



T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**KARS İLİNDE YETİŞTİRİLEN KOYUNLARIN KAZEÖZ
LENFADENİTLERİNDEN *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in
İZOLASYONU, MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE
ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ**

Arş. Gör. Eray BÜYÜK

DOKTORA TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Özgür ÇELEBİ

2025 – KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

KARS İLİNDE YETİŞTİRİLEN KOYUNLARIN KAZEÖZ
LENFADENİTLERİNDEN *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in
İZOLASYONU, MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

Arş.Gör. Eray BÜYÜK
Orcid No: 0000-0003-2071-8901
DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof.Dr. Özgür ÇELEBİ
Orcid No: 0000-0002-3478-008X

2025 – KARS

Bu tez Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
2024-TS-05 proje numarası ile desteklenmiştir.

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Arş.Gör. Eray BÜYÜK tarafından hazırlanmış olan “**Kars İlinde Yetiştirilen Koyunların Kazeöz Lenfadenitlerinden *Corynebacterium pseudotuberculosis*’in İzolasyonu, Moleküler İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda Jüri Üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim, Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **oy birliği** ile **kabul** edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/07/2025

Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof.Dr. Salih OTLU

Üye : Prof.Dr. Atila Taner KALAYCIOĞLU

Üye : Prof.Dr. Özgür ÇELEBİ

Üye : Doç.Dr. Murat KARAMEŞE

Üye : Doç.Dr. Mehmet Cemal ADIGÜZEL

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../...
gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖNSÖZ

Kars İli, özellikle koyun yetiştiriciliği açısından oldukça elverişli meraların yaygın olması nedeniyle ülkemizde önemli bir yere sahiptir. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, koyunlarda kazeöz lenfadenit (KLA), ülseratif lenfanjit, mastitis (klinik ve subklinik) ve ülseratif dermatitin etiyolojik etkenidir. Bunlardan KLA, yüzeysel lenf düğümlerinde ve deri altı dokularda apse oluşumu ile karakterizedir. Bu hastalık koyunlarda kilo kaybı, yün ve derinin yıpranması, süt üretiminin azalması ve nihayetinde enfekte hayvanlarda meydana gelen toksemi sonucu ölüm nedeniyle doğrudan ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Ayrıca, bu bakteri zoonotik potansiyele de sahiptir.

Bu çalışmada, Kars İlinde yetiştiriciliği yapılan koyunlarda tespit edilecek kazeöz lenfadenitis klinik olgularından *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in kültürel ve moleküler yöntemlerle tanımlanması ve elde edilecek izolatların ileri karakterizasyonu ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma, kazeöz lenfadenit lezyonlarına sahip 105 adet koyunun apse içeriğinden alınan örneklerden *C. pseudotuberculosis* etkeninin kültürel yöntemlerle izolasyonu ve identifikasyonunu, izolatların PCR ile konfirmasyonunu ve bilinen virülans genler yönünden analizini, izolatların yaygın kullanılan antibiyotik duyarlılık/dirençlilik profillerinin belirlenmesi ve ayrıca izolatların 16S rRNA tabanlı sekans analizi sonucu filogenetik konumlandırılması gibi yöntemleri kapsamaktadır. Kültürel, moleküler ve sekans temelli analiz yöntemler ile, Kars yöresinde yetiştirilen koyunlarda *C. pseudotuberculosis* kaynaklı kazeöz lenfadenitis olgularına ve etiyolojik etkenin fenotipik ve genotipik davranışlarına geniş bir açıdan bakılarak ve enfeksiyonun epidemiyoloji, tedavi ve koruma-kontrolüne yönelik katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Lisansüstü eğitimim boyunca her konuda destek olan, bu tez çalışması boyunca deneyimlerini, yardımlarını ve değerli katkılarını esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. Özgür ÇELEBİ'ye, tüm süreç boyunca ilgisini ve desteğini gördüğüm Prof.Dr. Salih OTLU'ya, Prof.Dr. Mitat ŞAHİN'e, Prof.Dr. Fatih BÜYÜK'e ve Doç.Dr. Murat KARAMEŞE'ye, tavsiye ve yönlendirmeleri için

Doç.Dr. Aliye GÜLMEZ SAĞLAM'a ve Dr.Öğr. Üyesi Elif ÇELİK'e, tez çalışmasının tüm süreçlerinde yanımda olan ve değerli katkılarda bulunan Arş.Gör. Yaren ERSOY'a ve Viroloji Anabilim Dalı'ndan Arş.Gör. Emrah KORKULU'ya, ihtiyaç duyduğumda laboratuvarlarını kullanmama izin veren Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Üretimi Anabilim Dalı'na, istatistiksel analiz konusunda değerli zamanından ayırıp yardımcı olan Veteriner Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Arş.Gör.Dr. Merve AYYILDIZ AKIN'a ve tez çalışmamın finansmanını sağlayan Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Büyümemde ve okumamda sürekli arkamda duran, destekleyen ve yol gösteren anneme ve babama, veteriner hekim olmamı isteyen ve destekleyen rahmetli anneanneme ve dedeme, desteklerini esirgemeyen eşimin annesine ve babasına, tez çalışmam boyunca her an yanımda olan gerek yardımlarıyla gerekse desteğiyle bana moral ve motivasyon veren, büyük bir sabırla beni dinleyen, her konu da beni destekleyen ve cesaretlendiren eşim Arş.Gör.Dr. Gönül Damla BÜYÜK'e, motivasyonumu kaybettiğim anlarda huzur bulduğum, yaşam enerjilerim patili evlatlarım Hektor, Simge, Boncuk, Tosbik ve yakın zamanda melek olan yavrum Zeytin'ime sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ve SİMGELER.....	I
ŞEKİLLER LİSTESİ	III
RESİMLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Genel Özellikleri	5
2.3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Fenotipik, Biyokimyasal ve Fiziyojik Özellikleri.....	6
2.3.1. Koloni Morfolojisi ve Üreme Özellikleri	6
2.3.2. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Mikroskopik Morfolojisi	6
2.3.3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Hücre Duvarı Yapısı....	6
2.3.4. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Biyokimyasal Özellikleri	7
2.4. Epidemiyoloji	7
2.4.1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Epidemiyolojisi.....	7
2.4.2. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Bulaşmasında Etkili Olan Risk Faktörleri	10
2.4.3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Dünya'daki ve Türkiye'deki Prevalansı	10

