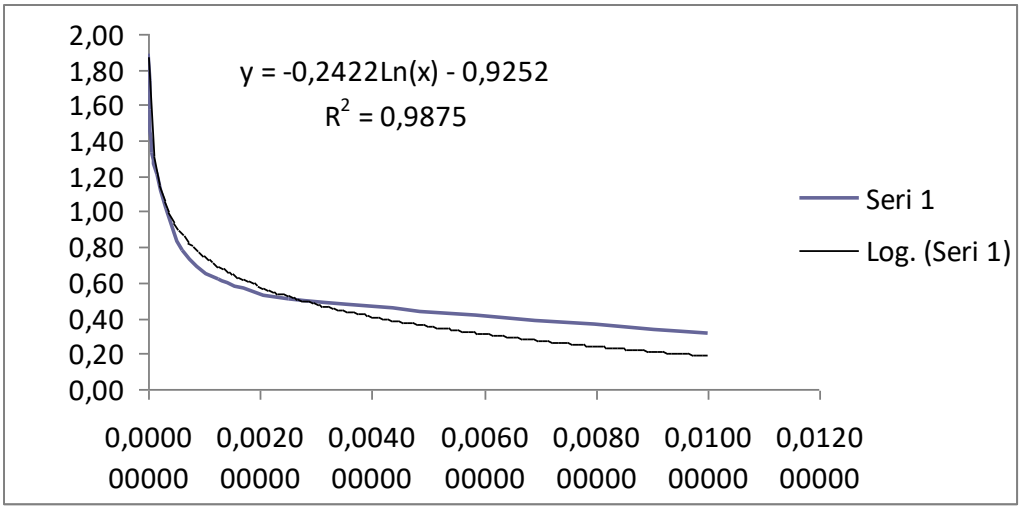
Tablo 2.1. Titre ile OD hesaplama ve/veya OD ile Titre Hesaplama Tablosu

Titre Gir	OD bul	OD Gir	Formül	Titre bul		Titre
0,000881057	0,777121879	0,389	-5,43058	0,004380560860729	/	228
		0,318	-5,13719	0,005874172484090	/	170

Tablo 2.2. OD ile Titre Hesaplama Tablosu

OD Gir	Formül	Titre bul	Titre	
1,644	-10,62	0,000024507559779	1/	40804
1,234	-8,922	0,000133379241226	1/	7497
0,924	-7,641	0,000480193066023	1/	2082
0,56	-6,137	0,002160987290792	1/	463
1,82	-11,34	0,000011842667564	1/	84440

Grafik 2.1. OD ile Titre Hesaplama Grafiği



3. BULGULAR

3.1. *R. equi* ile Aşılanan Kısrakların Antikor Titreleri

Gebeliklerinin 7. 8. ve 9. ayında Bakterin+Vap A+IMS 3012 aşısı ile aşılanan kısraklardan aşı uygulaması sonrası alınan serum örneklerinde ve doğum sonrası alınan serum ve kolostrum örneklerinde ELISA ile şekillenen antikor titreleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Aşılama ve örnekleme zamanı değerlendirildiğinde; birinci aşılamaya göre ikinci aşılama sonrası örneklerde OD değerlerinin ve antikor titrelerinin yükseldiği tespit edilmiştir.

Doğum sonrası alınan serum örneklerinin OD değeri ve antikor titrelerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, doğum sonrası kolostrum örneklerin OD değerleri ve Antikor titreleri serum örneklerine göre daha yüksek olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.1. *R. equi* aşısı ile aşılanan kısrakların ELISA ile *anti-R.equi* antikor titreleri

Kısrak No	Örnekleme						Doğum sonrası			
	1.		2.		3.		Serum		Kolostrum	
	OD	Titre	OD	Titre	OD	Titre	OD	Titre	OD	Titre
17-01	0,442	1/100	1,212	1/6400			0,967	1/3200	0,858	1/1600
18-03	0,982	1/3200			1,074	1/3200				
70-01	0,743	1/1600	0,814	1/1600			1,127	1/6400	1,951	1/102400
69-97	0,582	1/800					1,691	1/25600	1,954	1/102400
44-04	1,061	1/3200					1,187	1/102400	1,350	1/12800
24-05	0,095	0	0,331	1/100			0,216	0	0,592	1/400
10-95	0,654	1/800	1,531	1/25600			1,207	1/6400	1,063	1/3200
55-01	0,684	1/800	1,384	1/12800			0,976	1/3200	1,168	1/6400
64-95	0,468	1/400	1,347	1/12800			0,982	1/3200	1,197	1/6400
36-03	0,503	1/400	1,367	1/12800			1,498	1/51200	2,012	1/102400
4-97	0,722	1/1600	0,910	1/3200			0,637	1/800	0,734	1/1600
22-02			1,033	1/3200	1,011	1/3200				
15-05			0,358	1/100	0,636	1/800				
11-98			0,950	1/3200	0,914	1/3200				
51-93			1,187	1/3200	1,115	1/6400				
71-97			1,230	1/6400	1,181	1/6400				
3-95			0,789	1/1600	0,869	1/3200				
64-02			1,209	1/6400	1,260	1/6400				
23-97			0,910	1/3200	1,577	1/25600				
88-03			1,292	1/6400			1,157	1/6400	1,223	
43-97			1,059	1/3200			1,798	1/51200	1,633	
13-06			0,854	1/3200						
68-07			0,318	1/100			0,734	1/1600	0,901	1/3200
23-98			1,228	1/6400	1,337	1/12800				
42-04			0,771	1/1600	1,024	1/3200				
5-00			0,760	1/1600	1,453	1/12800				
41-04			0,958	1/3200	1,602	1/25600				
69-01			0,929	1/3200	1,671	1/51200				
3-99			1,528	1/25600	1,243	1/6400				
63 Irak	1,059	1/3200								
38-03	0,907	1/3200			0,954	1/3200	1,926	1/102400	1,926	1/102400
70-91					0,931	1/3200	1,681	1/51200	1,634	1/51200
46-04					0,960	1/3200				
42-04					1,024	1/3200				
64-03							1,184	1/6400	1,815	1/102400
11-01							0,358	1/400	0,750	1/1600

Gebelik döneminde Bakterin+Vap A IMS 3012 aşısı ile aşılanan kısraklardan hazırlanan hiperimmün serumun 5. ve 25. gün uygulanması sonrasında tayların kan serumlarındaki antikor titreleri Tablo 3.2 de verilmiştir. Taylarda da, kısraklara benzer şekilde; 5 ve 25. günlerde HI uygulama öncesine göre uygulama sonrasında serum örneklerinin OD değeri veya Antikor titrelerinde artış olduğu gözlenmiştir.

