



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2018; 32 (1): 31 - 34
http://www.fusabil.org

Antalya Yöresindeki Keçilerde Hemotropik *Mycoplasma* spp.'nin Nested PCR ile Araştırılması

Sezai ÖZÜBEK

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

ORCID: 0000-0001-5231-2258

Bu çalışma, hemotropik *Mycoplasma* spp.'nin Antalya yöresindeki keçilerde varlığı ve yaygınlığının nested PCR ile ortaya konması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Antalya ilinde bulunan 3 odakta (Akseki, Manavgat ve Serik) keçilerden toplam 157 adet kan örneği toplanmıştır. Çalışmada kullanılan hayvanlar ayrıca kene varlığı yönünden muayene edilmiştir. Bu örneklerden total genomik DNA'lar izole edilmiş, elde edilen DNA örnekleri hemotropik *Mycoplasma* spp. varlığı yönünden 16S rRNA gen bölgeleri nested PCR ile amplifiye edilmiştir. İncelenen 157 örneğin 35'inde (%22.3) *Mycoplasma* spp. pozitifliği tespit edilmiştir. Pozitif örnekler arasından seçilen bir örneğin 16S rRNA genine ait sekans analizi sonucu *Mycoplasma ovis* ile %100 benzer olduğu görülmüştür. Bu çalışma ile Antalya yöresindeki keçilerde nested PCR ile hemotropik *Mycoplasma* spp. varlığı ve etkenine ait epidemiyolojik veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hemotropik mycoplasma, keçi, *Mycoplasma ovis*, nested PCR

Investigation of Hemotropic *Mycoplasma* spp. by Nested PCR in the Goats in Antalya Region

This study was carried out in order to reveal the presence and prevalence of hemotropic *Mycoplasma* spp. in goats in Antalya region by nested PCR. For this purpose, a total of 157 blood samples were collected from the 3 focus of the Antalya province (Akseki, Manavgat and Serik). The animals used in the study were also examined for presence of ticks. Total genomic DNAs were isolated from these samples, and DNA samples were obtained from hemotropic *Mycoplasma* spp. the presence of the 16S rRNA gene region was amplified by nested PCR. 157 of the samples examined, 35 (22.3%) were *Mycoplasma* spp. positivity was detected. Sequence analysis of the selected among the positive samples, was found to be 100% similar to the result of *Mycoplasma ovis*. In this study, nested PCR of hemotropic *Mycoplasma* spp. presence and epidemiological data of the agent were obtained.

Key words: Kangal Hemotropic mycoplasma, goat, *Mycoplasma ovis*, nested PCR

Giriş

Hemotropik mycoplasmalar eritrositlerin yüzeyine yerleşen, küçük, pleomorfik, hücre duvarı olmayan bakterilerdir. Bu organizmalar uzun süre Rickettsia grubu içinde *Hemobartonella* ve *Eperythrozoon* olarak isimlendirilmiştir. Ancak 16S rRNA gen bölgesine dayalı yapılan moleküler analizlerde bu etkenler Mycoplasmatacea ailesine aktarılmıştır. Bu aileye alınmasından sonra diğer mycoplasmalar ile karışmasını önlemek amacıyla bunlara hemotropik mycoplasma ismi önerilmiştir. Hemotropik mycoplasmaların doğal bulaşma şekli bilinmemekle beraber, kan emici artropodların, etkenlerin naklinde rol aldığı düşünülmektedir (1). Ayrıca iatrojenik (1) ve transplasental (2) bulaşmadan da bahsedilmiştir. Dünya genelinde insan ve çeşitli hayvan türlerinde önemli enfeksiyonlara yol açtığı bilinmektedir (3-6).

Hemotropik mycoplasmalar koyun ve keçilerde infertilite yanında, hemolitik anemi, sarılık, ve kilo kaybı gibi semptomlarla kendisini göstermektedir (1). Koyun ve keçilerde *Mycoplasma ovis* ve *Candidatus Mycoplasma haemovis* olmak üzere iki hemotropik mycoplasmanın varlığından bahsedilmektedir (7, 8). Bu iki mycoplasma arasında 16S rRNA gen bölgesine göre %97 oranında benzerlik ve sadece 17 nükleotitik bir fark bulunmaktadır (9). Ayrıca sığırların hemotropik mycoplasma etkeni *Mycoplasma wenyonii*'nin varlığı da koyunlarda bildirilmiştir (6). Koyun ve keçilerde bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda genel primerler kullanılarak pozitifliğin sadece *Mycoplasma ovis* türü üzerinden verildiği çeşitli çalışmalarda görülmüştür (10, 11). Bu tür çalışmalarda tür düzeyinde sonuç vermek için ya pozitif örneklerin tamamı ya da pozitif örnekler üzerinde farklı teknikler kullanılarak (SSCP gibi) seçilen örneklerin sekans analizine gönderilmesi gerekmektedir (6).