2.5. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Klinik Semptomları	12
2.6. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Patogenezi.....	14
2.7. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Virölans Faktörleri	15
2.7.1. Fosfolipaz D (PLD)	16
2.7.2. Mikolik Asit.....	17
2.7.3. Diğer Virölans Faktörleri	19
2.8. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Teşhisi	20
2.8.1. Bakteriyoskopi	20
2.8.2. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	20
2.8.3. Reverse CAMP testi.....	21
2.8.4. Serolojik Teşhis	21
2.8.5. Moleküler Teşhis.....	23
2.8.6. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in 16S rRNA Sekansı.....	23
2.9. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Tedavisi.....	24
2.10. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'te Koruma ve Kontrol	24
3. MATERYAL VE METOT.....	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Çalışma İzni.....	28
3.1.2. Çalışma Planı ve Örnek Materyalinin Toplanması.....	28
3.1.3. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Malzemeler	30
3.1.4. Fenotipik İdentifikasyonda Kullanılan Malzemeler	32
3.1.5. Moleküler İdentifikasyonda Kullanılan Malzemeler	34
3.1.6. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Kullanılan Malzemeler	35

3.1.7. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> Suşlarının 16S rRNA Sekanslanması ve Filogenetik Analizinde Kullanılan Malzemeler	37
3.2. Metot	37
3.2.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması.....	37
3.2.2. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in İzolasyonu	38
3.2.3. Fenotipik Yöntemlerle <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in İdentifikasyonu.....	38
3.2.4. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu.....	41
3.2.5. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi	46
3.2.6. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> İzolatlarının 16S rRNA Sekanslanması ve Filogenetik Analizi	46
4. BULGULAR.....	48
4.1. İzolasyon Sonuçları.....	48
4.2. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> Şüpheli İzolatların İdentifikasyon Sonuçları.....	50
4.3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> İzolatların Moleküler İdentifikasyon Sonuçları.....	52
4.4. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> İzolatlarının Biyovarylarına Ait PCR Sonuçları	53
4.5. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> İzolatlarının Virölans Genleri Varlığı Yönünden Moleküler Değerlendirme Sonuçları	53
4.6. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Değerlendirme Sonuçları.....	56

4.7. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> İzolatlarının 16S rRNA	
Sekanslanması ve Filogenetik Analizi Sonuçları.....	63
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ	76
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ	88



KISALTMALAR ve SİMGELER

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
°C	: Santigrat derece
bp	: Base pair
C	: Sitozin
CAMP	: Christie-Atkins-Munch-Petersen
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CTBA	: Sistin-Tellürit Kanlı agar
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DT	: Difteri toksini
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
FagA	: İntegral membran proteini
FagB	: Demir enterobaktin taşıyıcısı
FagC	: ATP bağlayıcı sitoplazmik membran proteini
FagD	: Demir siderofor bağlayıcı protein
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
g	: Gram
G	: Guanin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
kDa	: Kilo Dalton
KLA	: Kazeöz lenfadenit
L	: Litre
m	: Marker
mL	: Mililitre

mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
<i>NanH</i>	: Nöromidinase
NK	: Negatif kontrol
<i>Opp</i>	: Oligopeptid permease
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PK	: Pozitif kontrol
<i>PknG</i>	: Protein Kinaz C
PLD	: Fosfolipaz D
rpoB	: RNA polimeraz β -alt birimi için kodlar
sn	: Saniye
<i>Sod C</i>	: Süperoksit dismutase
<i>Spa C</i>	: Pili tip protein C
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
U	: Ünite
UV	: Ultra viyole

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 16S rRNA sekansı gerçekleştirilen *C. pseudotuberculosis* izolatları ile yüksek düzeyde sekans eşleşmesi sağlanan *C. pseudotuberculosis* izolatlarının GenBank'tan seçilmiş genomların filogenetik ağaç üzerindeki ilişkisi.....64



RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Kazeöz lenfadenit olgularından numune alımı.....	29
Resim 2. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> şüpheli izolatların %5 koyun kanlı agar besiyerindeki koloni görüntüsü.....	49
Resim 3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> şüpheli izolatların Gram boyama görüntüsü.....	49
Resim 4. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> şüpheli izolatlara uygulanan katalaz testi sonuç görüntüleri.....	50
Resim 5. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> şüpheli izolatların üre agar besiyerindeki görüntüsü.....	51
Resim 6. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> şüpheli izolatların nitrat indirgeme testi görüntüsü.....	51
Resim 7. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in moleküler doğrulamasında kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü.....	52
Resim 8. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in biyovarylarının PCR analizine ait ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü.....	53
Resim 9. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in FagA geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü...	54
Resim 10. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in FagB geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü...	54
Resim 11. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in FagC geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü...	55
Resim 12. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in FagD geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü...	55

Resim 13. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in PIP geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü...56

Resim 14. *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatının CIP-5 µg, RA-5 µg, DA-2 µg, P-1 UI, LNZ-30 µg, VA-5 µg ve TE-30 µg antibiyotik diskleri kullanılarak Kanlı Mueller-Hinton Agar besiyerindeki antibiyogram testi değerlendirme görüntüleri...57