Tablo 3.2. *R. equi* hiperimmün serumu verilen tayların antikor titreleri

Kısrak	5. gün HI uygulaması				25. gün HI uygulaması			
	Öncesi		Sonrası		Öncesi		Sonrası	
	OD	Titre	OD	Titre	OD	Titre	OD	Titre
22-02					0,918	1/3200	1,079	1/3200
15-05					0,397	0	0,694	1/1600
11-98	0,856	1/1600	1,127	1/6400	1,112	1/3200	1,280	1/6400
51-93	0,445	1/800	0,963	1/3200	0,922	1/3200	0,894	1/1600
71-97	0,881	1/1600	1,294	1/6400	1,197	1/6400	0,945	1/3200
3-95					0,531	1/400	0,749	1/1600
64-02	1,007	1/3200	1,086	1/3200	1,364	1/12800	1,478	1/25600
23-97					0,515	1/400	0,725	1/1600
70-91	0,950	1/3200	1,223	1/6400	1,254	1/6400	1,356	1/12800
46-04	1,108	1/6400	1,389	1/12800	1,427	1/25600	1,031	1/3200
28-06	0,948	1/3200	0,995	1/3200	1,421	1/25600	1,092	1/3200
64-03	0,759	1/1600	0,759	1/1600	1,120	1/3200	1,252	1/6400

Aşısız 10 adet kısrak serum örneklerinin OD değeri ve antikor titreleri oldukça düşük olarak tespit edildi. On örnekten sadece bir tanesinde antikor titresi 1/100 olarak belirlendi, diğerlerinde antikor titresi tespit edilemedi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Aşısız kısrakların *R. equi* antikor titreleri

Kısrak	Örnekleme							
	1		2		3		4	
	OD	Titre	OD	Titre	OD	Titre	OD	Titre
1	0,095	0	0,102	0	0,091	0	0,239	0
2	0,229	0	0,134	0	0,205	0	0,193	0
3	0,287	0	0,187	0	0,167	0	0,200	0
4	0,200	0	0,213	0	0,128	0	0,154	0
5	0,193	0	0,154	0	0,119	0	0,095	0
6	0,224	0	0,087	0	0,113	0	0,188	0
7	0,265	1/100	0,211	0	0,232	0	0,139	0
8	0,188	0	0,254	0	0,094	0	0,205	0
9	0,239	0	0,139	0	0,099	0	0,091	0
10	0,247	0	0,189	0	0,208	0	0,193	0

4. TARTIŞMA

R. equi, tüm dünyada yaygın olarak görülen özellikle 1-6 aylık tayları etkileyen fakültatif hücre içi bakteridir. Primer konakçısı olan taylarda granülomatöz pnömoni oluşturmaktadır. Bunun sonucu taylarda yüksek oranda performans düşüklüğü gerçekleşmektedir. Bu durum özellikle yarış atı olarak yetiştirilen taylarda büyük problemlere neden olmaktadır. Ülkemizde de arap atı yetiştiriciliğinin yapıldığı haralarda ve at yetiştirme çifliklerinde değişik derecelerde mortalite ve mobidite neden olan Rhodococcus pnömonisi görülmekte ve bu durum büyük ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, hastalığın erken teşhisi hastalıkla mücadele açısından önemlidir.

R. equi enfeksiyonlarının teşhisinde, hasta hayvanlardan alınan bronko-alveolar lavaj (BAL) örneklerinden etken izolasyonu ve identifikasyonu altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, şüpheli hayvanlardan tam kan sayımı, akciğer radyografisi gibi klinik muayene yöntemleri teşhisi desteklemek için yararlanılan metotlardır. Klinik bulgulara dayanan teşhis metodlarının *R. equi* pnömonisine spesifik olmaması, hastalığın teşhisinde yeni metodların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Atlarda ve taylarda diğer solunum problemi ile seyreden hastalıklardan *R. equi* pnömönilerini ayırmak için çeşitli teşhis metodları (tam kan sayımı, fibrinojen seviyesi, radyografi ve seroloji) kullanılmaktadır. Serolojik olarak *R. equi* enfeksiyonunu belirlemek için Agar Jel immünodiffuzon testi (AGID), sinerjik hemoliz inhibisyon testi ve ELISA testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, AGID'e göre ELISA testinin sensitivitesinin daha iyi olduğu belirtilmiştir.

Çeşitli araştırıcılar (Attili ve ark 2006, Becu ve ark 1997, Cauhard ve ark 2004, Giquere ve ark 2003, Martens ve ark 2002, Phumoonna ve ark 2006, Tel ve ark 2011) aşılanmış kısrak ve taylarda antikor titrelerinin belirlenmesi için ve doğal enfekte hayvanlarda serolojik teşhis için kendi geliştirdikleri ELISA kiti ile çalışmışlardır. Araştırmacılar, deneysel çalışmalarda *R. equi* aşısı olarak farklı antijenler (Vap A, inaktif hücre, canlı *R. equi*, vb) kullanmış olsalarda serolojik takip için çoğunlukla ELISA kitinde antijen olarak Vap A proteinini kullanmışlardır.

Cauhard ve ark (2004), gebe kısrakları hem Vap A hemde lipoprotein içeren yüzey partikülleri içeren aşı ile veya inaktif *R. equi* bakterin aşı ile aşılamışlardır. Daha sonra, aşılı kısrakların tayları 6 ay boyunca *R. equi* enfeksiyonu yönünden takip edildiğini bildirmişlerdir. Serolojik takip için Vap A proteini ile kaplı bir ELISA kiti geliştirdiklerini belirtmişlerdir.

Giquere ve ark (2003), taylarda *R. equi* pnömönilerinin teşhisi için 4 ELISA ve 1 agar-jel immunodiffüzyon testinin performanslarını değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, hastalıklı ve klinik sağlıklı taylar arasında serolojik testlerde farklılığın olmadığını bildirmişlerdir.