Hemotropik *Mycoplasma*'ların, koyun ve keçilerde ciddi ekonomik kayıplara yol açmasına rağmen epidemiyolojik araştırmaların yeterince yapılmadığı görülmüştür. Keçi popülasyonunun yüksek olduğu Antalya yöresinde hemotropik *Mycoplasma* ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, hemotropik *Mycoplasma* spp.'nin Antalya yöresindeki keçilerde varlığı ve yaygınlığının nested PCR ile ortaya konulması amacıyla yapılmıştır.

Geliş Tarihi : 22.12.2017

Kabul Tarihi : 05.02.2018

Yazışma Adresi Correspondence

Sezai ÖZÜBEK
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı,
Elazığ – TÜRKİYE

sozubek@firat.edu.tr

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri Ağustos-Eylül 2017 tarihleri arasında Antalya'nın Akseki, Manavgat ve Serik ilçelerinden toplanmıştır. Toplam 157 keçiden EDTA'lı tüplere kan örneği alınmıştır. Örneklemede, sürünün büyüklüğüne göre her sürüden 3-15 hayvan rastgele seçilmiştir. Kan örneği toplanan hayvanlar ayrıca kene varlığı yönünden muayene edilmiştir. Örnekler yaş grubuna (1 yaşından küçük, 1 yaşından büyük) ve kene varlığı (kene var, kene yok) yönünden gruplara ayrılmıştır. Soğuk zincirde laboratuvara getirilen kan örnekleri DNA izolasyonunda kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. DNA ekstraksiyonu, ticari DNA izolasyon kiti (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak kit protokolüne göre yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar *Mycoplasma* spp. varlığı yönünden nested PCR'a tabi tutulmuştur. Ayrıca her bir PCR'da pozitif kontrol olarak daha önceki çalışmada elde ettiğimiz *Mycoplasma ovis* (MF377462) pozitif kontrol DNA'sı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler ve PCR şartları Tablo 1'de belirtilmiştir. Çalışma için Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan Etik Kurul Raporu (2014/07) alındı.

Polimeraz zincir reaksiyonunda elde edilen ürünler, 90 voltta bir saat süreyle %1.6'lık agaroz jel

elektroforeze tabi tutulmuştur. Daha sonra jel, Ultraviole (UV) transillüminatörde spesifik bantların varlığı yönünden incelenmiştir. PCR sonucunda pozitif olduğu belirlenen örnekleri temsilen seçilen bir amplifikasyon ürününün DNA dizisi belirlenmiştir. Dizisi belirlenen örnek BLAST analizi yapıldıktan sonra GenBank'a sunularak kabul numarası alınmıştır.

Bulgular

Toplanan örneklerden elde edilen nested PCR sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2'den anlaşılacağı üzere Antalya yöresinde incelenen 157 örneğin 35'inde nested PCR ile *Mycoplasma* spp. pozitiflik tespit edilmiştir. Odaklara göre pozitiflik Akseki'de 10/55 (%18.2), Manavgat'ta 18/68 (%26.5) ve Serik'de 7/34 (%20.6) oranlarında bulunmuştur. Yaş grupları arasındaki pozitiflik istatistiki olarak anlamsız bulunurken, kene varlığı yönünden pozitiflik anlamlı bulunmuştur. Pozitif örnekleri temsilen seçilen örneğin 16S rRNA genine ait DNA dizisi GenBank'a kaydı yapılarak kayıt numarası alınmıştır (MG732908). BLAST analizi sonucu bu örneğin *Mycoplasma ovis* koyun izolatlarıyla %100 (KU983745, MF377461) benzer olduğu görülmüştür.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler ve PCR şartları

Primer	Nükleotid Dizilimi (5' -3')	Ürün Büyüklüğü baz çifti (bc)	PCR şartları	Kaynak
8F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	~1457bc	95°C 5dk; 95°C 1dk, 50°C 1dk, 72°C 2dk 35 siklus; 72°C 5dk	12
HBT F HBT R	ATACGGCCCATATTCCTACG TGCTCCACCACTTGTTCA	~600bc	94°C 5dk; 95°C 30sn, 52°C 30sn, 72°C 30sn 30 siklus; 72°C 10dk	13

Tablo 2. Keçilerin yaş ve kene varlığı yönünden pozitifliğin odaklara göre dağılımı