Resim 15. *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatının LZ-0.016-256 µg/mL, TC-0.016-256 µg/mL, CI-0.002-32 µg/mL, RI-0.002-32 µg/m, PG-0.016-256 µg/mL, VA-0.016-256 µg/mL, CM-0.016-256 µg/mL e-test şeritleri kullanılarak Kanlı Mueller-Hinton Agar besiyerindeki antibiyogram testi değerlendirme görüntüleri...60



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in izolasyonunda kullanılan besiyerleri.....	20
Tablo 2. Çalışmaya ait apse içeriği örneklerinin lokasyon, köy ve işletme bazlı dağılımı.....	29
Tablo 3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> izolatlarının multipleks PCR ile doğrulamasında kullanılan primerler.....	42
Tablo 4. Multipleks PCR bileşimi ve reaksiyon koşulları.....	42
Tablo 5. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> izolatlarının biyovarlarının belirlenmesinde kullanılan primerler.....	43
Tablo 6. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> izolatlarının biyovarlarının belirlenmesinde kullanılan PCR bileşimi ve reaksiyon koşulları.....	43
Tablo 7. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 'in virülans genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	44
Tablo 8. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> izolatlarının virülans genlerinin belirlenmesinde kullanılan PCR bileşimi ve reaksiyon koşulları.....	45
Tablo 9. Kültürel analiz sonucu <i>C. pseudotuberculosis</i> şüpheli kabul edilen 95 izolata ait bilgiler.....	48
Tablo 10. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> şüpheli izolatlara uygulanan fenotipik identifikasyon testleri ve beklenen sonuçlar.....	50
Tablo 11. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> izolatlarının antibiyotik direnç profili değerlendirme sonuçları.....	58
Tablo 12. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin genel değerlendirmesi.....	59

Tablo 13. *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının e-test değeriendirme sonuçları.....61

Tablo 14. *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının e-test genel değeriendirmesi.....62

Tablo 15. *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının sekans bilgileri.....63



ÖZET

Kars İlinde Yetiştirilen Koyunların Kazeöz Lenfadenitlerinden *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in İzolasyonu, Moleküler İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Bu çalışma, Kars ilinde kazeöz lenfadenitli (KLA) koyunlardan alınan apse örneklerinde *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in izolasyonu, identifikasyonu, moleküler karakterizasyonu ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesini amaçlamıştır. Kars merkez ve 5 ilçesine ait 18 köy ve 96 işletmeden alınan toplam 105 apse örneğinin 95 (%90,48)'inde kültür pozitifliği saptanmış ve fenotipik testlerle (mikroskopik morfoloji, katalaz, üreaz, nitrat indirgeme ve reverse CAMP testleri) 70'i (%66,67) *Corynebacterium pseudotuberculosis* olarak tanımlanmıştır. 16S rRNA, *pld* ve *rpoB* genlerini hedefleyen multipleks PCR ile bu izolattan 47 (%67,14)'si *C. pseudotuberculosis* olarak konfirme edilmiştir. KLA olgularından *C. pseudotuberculosis*'in moleküler prevalansı böylece %44,76 (47/105) olarak saptanmıştır. *narG* spesifik PCR analiz ile gerçekleştirilen biyovar tayininde, bu genin olmayışı ile tüm (n= 47) izolatlar *C. pseudotuberculosis* biyovar *ovis* olarak belirlenmiştir. *C. pseudotuberculosis* saha izolatları arasında *FagA*, *FagB* ve *FagC* virülans gen pozitifliği %100, *FagD* gen pozitifliği %48,94 ve *PIP* gen pozitifliği %25,53 olarak saptanmıştır. *C. pseudotuberculosis* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle analizi sonucu rifampisin (%6,38) ve tetrasikline (%6,38) direnci düşük belirlenirken, E-test ile yapılan MİK analizlerinde yalnızca bir izolatta hem penisilin hem rifampisine karşı direnç tespit edilmiştir. Moleküler karakterizasyon kapsamında, farklı koyunculuk işletmelerinden seçilen 10 izolatın 16S rRNA gen sekans analizi yapılmış ve filogenetik analizde tüm izolatların *C. pseudotuberculosis* tür kompleksine ait olduğu doğrulanmıştır. İzolatların uluslararası veri tabanlarındaki referans suşlarla %97,45–99,85 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu veriler, Kars İlinde koyun KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* suşlarının genetik ve fenotipik çeşitliliğine dair önemli bilgiler sunmakta olup, KLA'nın tanı, tedavi ve kontrol uygulamalarının geliştirilmesine yönelik bilimsel temel oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: Koyun, kazeöz lenfadenit, izolasyon, PCR, sekans, antibiyotik duyarlılığı

ABSTRACT

Isolation, Molecular Identification, and Determination of Antibiotic Susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Caseous Lymphadenitis in Sheep Raised in Kars Province

This study aimed to isolate, identify, perform molecular characterization, and determine the antibiotic susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from abscess samples obtained from sheep with caseous lymphadenitis (CLA) in Kars Province. Out of a total of 105 abscess samples collected from 18 villages and 96 farms in the central district of Kars and five surrounding districts, 95 (90.48%) yielded positive culture results, and 70 (66.67%) were identified as *C. pseudotuberculosis* based on phenotypic tests (microscopic morphology, catalase, urease, nitrate reduction, and reverse CAMP tests). Multiplex PCR targeting the *16S rRNA*, *pld*, and *rpoB* genes confirmed 47 (67.14%) of these isolates as *C. pseudotuberculosis*. Consequently, the molecular prevalence of *C. pseudotuberculosis* in CLA cases was determined to be 44.76% (47/105). Biovar determination using *narG*-specific PCR analysis revealed the absence of this gene in all isolates (n = 47), classifying them as *C. pseudotuberculosis* biovar ovis. Among the field isolates, the virulence genes *FagA*, *FagB*, and *FagC* were detected in 100% of isolates, *FagD* in 48.94%, and *PIP* in 25.53%. Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion method revealed low resistance rates to rifampicin (6.38%) and tetracycline (6.38%), whereas minimum inhibitory concentration (MIC) analysis by E-test detected resistance to both penicillin and rifampicin in only one isolate. For molecular characterization, 16S rRNA gene sequence analysis was performed on 10 isolates selected from different sheep farms, and phylogenetic analysis confirmed that all isolates belonged to the *C. pseudotuberculosis* species complex. The isolates showed 97.45–99.85% similarity to reference strains in international databases. These findings provide important insights into the genetic and phenotypic diversity of *C. pseudotuberculosis* strains obtained from CLA cases in sheep in Kars Province and establish a scientific basis for improving diagnostic, treatment, and control strategies for CLA.