Phumoonna ve ark (2006), *R. equi* Vap A'sından derive edilen peptid bazlı bir antijeni kullanarak hazırladıkları ELISA kiti ile doğal enfekte 3 haftalık 6 aylık taylara ait 227 serumu test ettiklerini bildirmişlerdir. Hasta hayvanlarda *R. equi* pnömönisinin belirlenmesinde ELISA kitinin sensitivitesini %47,62 ve spesifitesini %69,67 olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca, Ig antikora göre Vap A proteinin N-terminal B-hücre epitopuna karşı şekillenen Vap A spesifik Ig Gb'nin belirlenmesi ile ELISA kitinin sensitivitesi %70,47 ve spesifitesi %72,13 olarak yükseldiğini ifade etmişlerdir. Sonuç olarak, *R. equi*'nin 6 haftalık taylarda teşhisi için normal Vap A'ya şekillenen IgG'nin belirlenmesine göre Vap A peptid bazlı antijene karşı şekillenen Ig Gb antikorlarının belirlenmesinin daha iyi olacağını belirtmişlerdir.

Witkowski ve ark (2012), antijen olarak bakteriyal lizatı kullanarak bir ELISA kiti hazırlamışlardır. *R. equi* ari işletmedeki 175 attan alınan kan serumunda başlıca Vap A'ya karşı Ig G antikorlarını belirlediklerini ve Western Blot ile doğruladıklarını belirtmişlerdir. ELISA testinin kolay ve antikor ölçümü için serumu inaktive etmeye gerek olmadığını ifade etmişlerdir. Aşılama sonrası hem serum hemde kolostrumda *R. equi* spesifik antikorların belirgin şekilde arttığını rapor etmişlerdir. *R. equi*'nin serolojik teşhisi için birçok ELISA kiti geliştirilmesine rağmen sıklıkla antijen olarak Vap A kullanılmıştır. Sonuç olarak, ELISA testi atların serum ve kolostrumunda *R. equi*'ye karşı şekillenen spesifik antikorların düzeyini belirlemek için kullanılabileceğini, ancak *R. equi* klinik teşhisi için uygun bir test olmadığını bildirmişlerdir.

Becu ve ark (1997), gebeliğin son 2 ayında *R. equi* Vap A ve ekzoenzimler içeren bir aşı ile kısrakları aşıladıklarını ve aşılı hayvanların taylarında *R. equi* pnömönilerinin azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, aynı aşı ile tayları 3 yıl boyunca aşıladıklarını, son aşılamadan 25 gün sonra 600-1200 ml hiperimmün plazma aldıklarını ve yeni doğan taylara doğumdan sonra 4. günde hiperimmün serum verdiklerini belirtmişlerdir. Hiperimmün serum uygulanan taylarda *R. equi* pnömöniden ölen tayların ölüm oranının %5,8'den %0,2'ye düştüğünü ifade etmişlerdir. Bununla birlikte, aşılanan ve hiperimmün serum uygulanan taylarda agar jelimmünodiffuzyon ve komplement fikzasyon testleri ile belirleyebildiklerini rapor etmişlerdir.

Martens ve ark (2002), taylarda *R. equi* pnömönilerinin teşhisi için 3 farklı ELISA, 1 agar-jel immunodiffuzyon ve 1 sinerjitik hemoliz inhibisyon testlerini karşılaştırdıklarını, doğal enfekte olan ve olmayan taylarda benzer sonuçlar aldıklarını belirtmişlerdir. Sonuç olarak, *R. equi* pnömönilerinin tam teşhisini, doğrulama için 5 testinde kullanılmasının uygun olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca, yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçların yüksek çıkması ihtimalinden dolayı, *R. equi* spesifik antikorların serolojik tespiti *R. equi* ile enfekte olan taylarda tanımlanması için uygun bir tarama metodu olmadığını ifade etmişlerdir.

Tel ve ark (2011), *R. equi* (referans suş, tam hücre)'den hazırladıkları ELISA ile tay, at ve katırlarda *R. equi* enfeksiyonunu serolojik olarak belirlemişlerdir. Atlarda %11,7 ve katırlarda %11,5 oranlarda seropozitlik bulduklarını belirtmişlerdir.

Attili ve ark (2006), Türkiye'nin 3 bölgesinde (Bursa, İzmir ve İstanbul) R. equi enfeksiyonunu belirlemek için sağlıklı tay ve atlardan alınan 696 serumun indirek ELISA ile 103'ü (%14,80) seropozitif olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada, proje kapsamında geliştirilen Bakteri+Vap A+Montanid IMS 3012 aşısı ile aşılanan kısrakların ve HI plazma verilen tayların serum örnekleri kullanılmıştır. Geliştirilen ELISA kitinde ise Vap A proteini ile mikropleytler kaplanmış ve Vap A'ya karşı gelişen antikorlar belirlenmiştir. Sonuçta, geliştirilen

ELISA kiti ile doğal *R. equi* enfeksiyonlu hayvanlarda serolojik teşhisi yapılamamamıştır. Cuahard ve ark (2004), Vap A ve lipoprotein içeren aşı ise aşılanan kısrakların taylarında serolojik takibini Vap A antijeni kullanılan ELISA ile gerçekleştirdiklerini ifade etmişlerdir. Bu çalışma ile Cauhard ve ark (2004) çalışmasının uygunluk gösterdiği gözlenmiştir. Phuoonna ve ark (2006), normal Vap A proteini kullanılan ELISA kitine göre Vap A peptid bazlı antijenleri ile hazırlanan ELISA kitinin daha iyi sonuç verdiğini ifade etmiştir. Witkowski ve ark (2012), bakteriyal lizat ile hazırlanan ELISA kitinin deneysel çalışmalarda iyi sonuç verdiğini ancak doğal *R. equi* enfeksiyonunu serolojik olarak teşhisi için uygun olmadığını belirtmiştir. Martens ve ark (2002), doğal *R. equi* enfeksiyonunun serolojik teşhisinde serolojik testlerin (ELISA ve AGP) uygun olmadığını belirtmiştir. Bununla birlikte, Attili ve ark (2006) ve Tel ve ark (2011) antijen olarak tam *R. equi* hücresi kullanılan ELISA ile doğal *R. equi* enfeksiyonlarını değişik oranlarda seropozitif olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hem geliştirilen aşıda hem de ELISA kitinde kullanılacak VapA'nın elde edileceği *R. equi* suşunun doğru yada uygun seçilmesi gerektiği

ELISA kitinin sensitivite ve spesifitesini etkileyen en önemli faktörün Vap A'nın pürifiye edilmesinin olduğunu

R. equi'nin serolojik teşhisi için geliştirilecek ELISA gibi serolojik testlerde antijen olarak Vap A'nın kullanılması uygundur.