Odak	n	Yaş		Kene varlığı		
		1>	1<	1>	Yok	
Akseki	Örnek sayısı	55	27	28	14	41
	Pozitif	10	4	6	6	4
	%	18.2	14.8	21.4	42.8	9.7
	95% CI	9.1-30.9	4.2-33.7	8.3-40.9	17.7-71.1	2.3-23.1
Manavgat	Örnek sayısı	68	41	27	22	46
	Pozitif	18	12	5	11	7
	%	26.5	29.3	18.5	50	15.2
	95% CI	16.5-38.6	16.1-45.5	6.3-38.1	28.2-71.8	6.3-28.9
Serik	Örnek sayısı	34	20	14	11	23
	Pozitif	7	5	3	3	4
	%	20.6	25	21.4	27.3	17.4
	95% CI	8.7-37.9	8.6-49.1	4.6-50.8	6.0-61.0	4.9-38.8
Toplam	Örnek sayısı	157	88	69	47	110
	Pozitif	35	21	14	20	15
	%	22.3	23.9	20.3	42.5	13.6
	95% CI	6.0-29.6	15.4-34.1	11.6-31.7	28.2-57.8	7.8-21.5
P-değeri			> 0.05		< 0.05	

Tartışma

Hemotropik *Mycoplasma*'lar, çeşitli hayvan türlerinde önemli enfeksiyonlara yol açan ve önem kazanan (emerging) ya da yeniden önemli hale gelen (re-emerging) zoonoz patojenler olarak bilinmektedir (1). Hemotropik *Mycoplasma*'lar evcil hayvanlarda sıklıkla rapor edilmelerine rağmen, keçiler üzerinde sınırlı sayıda çalışmanın olduğu görülmektedir. Keçilerde hemotropik mycoplasma üzerine Tunus (10) ve Fas'ta (14) yapılan çalışmalarda, pozitiflik bulunmazken, Macaristan (15), Çin (16, 17) ve Brezilya'da (11) yapılan çalışmalarda sırasıyla %20, %41, %44.1 ve %39.3 oranlarında pozitiflik saptanmıştır. Türkiye'de koyun ve keçilerde hemotropik *Mycoplasma*'ların varlığı üzerine yapılan çalışmada %9 pozitiflik bildirilmiş ve 6 koyunda *Mycoplasma ovis*'ten kaynaklanan klinik vakalar rapor edilmiştir (6). Bu çalışmada Antalya ilinde bulunan keçilerde hemotropik *Mycoplasma spp.*'nin varlığı nested PCR ile incelenmiş %22.3 (35/157) oranında pozitiflik bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardaki oranlar Macaristan'da yapılan çalışma ile benzer bulunurken Çin ve Brezilya'da yapılan çalışmalardan düşük oranda bulunmuştur. Çalışmalarda kullanılan moleküler tekniklerin sonuçlar üzerinde önemli etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (18, 19). Konuyla ilgili Çin'de yapılan çalışmada, keçilerde hemotropik mycoplasma varlığı konvansiyonel PCR ve nested PCR ile karşılaştırılmış ve sırasıyla %26, %41 oranlarında pozitiflik bulunmuştur (16). Türkiye'de yapılan çalışmada keçilerde %6.2 pozitiflik konvansiyonel PCR (6) ile saptanırken, bu çalışmada nested PCR ile pozitiflik %22.3 oranında bulunmuştur.

Hemotropik mycoplasmalarda bulaşmanın kene dahil, kan emici eklem bacaklıların yanı sıra, aşılama ve

kulak küpeleme sırasında ekipmanın tekrar kullanılmasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir (1). Ayrıca transplasental naklin de olabileceği bildirilmiştir (2). Hemoplasma ile enfekte kedi (20) ve keçilerden (15) toplanan pire ve bitlerde hemotropik mycoplasmaların varlığından bahsedilirken, aç *Ixodes spp.* keneleri üzerinde yapılan çalışmada hemoplasma DNA'sı bulunmamıştır (21). Benzer olarak, yapılan başka bir çalışmada (5) hemoplasma ile enfekte köpeklerden elde edilen aç *Rhipicephalus sanguineus* türü kenelerde hemoplasma DNA'sı saptanmamıştır. Sunulan çalışmada kene varlığı ile hemoplasma pozitifliği arasında daha önceki çalışmalarda olduğu gibi (5, 6, 22) pozitif korelasyon bulunmuştur. Ayrıca yaş grupları ile hemoplasma pozitifliği arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Bu sonuç Wang ve ark. (17) bulduğu sonuç ile uyumlu bulunmuştur.