Keywords: Sheep, caseous lymphadenitis, isolation, PCR, sequence, antibiotic susceptibility

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Corynebacteriaceae familyasında yer alan *Corynebacterium* cinsi içerisinde şuana kadar 136 tür tespit edilmiştir (Kittl ve ark. 2022). Bu cins içerisinde yer alan türler, insan ve hayvanlar için fırsatçı patojenler olmasının yanısıra deri ve mukoz membranlarda kommensal olarak yer alırlar (Jaén-Luchoro ve ark. 2020).

Corynebacterium cinsinin patojen bir temsilcisi olan *Corynebacterium pseudotuberculosis* fakültatif anaerobik, Gram pozitif, intraselüler, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz, fimbriyalı bir bakteri olup dünya çapında dağılım gösteren bir patojendir. *C. pseudotuberculosis* özellikle atlar olmak üzere koyun ve keçi gibi küçük ruminantlarda coğrafi farklılıklar ile hastalığa sebebiyet verir. Sığır, devegiller dahil olmak üzere, lama, bufalo, yabani geviş getiren hayvanlar ve nadiren insanlarda da enfeksiyon tablosu oluşturabilir (Schlicher ve ark. 2021). *C. pseudotuberculosis* küçük ruminantlarda, yüzeysel ve visseral lenf düğümlerinde apse oluşumu ile karakterize olan ve kazeöz lenfadenit (KLA) olarak bilinen kronik piyogranüloma lezyonlarına neden olur. Enfeksiyon internal formu ise hayvanların iç organlarında ve lenf düğümlerinde yangısal semptomlara neden olur (Schlicher ve ark. 2021, Markova ve ark. 2024). KLA enfeksiyonlarında bulaşma yüzeysel apselerin içerisindeki irinin kendiliğinden boşalması sonucu meydana gelir. Buna ek olarak, bakteri sindirim ve solunum yoluyla direkt olarak da bulaşabilir. Atlarda ve sığırlarda etkenin karasineklerle bulaştığı da belirtilmektedir (Schlicher ve ark. 2021).

Corynebacterium pseudotuberculosis, kazeöz lenfadenit, ülseratif lenfanjit, mastitis (klinik ve subklinik) ve ülseratif dermatitin etiyolojik etkenidir. KLA yüzeysel lenf düğümlerinde ve deri altı dokularda apse oluşumu ile karakterizedir. Bu hastalık, kilo kaybı, yün ve derinin yıpranması, süt üretiminin azalması ve nihayetinde enfekte hayvanlarda meydana gelen toksemi sonucu ölüm nedeniyle doğrudan ekonomik kayıplarla ilişkilidir. Ayrıca, bu bakteri önemli zoonotik potansiyele sahiptir (Araújo ve ark. 2019, Gimenez ve ark. 2024). *C. pseudotuberculosis* bazı kaynaklarda mesleki bir

zoonoz olarak kabul edilmesine rağmen insanlarda enfeksiyonlar nadir olarak rastlanılmaktadır (Heggelund ve ark. 2015, Oliveira ve ark. 2017).

Corynebacterium pseudotuberculosis, nitratı kullanma yeteneğine göre iki biovara ayrılır. Biovar ovis suşları nitrat negatif iken biovar equi suşları nitrat pozitif özellik gösterir. Nitrat pozitif özellik gösteren biovar ovis; koyun ve keçilerde KLA' ya neden olurken, atlarda apse ve ülseratif lenfanjit ve mandalarda ödemli deri hastalığına neden olmaktadır. Bundan dolayı biyovarlar belirli bir konakçı için türe özgüllük göstermemektedirler (Schlicher ve ark 2021). KLA ile mücadele için aşı programları geliştirilmiştir (Paton ve ark. 2003). Fakültatif hücre içi bir bakteri olan *C. pseudotuberculosis* için ideal aşının hem hücresel hem de humoral bağışıklığı uyarması gerekmektedir (Bastos ve ark 2012). Dolayısıyla kullanılan ticari KLA aşı teknolojisi, toksoidler, bakterin ve canlı zayıflatılmış bakteriler gibi geleneksel aşılama dayanmaktadır (Eggleton ve ark 1991, Piontkowski ve Shivvers 1998).

Ülkemizde Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri yaygın meraları nedeniyle küçükbaş hayvancılık için elverişli bölgelerdir ve dolayısıyla bu bölgelerde küçükbaş hayvan yetiştiriciliği yaygındır. 2024 yılında yayımlanan TÜİK verilerine göre ülkemizde 43.393.709 baş koyun, 10.571.297 baş keçi bulunmaktadır (TÜİK 2024). Tarım ve Orman Bakanlığı' nın 2024 yılında yayımladığı verilere göre Kars ilinde 673.375 baş koyun ve 32.468 baş keçi bulunmaktadır (Anonim 2024).