R. equi Vap A aşısı ile aşılanan hayvanlarda serolojik takip için antijen olarak Vap A kullanılarak geliştirilen ELISA kiti ile elde edilen sonuçlar yeterlidir

Vap A kullanılan ELISA kitlerinin doğal *R. equi* enfeksiyonlarının serolojik teşhisinde spesifitesi düşük olmasını nedeniyle deneysel çalışmalarda daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu nedenle, doğal *R. equi* enfeksiyonlarının serolojik teşhisi için kullanılabilmesi için ELISA kitinin spesifitesini yükseltecek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Amati L, Pepe M, Passeri ME, Mastronardi ML, Jirillo E, Covelli V, 2006. Toll-like receptor signalling mechanisms involved in dendritic cell activation: potential therapeutic control of T cell polarization. Curr Pharm Des, 12, 4247–4254.

2. Al-Salihi K, 2011. Potency of *Rhodococcus equi* culture fitrate supernatant protein antigen for skin test in the diagnosis of *Rhodococcus equi* in foals. Eurasıan J Vet Sci,, 27, 3, 161-165.

3. Attili AR, Kennerman E, Takai S, Or ME, Marenzoni ML, Torun S, Pieramati C, Kayar A, Golcu E, Parkan C, Yilmaz Z, Gonul R, Valente C, Cuteri V, 2006.Seroepidemiological survey of Rhodoccocus equi infection in asymptomatic horses from Bursa, Izmir and Istanbul provinces, Turkey. Comp Immun Microbiol Infect Dis, 29, 323–333.

4. Barton MD, Hughes KL, 1980. *Corynebacterium equi*: A review.Vet Bull, 50, 65-80.

5. Barton MD, Hughes KL, 1984. Ecology of *Rhodococcus equi*. Vet Microbiol, 9, 65–76.

6. Becu T, Polledo G, Gaskin JM, 1997. Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. Vet Microbiol, 56, 193–204.

7. Benoit S, Benachour A, Taouji S, Auffray Y, Hartke AH, 2002. Which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. Infect Immun, 70, 3768–3776.

8. Beutler B, 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. Nature, 430, 257–263.

9. Bowles PM, Woolcock JB, Mutimer MD, 1987. Experimental infection of mice with *Rhodococcus equi*: Differences in virulence between strains. Vet Microbiol, 14, 3, 259-68.

10. Buckley T, McManamon E, Stanbridge S, 2007. Resistance studies of erythromycin and rifampin for *Rhodococcus equi* over a 10-year period. Irish Vet J, 60, 12, 728-731.

11. Byrne BA, Prescott JF, Palmer GH, Hines SA, 1998. Characterization of a virulence-associated gene family in *Rhodococcus equi*. Conference handbook of the 8th International Conference on Equine Infectious Diseases, P 236, 1998, Dubai, United Arab Emirates.

12. Byrne BA, Prescott JF, Palmer GH, Takai S, Nicholson VM, Alperin DC, Hines SA, 2001. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. Infect Immun, 69, 650–656.

13. Cantor GH, Byrne BA, Hines SA, Richards HM, 1998. VapA-negative *Rhodococcus equi* in a dog with necrotizing pyogranulomatous hepatitis, osteomyelitis, and myositis. J Vet Diagn Invest, 10, 297–300.

14. Cauchard J, Sevin C, Ballet JJ, Taouji S, 2004. Foal IgG opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. Vet Microbiol, 1004, 73-81.

15. Cauchard S, Bermudez-Humaran LG, Blugeon S, Laugier C, Langella P, Cauchard J, 2011. Mucosal co-immunization of mice with recombinant lactococci secreting VapA antigen and leptin elicits a protective immune respose against *Rhodococcus equi* infection. Vaccine, 30, 95-102.

16. Chaffin MK, Martens RJ, 1997. Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: Retrospective Study of 61 Cases (1988–1996). Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, 43, 79-80.

17. Chaffin MK, Cohen ND, Martins RJ, 2003. Evaluation of equine breeding farm characteristics and preventative health practices as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. J Am Vet Med Assoc, 222, 467-475.

18. Collatos C, Clark ES, Reef VB, Morris DD, 1990..Septicemia, atrial fibrillation, cardiomegaly, left atrial mass, and *Rhodococcus equi* septic osteoarthritis in a foal. J Am Vet Med Assoc, 197, 8, 1039-42.

19. Cox JC, Coulter AR, 1997. Adjuvants a classification and review of their modes of action. Vaccine, 15, 248–256.

20. Çetin C, Kahraman M, 1997. Bir tayda R.equi infeksiyonu. Etlik Vet Mikrob Derg, 9, 127-130.

21. Darrah PA, Hondalus MK, Chen Q, et al., 2000. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. Infect Immun, 68, 3587–3593.

22. Davis JL, Gardner SY, Jones SL, Schwabenton BA, Papich MG, 2002. Pharmacokinetics of azithromycin in foals after i.v. and oral dose and disposition into phagocytes. J Vet Pharmacol Ther, 25, 99–104.

23. Davis WP, Steficek BA, Watson GL, Yamini B, Madarame H, Takai S, Reder JA, 1999. Brief communication and case reports disseminated *Rhodococcus equi* infection in two goats. Vet Pathol, 36, 336–339.

24. Dawson TR, Carter N, Cunningham AC, 2008. A double blind study comparing the effect of hyperimmune plasma and Standard equine plasma on reducing the incidence of *Rhodococcus equi* infection and requirement for treatment on an endemic stud farm. In: Proceedings of the 4th Havemeyer Workshop on Rhodococcus equi, p. 71, Edinburgh, Scotland.

25. Dawson TR, Horohov DW, Meljer WG, Muscatello G, 2010..Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. Vet Immunol Immunopathol, 15, 135, 1-11.

26. Dennis SM, Bamford VW, 1966. The role of corynebacteria in perinatal lamb mortality. Vet Record, 79, 105-108.

27. Erganiş O, İstanbulluoğlu E, 1993. İmmünoloji, Mimoza Basım Yayım A.Ş. Yayın No:11, Kuzucular Ofset, Konya.

28. Falcon J, Smith BP, O'Brien TR, Carlson GP, Biberstein E, 1985. Clinical and radiographic findings in *Corynebacterium equi* pneumonia of foals. J Am Vet Med Assoc, 186, 6, 593-599.