Hemotropik mycoplasmosis, veteriner hekimler, veteriner teknisyenleri ve hayvancılık ile uğraşan kişiler için meslek hastalığı olarak risk oluşturmaktadır. Sykes ve ark. (23) bir veteriner hekimde *Mycoplasma ovis*'in varlığını bildirmişlerdir. Çin'de yapılan bir çalışmada (24), domuz çiftliklerinde çalışan kişiler ve veteriner hekimlerde *Mycoplasma suis*'in yüksek oranda (%49) bulunduğu bildirilmiştir. Bunun yanında Veteriner hekimler, koyun ve keçilerde kan parazitlerinin (*Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma*) ayırıcı tanısında, hemotropik mycoplasmaların neden olduğu klinik belirtilere dikkat etmelidir.

Sonuç olarak veteriner hekimler, koyun ve keçilerde kan parazitlerinin (*Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma*) ayırıcı tanısında, hemotropik mycoplasmaların neden olduğu klinik belirtilere dikkat etmelidir.

Kaynaklar

- Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insight into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol* 2004; 33: 2-13.
- Hornok S, Micsutka A, Meli ML, et al. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. *Vet Microbiol* 2011; 152: 411-414.
- Maggi RG, Mascarelli PE, Balakrishnan N, et al. *Candidatus Mycoplasma haemomacae* and *Bartonella quintana* bacteremia in cynomolgus monkeys. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1408-1411.
- Hu Z, Yin J, Shen K, Kang W, Chen Q. Outbreaks of hemotrophic *Mycoplasma* infections in China. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1139.
- Aktas M, Ozubek S. Molecular survey of haemoplasmas in shelter dogs and associate with *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Med Vet Entomol* 2017; 31: 457-461.
- Aktas M, Ozubek S. A molecular survey of small ruminant hemotrophic mycoplasmosis in Turkey, including first laboratory confirmed clinical cases caused by *Mycoplasma ovis*. *Vet Microbiol* 2017; 208: 217-222.
- Neimark H, Hoff B, Ganter M. *Mycoplasma ovis* comb. nov (formerly *Eperythrozoon ovis*): An epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 365-371.
- Hornok S, Meli ML, Erdos A, et al. Molecular characterization of two different strains of haemotrophic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection. *Vet Microbiol* 2009; 136: 372-377.
- Deshuillers PL, Santos AP, do Nascimento NC, et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma ovis* strain Michigan, a hemoplasma of sheep with two distinct 16S rRNA genes. *Genome Announc* 2014; 2: 1235-1213.
- Rjeibi MR, Darghouth MA, Omri H, et al. First molecular isolation of *Mycoplasma ovis* from small ruminants in North Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 2015; 82: 912.
- Machado CAL, Vidotto O, Conrado FO, et al. *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from northeastern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2017; 55: 1-5.
- Pitulle C, Citron DM, Bochner B, Barbers R, Appleman MD. Novel bacterium isolated from a lung transplant patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3851-3855.
- Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: A molecular study. *Vet Microbiol* 2003; 93: 307-317.

14. Ait Lbacha H, Alali S, Zouagui Z, et al. High prevalence of *Anaplasma* spp. in small ruminants in Morocco. *Transbound Emerg Dis* 2015; 64: 250-263.
15. Hornok S, Hajtós I, Meli ML, et al. First molecular identification of *Mycoplasma ovis* and *Candidatus M. haemoovis* from goat, with lack of haemoplasma PCR-positivity in lice. *Acta Vet Hung* 2012; 60: 355-360.
16. Song W, Song Q, He L, Zhou Y, Zhao J. The establishment and application of a semi-nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma ovis*. *Small Rumin Res* 2014; 119: 176-181.
17. Wang X, Cui Y, Zhang Y, et al. Molecular characterization of hemotropic mycoplasmas (*Mycoplasma ovis* and *Candidatus Mycoplasma haemovis*) in sheep and goats in China. *BMC Vet Res* 2017; 13: 142.
18. Aydin MF, Aktas M, Dumanli N. Molecular identification of *Theileria* and *Babesia* in sheep and goats in the Black Sea region in Turkey. *Parasitol Res* 2013; 11: 2817-2824.
19. Ozubek S, Aktas M. Molecular and parasitological survey of ovine piroplasmiasis, including the first report of *Theileria annulata* (Apicomplexa: Theileridae) in sheep and goats from Turkey. *J Med Entomol* 2017; 54: 212-220.
20. Shaw SE, Kenny MJ, Tasker S, Birtles RJ. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouche) in the United Kingdom. *Vet Microbiol* 2004; 102: 183-188.
21. Willi B, Boretti FS, Meli ML, et al. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3798-3802
22. Soares RL, Echeverria JT, Pazzuti G, et al. Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25: 359-363
23. Sykes JE, Lindsay LL, Maggi RG, Breitschwerdt EB, Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3782-3785.
24. Yuan CL, Liang AB, Yao CB, et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *Am J Vet Res* 2009; 70: 890-894.