Kars İli geniş meralara sahip olması nedeniyle küçükbaş hayvancılık yapılabilen illerimizden biri olup koyun yetiştiriciliği birçok aile için temel geçim kaynaklarından biridir. Yörede yapılan koyun yetiştiriciliği modern işletmelerin ötesinde genel olarak küçük ve aile tipi hayvancılık işletmelerinde yürütülmektedir. Bu işletmelerde at, eşek, köpek, keçi ve koyun gibi birden fazla hayvan türü birlikte barındırılmaktadır. Ayrıca Kurban Bayramı döneminde ülkemizin dört bir yanına hayvan transferleri gerçekleşmektedir. *C. pseudotuberculosis*'in etkeni olduğu hastalıklar ekonomik kayıplara sebep olmasından ötürü sadece Kars ili için değil yöre ve ülke hayvancılığı için de önem arz etmektedir. Çalışmada, Kars İlinde yetiştirilen koyunlarda gözlenen

kazeöz lenfadenit olgularından *C. pseudotuberculosis*'in kültürel yöntemlerle izolasyon, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve sekans temelli moleküler yöntemlerle identifikasyonu ve tanımlanan *C. pseudotuberculosis* suşlarının antimikrobiyalk duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Fransız bakteriyolog Edmond Isidore Étienne Nocard 1888’de, bir inekte görülen lenfanjit vakasından daha önce tanımlanmamış bir mikroorganizma üretti. Bulgar bakteriyolog Hugo von Preisz, yaklaşık 3 yıl sonra, bir koyunda böbrek apsesinden alınan örneklerden yaptığı kültürlerde benzer bir bakteri tespit etti. Bu keşiflerden sonra bakteri “Preisz-Nocard” basili olarak tanındı (Baird ve Fontaine 2007). 19. yüzyılın sonlarında, Alman bakteriyologlar Lehmann ve Neumann tarafından hazırlanan bakteriyolojik atlaslarının ilk baskısında yerini aldı (Bernard ve Funke 2015). Preisz-Nocard basili, Yunanca pseudos tuberculosis yani *Bacillus pseudotuberculosis*’ in türevi veya lezyonların mikobakteriyel tüberkülozun apseli nodülleriyle varsayılan klinik benzerliğine atıfta bulunmuş ve “yalancı tüberküloz” olarak yeniden adlandırılmıştır. Bakteri; Bergey’in 1923’te yayınlanan Determinatif Bakteriyoloji El Kitabının Birinci Baskısında, orijinal olarak insan patojeni *Corynebacterium diphtheriae* için bir kategori olarak oluşturulan *Corynebacterium* genusuna dahil edilmiştir. *B. pseudotuberculosis*’in morfoloji ve hücre duvarı bileşimi yönünden *C. diphtheriae*’ye benzediğini görülmüş ve *Corynebacterium ovis* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bakteri; keçiler, atlar ve insanlar dahil olmak üzere diğer memeli türlerinde pürülan enfeksiyonlardan ve ülseratif lenfanjitten izole edilmiştir. Bunun sonucunda, 1948’de Bergey’in El Kitabının Altıncı Baskısı’ nda, tür adı ovis olan bakteri psödotüberküloza dönüştürülmüştür. 1980'lere kadar *Corynebacterium pseudotuberculosis*, birçok yazar tarafından *C. ovis* olarak adlandırmaya devam etmesine rağmen günümüzde şuanki ismiyle kullanılmaya devam etmektedir (Baird ve Fontaine 2007).

Ülkemizde ise *C. pseudotuberculosis*’in kültürel yöntemlerle izolasyonu ve identifikasyonu, moleküler olarak teşhisi, antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi ve aşı çalışmaları gibi çalışmalar yapılmıştır (Çetinkaya ve ark. 2002, Sakmanoğlu ve ark. 2015, İlhan 2003).

Kars ilinde ise sığır ve koyun abort etkenlerinin taranması ve inek mastitislerinde tarama şeklinde çalışmalar yapılmıştır (Sağlam ve ark.1998, Gülmez Sağlam ve ark.2018). Kars ilinde yapılan bu çalışmalar cins düzeyinde olup günümüze kadar tür düzeyinde çalışma yapılmamıştır.

2.2. Genel Özellikleri

Corynebacterium cinsi, aynı zamanda *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* cinslerini de içeren supragenerik bir aktinomiset grubuna aittir. Coryneform grubu olarak adlandırılan *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* (CMNR) oldukça heterojen bir grup oluşturur ve türlerin çoğu belirli özellikleri paylaşır, örneğin: peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asitlerden oluşan büyük bir polimer kompleksinin varlığı ile karakterize edilen spesifik bir hücre duvarı organizasyonuna ve yüksek oranda G+C içeriğine sahiptirler (Dorella ve ark. 2006).

Corynebacterium pseudotuberculosis, fakültatif anaerobik, Gram pozitif, intraselüler, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz ve fimbriyalı patojen bir bakteridir (Schlicher ve ark 2021, Dopud ve ark. 2025). Hücre içi patojen olan *C. pseudotuberculosis* pleomorfik morfoloji gösterir ve “Çin harfi” deseni sergiler (Dopud ve ark. 2025). *C. pseudotuberculosis* öncelikle atlarda ve koyun, keçi gibi küçük geviş getiren hayvanlarda coğrafi farklılıklar ile hastalığa sebebiyet verir. Sığır, devegiller dahil olmak üzere, lamalar, bufalo, yabani geviş getiren hayvanlar ve nadiren de insanlar da enfeksiyon tablosu gösterebilirler (Schlicher ve ark. 2021).