29. Fernandez AS, Prescott JF, Nicholson VM, 1997. Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA)-enriched antigens. Vet Microbiol, 56, 3–4,187–92.

30. Fitzgerald SD, Walker RD, Parlor KW, 1994. Fatal *Rhodococcus equi* infection in an Angora goat. Scott J Vet Diagn Invest , 6, 105-107.

31. Fitzgerald SD, Yamini B, 1995. Rhodococcal abortion and pneumonia in an equine fetus, J Vet Diagn Invest, 7, 157-158.

32. Fontanals AM, Becu T, Polledo G, Gaskin CKM, Baun M, 1997. Antigenic analysis of *Rhodococcus equi* preparations using different horse sera. Vet Microbiol, 56, 247-255.

33. Garton NJ, Gilleron M, Brando T, Dan HH, Giguere S, Puzo G, Prescott JF, Sutcliffe IC, 2002. A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production. J Biol Chem, 277, 31722–31733.

34. Gaskin JM, King RR, Lane TJ, Mayhew IJ, Brewer BD, 1990. Serological detection of *Rhodococcus equi* infections in foals. Proc Am Col Vet lnt Med Forum, 8, 581-584.

35. Giguere S, Prescott JF, 1997. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. Vet Microbiol, 5, 6, 313-334.

36. Giguere S, Prescott JF, 1998. Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*. Infect Immun, 66, 5, 1848-1854.

37. Giguere S, Wilkie BN, Prescott JF, 1999a. Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. Infect Immun, 67, 5041–5047.

38. Giguere S, Hondalus MK, Yager JA, et al, 1999b. Role of the 85- kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. Infect Immun, 67, 3548–3557.

39. Giguere S, Prescott JF. *Rhodococcus equi* pneumonia: A deadly cough. Erişim Tarihi: 18.12.2002, Erişim adresi :[http://www.netpets.com/horses/healthspa/rhodo.html].

40. Giguere S, Gaskin JM, Miller C, Bowman JL, 2002. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. J Am Vet Med Assoc, 220, 59–63.

41. Giguere S, Hernandez J, Gaskin J, Prescott JF, Takai S, Miller C, 2003. Performance of five serological assays for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, Clin Diagn Lab İmmun, 10, 2, 241–245.

42. Giguere S, 2010a. Clinical manifestations, pathogenesis, and diagnosis of infections caused by *Rhodococcus equi* in foals. Am Assoc Equine Pract, 56, 121-124.

43. Giguere S, 2010b.Therapy of *Rhodococcus equi* infections in foals, AAEP Proceedings, 56, 125-128.

44. Goodfellow M, Alderson G, 1977. The actinomycete genus *Rhodococcus*: A home for the ‘rhodochrous’ complex. J Gen Microbiol, 100, 99-122.

45. Goodfelloow M, 1987. The taxonomic status of *Rhodococcus equi*. Vet Microbiol, 14, 205-209.

46. Gotoh K, Mitsuyama M, Imaizumi S, et al, 1991. Mycolic acidcontaining glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi* for mice. Microbiol Immunol, 35, 175–185.

47. Guerrero MF, Ramos JM, Renedo G, Gadea I, Alix A, 1999. Pulmonary malacoplakia associated with *Rhodococcus equi* in patients with AIDS: Case report and review. Clin Infect Dis, 28, 1334.

48. Haghighi HR, Prescott JF, 2005. Assesment in mice of vapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. Vet Immunol Immunopathol 104, 3-4, 215-225.

49. Heidmann P, Madigan JE, Watson JL, 2006. *Rhodococcus equi* pneumonia: Clinical findings, diagnosis, treatment and prevention. Clin Tech Equine Pract, 5, 203–210.

50. Higuchi T, Arakawa T, Hashikura S, Inui T, Takai S, 1999. Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. J Vet Med B: Infect Dis Vet Public Health, 46, 641–648.

51. Hines SA, Kanaly ST, Byrne BA, Palmer GH, 1997. Immunity to *Rhodococcus equi*. Vet Microbiol, 6, 177-185.

52. Hines MT, Paasch KM, Palmer GH, Westhoff NC, Hines SA, 2001. Immunity to *Rhodococcus equi*: Antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. Vet Immunol Immunopathol, 79, 1– 2, 101–14.

53. Hines SA, Stone DM, Hines MT, Alperin DC, Knowles DP, Norton LK, Hamilton MJ, Davis WC, McGuire TC, 2003. Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4+ and CD8+ T lymphocytes. Clin Diagn Lab Immunol, 10, 208–215.

54. Hines MT, 2007. *Rhodococcus equi* Equeine, In; Gower J, ed, Infectious Diseases Saunder Elsevier 281-295.

55. Holznagel DL, Hussey S, Mihalyi JE, Wilson WD, Lunn DP, 2003. Onset of immunoglobulin production in foals. Equine Vet J, 35, 620– 622.

56. Hondalus MK, Mosser DM, 1994. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. Infect Immun, 62, 4167–4175.

57. Hondalus MK. Diamond MS, Rosenthal LA, Springer TA, Mosser DM, 1993.The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-l to bind to mammalian cells. Infect Immun, 61, 2919-2929.

58. Hondalus MK, 1997. Pathognesis and virulence of *Rhodococcus equi*. Vet Microbiol, 56, 257-268.

59. Hooper-McGrevy KE, Giguere S, Wilkie BN, Prescott JF, 2001. Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *R. equi*-induced pneumonia. Am J Vet Res, 62, 8, 1307–1313.

60. Hooper- McGrevy K, Prescott JF, 2001. Is fatal *Rhodococcus equi* pneumoni of foals only an infection acquired by the perinate? J Vet Intern Med, 15, 3, 169-170.

61. Hooper-McGrevy KE, Wilkie BN, Prescott JF, 2005. Virulence-associated protein-specific serum immunoglobulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent *R. equi*. Vaccine, 23, 5760–5767.

62. Hughes KL, Sulaiman I, 1987. The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. Vet Microbiol, 14, 241–250.

63. Jacks S, Giguere S, Prescott JF, 2007. In vivo expression of and cell-mediated immune responses to the plasmid-encoded virulence-associated proteins of *Rhodococcus equi* in foals. Clin Vaccine Immunol,14, 369–374.

64. Jain S, Bloom BB, Hondalus MK, 2003. Deletion of vapA encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. Mol Microbiol, 50, 115-128.

65. Johnson JA, Prescott JF, Markham RJ, 1983. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intragastric challenge. Vet Pathol, 20, 4, 450-459.

66. Kabongo PN, Njiro SM, Van Strijp MF, Putterill JF, 2005. Caprine vertebral osteomyelitis caused by *Rhodococcus equi*. J South African Vet Assoc, 76, 3, 163–164.

67. Kahraman M, 1997. Gram pozitif sporsuz bakteriler. Rhodococcus'lar ve Rhodococcus İnfeksiyonları. In: Veteriner Özel Mikrobiyoloji, Ed.: M. Arda, "4. Baskı", Medisan Yayın Serisi, Ankara, 175-178.

68. Kanat MA, 2006. Atların *Rhodococcus equi* infeksiyonunda bulaşma kaynağının ve izolatların patojenitesinin araştırılması, Prof. Dr. Ömer M. Esendal. Ankara üniversitesi Sağlık bilimleri Enstütüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

69. Karadaş E, Gülcü HB, Beytut E, Kahraman MM, 1997. İki arap tayında *Rhodococcus equi* (*Corynebacterium equi*) enfeksiyonu. FÜ Sağlık Bil Derg, 11, 321-325.

70. Langner KFA, Darpel KE, Drolet BS, Fischer A, Hampel S, Heselhaus JE, Mellor PS, Mertens PPC, Leinbold W, 2008. Comparison of cellular and humoral immunoassays for the assessment of summer eczema in horses. Vet Immunol Immunopathol, 122, 126–137.

71. Lopez AM, Hines MT, Palmer GH, Alperin DC, Hines SA, 2002. Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. Clin Diagn Lab Immunol, 9, 6, 1270–1276.

72. Lopez AM, Hines MT, Palmer GH, Knowles DP, Alperin DC, Hines SA, 2003. Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the vapA gene of *Rhodococcus equi*, Vaccine, 21, 3815–3825.

73. Madarame HS, Takai C, Matsumoto K, Minamiyama Y, Sasaki S, Tsubaki Y, Hasegawa and Nakane A, 1997. Virulent and avirulent *Rhodococcus equi* infection in T-cell deficient athymic nude mice: pathologic, bacteriologic and immunologic responses. FEMS Immunol Med Microbiol, 17, 251–262.

74. Makrai L, Takai S, Tamura M, Tsukamoto A, Sekimoto R, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Varga J, Fodor L, Solymosi N, Major A, 2002.Characterization of virülence plasmid types in Rhodococcus equi isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. Vet Microbiol, 88, 377-384.

75. Martens RJ, Martens JG, Fiske RA, 1991. Failure of passive immunisation by colostrums from immunised mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia. Equine Vet J Suppl, 12, 19–22.

76. Martens RJ, Cohen ND, Jones SL, Moore TA, Edwards JF, 2005. Protective role of neutrophils in mice experimentally infected with *Rhodococcus equi*. Infect Immun, 73, 7040–7042.

77. Martens RJ, Noah DC, Keith C, Shinji T, Charity LD, Arthur BA, Ronnie FE, 2002. Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. J Am Vet Med Assc, 221, 6, 825-833.

78. Mangan MW, Meljer WG, 2001.Random insertion mutagenesis of the intracelluler pathogen *R.equi* using transposomes. FEMS. Microbiol, 205, 243-246.

79. McGuire TC, Crawford TB, 1973. Passive immunity in the foal: Measurement of specific immunoglobulin classes and specific antibody. Am J Vet Res, 34, 1299–1303.

80. Meljer WG, Prescott JF, 2004. *Rhodococcus equi.* Vet Res 35,4, 383-396.

81. Mosmann TR, Coffman RL, 1989.Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev Immunol, 7, 145-153.

82. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY, 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J Exp Med, 158, 3, 670-689.

83. Netea MG. van der Graaf C, van der Meer JWM, Kullberg BJ, 2004. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: Bringing specificity to the innate-immune system. J Leukoc Biol, 75, 749–755.

84. Nordengrahn A, Rusvai M, Merza M, Ekstrom J, Morein H, Belak S, 1996. Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes. Vet Microbiol, 51, 55–68.

85. Nordmann P, Ronco E, Nauciel C, 1992. Role of T lymphocyte subsets in *Rhodococcus equi* infection. Infect Immun, 60, 2748–2752.

86. Özgür YS, Bağcıgil AF, Carioglu, B, Akay Ö, Ilgaz A, Takai S, 2002. Marmara Bölgesinde yarış atı yetiştirilen haralardaki taylarda *Rhodococcus equi* infeksiyonunun ELISA ile erken tanısı üzerine çalışmalar. Turk J Vet Anim Sci, 26, 1427-1434.

87. Pargass IS, Wills TB, Davis WC, Wardrop KJ, Alperin DC, Hines SA, 2009. The influence of age and Rhodococcus equi infection on CD1 expression by equine antigen presenting cells. Vet Immunol Immunopathol, 130, 197–209.

88. Phumoonna T, Baton DM, Vanniasinkam T, Heuzenroeder MW, 2008. Chimeric vapA/groEL2 DNA vaccines enhance clearance of *Rhodococcus equi* in aerosol challenged C3H/He mice. Vaccine, 26, 20, 2457-65.

89. Phumoonna T, Muscatello G, Chicken C, Gilkerson JR, Browning GF, Barton MD, Heuzenroeder MW, 2006. Clinical evaluation of a peptide-ELISA based upon N-terminal B-cell epitope of the VapA protein for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. J Vet Med B, 53, 126–132.

90. Prescott JF, Zubaidy AJ, 1979. *Corynebacterium equi* lympha-denitis in Ortario cattle. Can Vet J, 20, 6, 175.

91. Prescott JF, Lastra M, Barksdale,1982. Equi factors in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. J Clin Microbiol, 16, 988-990.

92. Presscott JF, Travers M, Yager- Jhonson JA, 1984. Epidemiological survey of *Corynebacterium equi* infections on five Ontario horse farms. Can J Comp Med, 48, 1, 10–13.

93. Prescott JF, 1999. *Rhoducoccus equi*: An animal and human pathogen. Clin Microbial Rev, 4, 1, 20-34.

94. Prescott JF, Patterson MC, Nicholson VM, Morein B, Yager JA, 1997. Assessment of the immunogenic potential of *Rhodococcus equi* virulence associated protein (VapA) in mice. Vet Microbiol, 56, 213–225.