Corynebacterium pseudotuberculosis, nitratı kullanma yeteneğine göre iki biovara ayrılır. Biovar ovis suşları nitrat negatif iken biovar equi suşları nitrat pozitif özellik gösterir. Nitrat pozitif özellik gösteren biovar ovis; koyun ve keçilerde, KLA' ya neden olurken, atlarda apse ve ülseratif lenfanjit ve mandalarda ödemli deri hastalığına neden olmaktadır. Bundan dolayı biyovarlar belirli bir konakçı için türe özgüllük göstermemektedirler (Schlicher ve ark. 2021).

2.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Fenotipik, Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri

2.3.1. Koloni Morfolojisi ve Üreme Özellikleri

Corynebacterium pseudotuberculosis hem aerobik hem de anaerobik koşullarda üreyebilir. 37°C'de koyun kanlı agarda 48-72 saatlik inkübasyonun ardından, etrafında ince bir β -hemoliz bölgesi bulunan küçük, beyaz, kuru kıvamlı, 1-2 mm çapında koloniler gözlenir (Baird ve Fontaine 2007, Dopud ve ark. 2025). Koloniler öze ile agar yüzeyi üzerinde kolayca hareket ettirilebilir. Bakteriyel üreme için besiyerine serum veya kan eklenmesi gerekmektedir (Baird ve Fontaine 2007). At kanlı agarda beta hemoliz oluşturur. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, modifiye Tinsdale besiyerinde üretildiğinde sistinaz aktivitesinden dolayı haleli kahverengi koloniler oluşturur (Bernard ve Funke 2015). *C. pseudotuberculosis* sıvı besiyerlerinde üretildiklerinde ise hücre duvarının dışında uzun zincirli 2-dallı 3-hidroksi yağ asitlerinin (mikolik asitler) varlığından dolayı kümeler oluştururlar (Baird ve Fontaine 2007).

2.3.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Mikroskopik Morfolojisi

Kolonilerden hazırlanan preparatların Gram boyaması yapıldığında Gram pozitif, $0,5-0,6 \times 1,0-3,0 \mu\text{m}$ çapında pleomorfik özellikte çomaklar ve metakromatik granüller gözlemlenmektedir (İpek ve ark. 2012, Bernard ve Funke 2015).

2.3.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Hücre Duvarı Yapısı

Corynebacterium pseudotuberculosis'in hücre duvarı peptidoglikan, lipidler, mezodiaminopimelik asit, arabinogalaktan ve mikolik asitlerden oluşan büyük bir polimer kompleksinden oluşur (Dorella ve ark. 2006, Dopud ve ark. 2025). Mikolik asidin balmumuyla kaplanması bakteriyi fagosit lizozomlarının enzimatik aktivitesinden korur ve apse oluşumuna yardımcı olur (Dopud ve ark. 2025).

Hücre duvarları arabinoz, galaktoz, glukoz, andmannoz ve mezo-DAP içerir. Menaquinone MK-8(H₂) mevcuttur. Tespit edilen polar lipidler arasında difosfatidilgliserol, fosfatidilinositol ve monoasilat fosfatidilinositoldimannosid bulunur. Hücresel yağ asitleri, sisteinaz üreten *Corynebacterium diphtheriae* ve *Corynebacterium ulcerans* türlerinde olduğu gibi, önemli miktarlarda C16:1 izomerine sahiptir (Bernard ve Funke 2015).

2.3.4. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Biyokimyasal Özellikleri

Glikoz, fruktoz, galaktoz, mannoz, maltoz, üreaz, metil kırmızısı ve katalaz pozitifler. Arabinoz, sakaroz, dekstrin, trehaloz, jelatin, nitrat indirgemesi ve nişasta hidrolizi için değişken özellik gösterirler. Ksiloz, ramnoz, laktoz, rafinoz, salisin, eskülin ve hippurat hidrolizi negatif özelliktedir. Tirozini hidrolize edemezler ve kazeini sindiremezler. Biyokimyasal özellikleri bakımından en çok *Corynebacterium ulcerans*'a benzemesine rağmen; nitrati indirgemesi ve nişasta, glikojen veya trehaloz ile negatif veya nadiren reaktif olmasıyla farklılık göstermektedir (Bernard ve Funke 2015, Dopud ve ark. 2025).

2.4. Epidemiyoloji

2.4.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Epidemiyolojisi

Corynebacterium pseudotuberculosis; küresel olarak, ekonomik kayıplara sebep olan kazeöz lenfadenitlere neden olması ve koyun keçi üretimini tehdit ettiği için sosyo-ekonomik öneme sahip bir patojendir. Yüksek morbidite ile yün miktar ve kalitesinde azalmaya, süt ve et değerlerinin düşmesine bağlı ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Birçok ülkede, küçükbaş hayvan ve koyun eti endüstrisini etkileyen önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Odhah ve ark. 2022). Ayrıca, zoonotik potansiyele sahiptir ve ilk insan enfeksiyonu vakası 1966 yılında bildirilmiştir (Lopez ve ark. 1966). Enfekte hayvanlarla yakın temas halinde olan bireyler için mesleki bir tehlike oluşturabilir (Kyselová ve ark. 2025).