95. Puthucheary SD, Sangkar V, Asma Hafeez A, Karunakaran R, Raja JN, Hassan HH, 2006. *Rhodococcus equi*- An emerging human patogen in immunocompromized hosts: A report of four cases from Malaysia case report. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 37, 1, 157-161.

96. Rajagopalan VR, Gopalakrishnan VR, 1938. The occurrence of *Corynebacterium equi* in a She-Buffalo. Indian J Vet Sci, 8, 225-284.

97. Ribeiro MG, Takai S, Guazzelli A, Batista Lara GH, Vieira da Silva A, Fernandes MC, Anuska Zeni Condas L, Siqueira AK, Salerno T, 2011. Virulence genes and plasmid profiles in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (Sus scrofa) in Brazil. Res Vet Sci, 91, 3, 478-481.

98. Rodriguez JL, Acosta B, Navarroj RN, Gutierrez C, 2000. *Rhodococcus equi* infection in goat apropos of two cases. J App Anim Res,18, 149-151.

99. Roberts DS, 1957. *Corynebacterium equi* infection in a sheep. Australian Vet J, 33, 1, 21-23.

100. Skalka B, Svastova A, 1985. Serodiagnostics of Corynebacterium (Rhodococcus) equi. Zoonoses Pub Health 32, 1-10, 137-142.

101. Sellon DC, Besser TE, Vivrette SL, Mcconnico RS, 2001.Comparison of nucleic acid amplification, serology, and microbiologic culture for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, J Clin Microbiol, 39, 4, 1289–1293.

102. Sheoran AS, Timoney JF, Holmes MA, Karzenski SS, Crisman MV, 2000. Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. Am J Vet Res, 61, 9, 1099-1105.

103. Sönmez K, 2007. Tayların trakeal swaplarında *Rhodococcus equi*'nin immunostokimyasal yöntemlerle saptanması ve akciğerdek histopatolojik değişikliklerin incelenmesi. Pof. Dr. Gürel A, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patolojik Anabilim Dalı Doktora Tezi, . İstanbul.

104. Steinman RM, Hemmi H, 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. Curr Top Microbiol Immunol, 311, 17–58.

105. Stein FJ, Stott G, 1979. *Corynebacterium equi* in the cottontop marmoset (Saguinus oedipus): A case report. Lab Animal Sci, 29, 4, 519-520.

106. Szeredi L, Molnar T, Glavits R, Takai S, Makrai L, DeNes B, Del Piero F, 2006. Two cases of equine abortion caused by *Rhodococcus equi*. Vet Pathol, 43, 208–211.

107. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE, 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. Ithaca and London: Comstock Publishing Association.

108. Takai S, Kawazu S, Tsubakit S, 1986a. Immunoglobulin and specific antibody responses to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* infection in foals as measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Clin Microbiol, 23, 5, 943-947.

109. Takai S, Michizoe T, Matsumura K, Nagai M, Sato H, Tsubaki S, 1985. Correlation of *in vitro* properties of *Rhodococcus (Cortynebacterium) equi* with virulence for mice. Microbiol İmmunol, 29, 1175-1184.

110. Takai S, Narita K, Ando K, Tsubaki S, 1986b. Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in soil on a horse-breeding farm. Vet Microbiol, 12, 2, 169-177.

111. Takai S, Ohkura H, Watanabe Y, Tsubaki S, 1986c. Quantitative aspects of fecal *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in foals. J Clin Microbiol, 23, 4, 794-796.

112. Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsubaki S, 1991a. Association between a large plasmid and 15- to 17- kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. Infect Immun 59, 11, 4056-4060.

113. Takai S, Ohbushi S, Koike K, Tsubaki S, Oishi H, Kamada M, 1991b. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. J Clin Microbiol, 29, 12, 2887-2889.

114. Takai S, Koike K, Ohbushi S, İzumi C, Tsubaki S, 1991c. Identification of 15- to-17-kilo dalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. J Clin Microbiol, 29, 3, 439-443.

115. Takai S, Ile M, Watanabe Y, Tsubaki S, Sekizaki T, 1992a. Virulence-associated 15-to17- kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: Temperature-dependent expression and location of the antigens. Infect Immunol, 60, 7, 2995-2997.

116. Takai S, Sasaki Y, Ikeda T,Uchida Y, Tsubaki S, Sekizaki T, 1994a. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. J Clin Microbiol,32, 457–460.

117. Takai S, Takahagi J, Sato Y, Yamaguchi K, Kakizaki S, Takehara F, Matsukura S, Tamada Y, Tani A, Sasaki Y, Tsubaki S, Kamada M, 1994b. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* in horses and their environments. In: Nakajima, H, Plowright, W. (Eds.), Equine Infectious Disease VII. R & W Publications, Newmarket.

118. Takai S, 1997. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. Vet Microbiol, 56, 3-4, 167–176.

119. Takai S, Fukunaga N, Kamisawa K, Yumiko I, Yukako S, Tusubaki S, 1996. Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. Microbiol Immunol, 40, 8, 591–594.

120. Takai S, Higuchi T, Matsukura S, Tamada Y, Nishio Y, Morishita T, Fujii M, 2000a. Some epidemiological aspects of *Rhodococcus equi* infection in foals in Japan: A review of 108 cases in 1992-1998. J Equine Sci, 11, 1, 7-14.

121. Takai S, Hines SA, Sekizaki T, Nicholson VM, Alperin DA, Osaki M, Takamatsu D, Nakamura M, Suzuki K, Ogino N, Kakuda T, Dan H, Prescott JF, 2000b. DNA Sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. Infect Immun, 12, 68, 6840–6847.

122. Takai S, Nakata I, Naoto F, Yoshinori K, Yukako S, Kakuda T, Tsubaki S, Kondo T, Sugiura T, 2002. Isotype-specific antibody responses to *Rhodococcus equi* in foals on a horse-breeding farm with a persistent incidence of *R. equi* Infection. J Equine Sci, 13, 63-70.

123. Takai S, Martens RJ, Julian A, Ribeiro MG, Rodrigues de Farias M, Sasaki Y, Inuzuka K, Kakuda T, Tsubaki S, Prescott JF, 2003. Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from cats and dogs. J Clin Microbiol, 41, 9, 4468-4470.

124. Tan C, Prescott JF, Patterson MC, Nicholson VM, 1995. Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. Can I Vet Res, 59, 1, 51-59.

125. Taouji S, Nomura I, Giguère S, Tomomitsu S, Kakuda T, Ganne V, Takai S, 2004. Immunogenecity of synthetic peptides representing linear B-cell epitopes of VapA of *Rhodococcus equ*i. 22, 9-10, 1114–1123.

126. Tel OY, Arserim NB, Keskin O, 2011. Seroepidemiological survey of *Rhodococcus equi* infection in asymptomatic horses and donkeys from Southeast Turkey Tydskr S Afr Vet Ver, 82, 4, 224-226.

127. Tkachuk-Saad O, Prescott JF, 1991. *Rhodococcus equi* plasmids: Isolation and partial characterization. J Clin Microbiol, 29, 2696-2700.

128. Wagner B, Miller DC, Lear TL, Antczak DF, 2004. The complete map of the immunoglobulin heavy chain constant gene region reveals evidence for seven IgG isotypes and for IgD in the horse. J Immunol, 173, 5, 3230-3242.

129. Wagner B, 2006. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. Dev Comp Immunol, 30, 1-2, 155–164.

130. Weinstock DM, Brown A E, 2002. *Rhodoccoccus equi*: An emerging pathogen. Clin Infect Dis, 34, 1379–1385.

131. Woodroofe GM, 1950.. Studies on strains of *Corynebacterium equi* isolated from pigs. J Exp Biol Med Sci, 28, 4, 399-409.

132. Whitford HW, Jones, LP, 1974. *Corynebacterium equi* infection in the goat. Southwestern Vet, 27, 3, 261-262.

133. Witkowski L, Kaba J, Rzewuska M, Nowicki M, Szalusjordanow O, Kita J, 2012. Development of ELISA test for determination of the level of antibodies against *Rhodococcus equi* in equine serum and colostrum. Vet Immun Immunpathol, 149, 280-285.

134. Woolcock JB, Mutimer MD, 1978. The capsules of *Corynebacterium equi* and *Streptococcus equi*. J Gen Microbiol, 109, 127-130.

135. Woolcock JB, Farmer AT, Mutimer MD, 1979. Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. J Clin Microbiol, *9*, 640-642

136. Valdes A, Johnson JR, 2005. Septic pleuritis and abdominal abscess formation caused by *Rhodococcus equi* in a foal. J Am Vet Med Assoc, 227, 6, 960–963.

137. Vanniasinkam T, Barton MD, Heuzenroeder MW, 2001. B-cell epitope mapping of the VapA protein of *Rhodococcus equi*: Implications for early detection of *R. equi* disease in foals. J Clin Microbiol, 39, 4, 1633-1637.

138. Vengust M, Stæmpfli H, Prescott JF, 2002. *Rhodococcus equi* pleuropneumonia in an adult horse, Can Vet J, 43, 9, 706-708.

139. Yamshchikov VA, Schuetz A, Lyon GM, 2010. *Rhodococcus equi* infection. Lancet Infect Dis, 10, 350–359.

140. Zink MC, Yager JA, Smart NL, 1984. *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958-1984: A review of 131 cases. Can Vet J, l27, 5, 213-217.

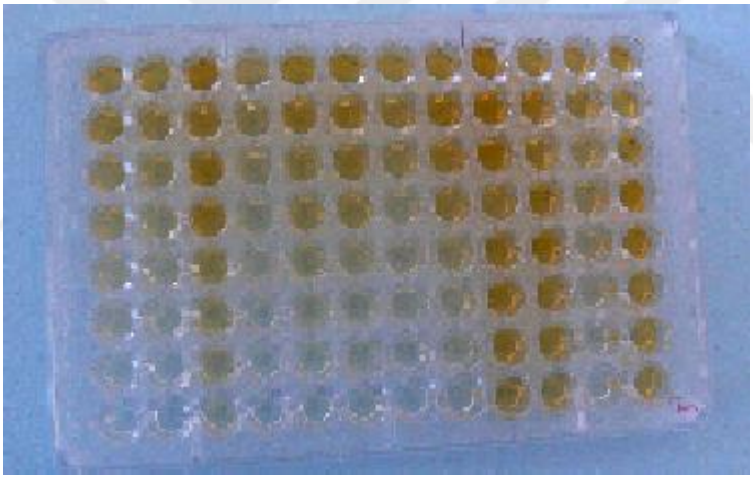
141. Zink MC, Yager JA, Prescott JF, Wilkie BN, 1985. In vitro phagocytosis and killing of *Corynebacterium equi* by alveoler macrophages of foals. Am J Vet Res, 46, 10, 2171-2174.

142. Zink MC, Yager JA, Prescott JF, Fernando MA, 1987. Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. Vet Microbiol, 14, 295-305

7.EKLER



Şekil 9.1. Negatif ve Pozitif Serum Örnekleri



Şekil 9.2. Serum Örnekleri

8.ÖZGEÇMİŞ

Seyyide Merve TEMİMHAN, 1982 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2008 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Mikrobiyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen, Çankaya Belediyesi Sahipsiz Sokak Hayvanları Geçici Bakım Evi ve Rehabilitasyon Merkezinde veteriner hekim olarak çalışmaktadır.

Bilimsel Makaleler

Hadimli H. H., Sayın Z., Pınarkara Y., Sakmanoğlu A., **Temimhan M. S.,** Erganiş O., Farelerde inaktif *Arcanobacterium pyogenes* aşılarının etkinliği Eurasian Journal Of Veterinary Sciences 2012, **28**, 3, 133-137.

Semacan A., Uçan S. U., **Temimhan M**., Çizmeci Ü., (2012) Observations on trials of Potoclean® as a teat-dipping disinfectant . Eurasian Journal Of Veterinary Sciences, 2012, **28**, 1, 54-56.

Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Basılan Yayınlar

O. Erganiş, H. H. Hadimli, K.Kav, Z. Sayın, A. Balevi, Y. Pınarkaya, **M. S. Temimhan**. Anadolu Yaban Koyunları İçin Paratüberküloz Aşısı Hazırlanması; İlk bulgular IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. Kıbrıs, 5-7 EKİM 2010.

O. Erganiş, H. H. Hadimli, Z. Sayın, A. Sakmanoğlu (Balevi), Y. Pınarkaya, **M. S. Temimhan**. Taylardaki Rhodococcus equi Enfeksiyonu için Aşı Hiperimmün Plazma ve Bağışıklık Ölçüm Kiti Geliştirilmesi. X. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. Aydın, 24-27 EYLÜL 2012.