Kazeöz lenfadenit olgusu gösteren sürülerde bakterinin ilaçlara zayıf yanıt vermesi, çevresel kalıcılık ve subklinik enfeksiyonların tanımlanmasındaki zorluk nedeniyle tedavisi zor olan endemik bir hastalıktır (Mustaffa ve ark. 2024). Klinik semptomlar gösterebilir ya da göstermezler, enfekte hayvanlar enfeksiyonun ana kaynağıdır (Dopud ve ark 2025). *Corynebacterium*'da bulaşma genellikle doğrudan veya dolaylı temas halinde gerçekleşmektedir. Enfekte hayvanların dışkıları, burun salgıları ve apselerin kendiliğinden boşalması sonucunda toprağı, suyu, yemi, meraları, taşıma ekipmanlarını ve tesisleri önemli miktarda canlı bakteri saçarak kontamine eder (Mustaffa ve ark. 2024, Dopud ve ark. 2025). Fiziksel temas ve çevresel kontaminasyon gibi doğrudan bulaşma yolları, etkenin sürüler içinde hızla yayılmasına katkıda bulunur (Kyselová ve ark. 2025). Bulaşma esas olarak yeni doğan hayvanlarda göbek deliğı, kastrasyon, kırkma, küpeleme ve kısırlaştırma gibi işlemler sırasında sıklıkla meydana gelen kesikler ve çizikler dahil olmak üzere deri yaralanmalarının kontaminasyonu sonucu gerçekleşir. Ayrıca, sürü içerisindeki temas ve diğer travmatik olayların yanı sıra metal plakalar, çiviler, tel örgüler ve dikenli teller gibi çevresel faktörler de hayvanların derisinde lezyonlara sebebiyet vererek bakterilerin vücuda girişı için imkan yaratabilir (Dopud ve ark 2025, Baird ve Fontaine 2007). Koyunlarda deneysel olarak yapılan çalışmalarda; *Corynebacterium pseudotuberculosis* etkeni intradermal, subkutan, intravenöz, intratrakeal, intravajinal ve intralenfatik yollarla hayvanlara verilmiş olup bu yollar aracılığıyla da hastalığın şekillendiğı belirtilmiştir (Burrell 1978, Pepin ve ark 1994, Fontaine ve ark 2006). Fakat, doğal enfeksiyonlarda, etkenin temel giriş yerinin deri olduğu belirtilmektedir (Baird ve Fontaine 2007).

Herhangi bir klinik belirti göstermeyen hayvanlar bile bakteriyi solunum sistemleri yoluyla yayabilir. O'Reilly ve arkadaşları 2008 yılında, *C. pseudotuberculosis*'in solunum yolu enfeksiyonu ve kendiliğinden akan apselerden gelen irin yoluyla bulaşma derecelerini değerlendirdikten sonra, akciğer apselerinin enfeksiyonun sürüde aktif kalmasında (endemik faz) daha önemli bir role sahip olduğunu bulmuşlardır. *C. pseudotuberculosis* taşıyan hayvanlar; solunum yollarında mikroorganizmaları bulundurabilir, bu nedenle solunan havaya aktarılabilir ve böylece

enfeksiyonu sürüdeki diğer hayvanlara aktarabilirler (Dopud ve ark. 2025). Genellikle küçük padoklarda bulunan yakın temas ve yetersiz havalandırma gibi koşullar, enfeksiyonun aerosoller yoluyla hızla yayılmasını kolaylaştırabilir ve potansiyel olarak birçok hayvanı etkileyebilir. Bu iddia, en yüksek KLA riski ile yetersiz ahır koşulları arasında güçlü bir korelasyon olduğunu belirten El Khalfaoui ve arkadaşları (2024) tarafından desteklenmiştir.

Spier ve arkadaşlarına (2004) göre, sinekler ve diğer böcekler olası hastalık vektörleri olarak kabul edilebilir. Elde edilen verilere göre, *C. pseudotuberculosis*'in, mekanik vektörler olarak kara sineklerin dış yüzeylerinde ve biyolojik vektörler olarak sinek bağırsaklarında ve dışkılarında bulunduğu görülmektedir.

Ektoparazitlerin kontrolü için kullanılan banyolar da bakterileri barındırabileceği için risk oluşturmaktadır. Ektoparazit tedavisi almadan sadece birkaç gün önce kırkılan koyunlar daha hassastır. Kırkım sırasında enfeksiyona tekrar tekrar maruz kalmaları nedeniyle, yaşlı bireyler gençlere göre daha hassastır (Dopud ve ark. 2025).

Corynebacterium pseudotuberculosis'in hayvanların altlıklarında kullanılan samanda üç hafta, samanda iki ay, kırkım ahırlarında dört ay, kesme tezgahlarında dört ay ve toprakta sekiz aya kadar hayatta kaldığı bildirilmiştir (Guimarães ve ark 2011, Mustaffa ve ark. 2024). Apse içeriğinde canlı halde bulunan bakterilerin dışarı atılımı sonucu kontamine olan malzemelerde kontaminasyondan sonra 55 güne kadar canlı kalabildiği bildirilmiştir. Batey 1986 yılında yaptığı bir çalışmada bir çiftlik ortamında, soğuk ve nemli koşullar altında mikroorganizmanın 6 ay veya daha uzun süre canlı kalabileceğini bildirmiştir. Yapılan bir diğer deneysel çalışmada ise apse içeriği ile kontamine edilmiş topraktan 8 ay sonra bile bakteri izole edilebilmiştir. Bu nedenle, enfekte bir koyun tarafından kontamine olan çevre, uzun bir süre bu durumda kalabilir (Baird ve Fontaine 2007).

Corynebacterium pseudotuberculosis'de bulaşma direkt temas, sindirim ve solunum yolu ile gerçekleşmektedir (Dopud ve ark. 2025). Zoonoz olduğu kabul edilen *C. pseudotuberculosis*'te insandan insana bulaşmaya rastlanılmamıştır.

2.4.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Bulaşmasında Etkili Olan Risk Faktörleri

Sürünün büyüklüğü ve sanitasyonu, KLA'nın yaygınlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Pioquinto ve ark. 2023). Enfeksiyonlara neden olabilecek ve hayvanların enfekte olma olasılığını artıracak diğer çevresel risk faktörleri arasında sivri çiviler, dikenli teller ve parçalanmış ahşap yer almaktadır (Williamson 2001, Çetinkaya ve ark. 2002). Büyük kapasiteye sahip sürülerde, alan için artan rekabet daha fazla hayvan etkileşimine yol açar ve bu da enfekte hayvanların hastalığının açık yaraları olan diğerlerine yayma riskini önemli ölçüde artırabilir. Buna ek olarak, duvarlara, borulara ya da sütunlara sürtünmenin KLA'nın gelişimiyle önemli ölçüde bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Yitagesu ve ark. 2020).

Küçükbaş hayvan yetiştirilen çiftliklerde dezenfeksiyon, KLA'nın yönetimi için önemli bir kriterdir. Çiftliklerin standart hijyen uygulamalarını ihmal etmelerinin KLA prevalansı ve yayılma riskini artırdığı vurgulanmıştır (Guimarães ve ark. 2011). Ayrıca, KLA'nın yayılmasıyla bağlantılı ana risk faktörleri arasında ahırlarda yetersiz havalandırma, eksik tedavi prosedürleri ve en çok genç hayvanların etkilendiği yer almaktadır (El Khalfaoui ve ark. 2024). Sürülerdeki koyunların yaş dağılımına bakıldığında, 6 ila 12 aylık olan genç koyunlarda yüzeysel KLA prevalansının daha yüksek olduğu görülmüştür. Genç koyunlarda KLA'ya karşı bağışıklık sistemlerinin gelişmemesi onları kontaminasyona karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Williamson 2001).

2.4.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Dünya'daki ve Türkiye'deki Prevalansı

Kazeöz lenfadenit prevalansının dünyanın küçükbaş hayvan yetiştirilen bölgelerinde genellikle oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, sadece birkaç ülke hastalığın yaygınlık oranlarını belirlemek için epidemiyolojik çalışmalar

yürütmüştür ve bu çalışmaların çoğu çiftlik ve mezbaha araştırmalarına dayanmaktadır (Baird 2003, Fontaine ve Baird 2008, Osman ve ark. 2018). Yüz yılı aşkın bir süredir varlığı bilinen KLA olgularına Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Orta Doğu, Amerika, İngiltere ve Avrupa'nın çoğu bölgesinde rastlanıldığı bildirilmiştir (Fontaine ve Baird 2008, Dercksen ve ark. 2000, Fontaine ve ark. 2006, O'Reilly ve ark. 2008, Radostits ve ark. 2007). Avustralya, Kanada, ABD, Brezilya, İran ve Mısır' da yapılan çalışmalar hastalığın %12,60 ile %61,00 arasında değişen yüksek bir prevalansa sahip olduğunu göstermiştir (Middleton ve ark. 1991, Arsenault ve ark. 2003, Stoops ve ark. 1984, Guimarães ve ark. 2011, Alves ve ark. 2020, Zavoshti ve ark. 2012, Al-Gaabary ve ark. 2009).

Binns ve arkadaşları (2002) Birleşik Krallık'ta 264 veteriner hekim ve 510 çiftçi ile anket yapmışlardır. Anket, veteriner hekimlerin yalnızca %18'inin en az bir hastalık vakasıyla karşılaştığını, çiftçilerin ise %45'inin koyunlarında apse gözlemlediğini ortaya koymuştur. Fakat laboratuvara numune gönderen 32 sürüden 24'ünde hastalık doğrulanmıştır.

Türkiye'de de yaygın olarak görülmesine rağmen KLA ihbarı mecburi hastalıklar sınıfına dahil edilmemiştir. Enfeksiyon kaynaklı verim kayıpları göz ardı edilmesi nedeniyle, hastalığın Türkiye'deki gerçek prevalansı hakkında net bir bilgi paylaşılmamıştır (Çetinkaya ve ark 2002). Türkiye'de 2020 yılında yapılan bir çalışmada Bigadiç Belediye Mezbahanesinden toplanan 67 adet koyun akciğer apse örneklerinden 16 adet (%23,8) *C. pseudotuberculosis* izole edilmiştir (İlhan 2020). Diyarbakır yöresindeki koyunlarda 2022 yılında yapılan bir çalışmada 90 adet apse içerikleri ve kan örnekleri alınmış, PCR analizlerine göre 26 (%28,9), ELISA analizlerine göre 17 (%18,9), bakteriyolojik kültürde ise 12 (%13,3) adet örnek *C. pseudotuberculosis* yönünden pozitif bulunmuştur (Yıldız ve İçen 2022).

2.5. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Klinik Semptomları

Corynebacterium pseudotuberculosis koyun, keçi, at, sığır ve bazen de insanları etkileyen çeşitli kronik hastalıkların etkenidir (Torky ve ark. 2023). *C. pseudotuberculosis*, koyun ve keçi gibi küçük ruminantlarda KLA etiyolojik ajanıdır. Bu enfeksiyon bazen pnömoni, hepatit, perikardit, mastit, artrit veya deri altı apseler şeklinde ortaya çıkar. Bu patojen aynı zamanda atlarda lenfadenit ve sığırlarda ülseratif lenfanjitte de neden olmaktadır (Torres ve ark. 2013). *C. pseudotuberculosis*'in nadiren de olsa geyik ve develerde de hastalık yaptığı bildirilmiştir (Bastos ve ark. 2012).

Corynebacterium pseudotuberculosis nitrata kullanma yeteneğine göre iki biyotipe ayrılır. Nitrat negatif suşlar serotip I (biyotip ovis) olarak adlandırılırken nitrat pozitif suşlar serotip II (biyotip equi) olarak adlandırılmaktadır. Koyun ve keçilerden elde edilen izolatlar genellikle nitrat negatifken atlardan, mandalardan ve develerden elde edilen suşlar tipik olarak nitrat pozitifdir; sığırlardan elde edilen izolatlar ise değişkendir (Torres ve ark. 2013, de Oliveira Zamproga ve ark. 2021).

Corynebacterium pseudotuberculosis biovar 1 (serotip 1, biyotip ovis) KLA'ya neden olur ve hastalık yüzeysel lenf düğümlerinde veya deri altı dokuda apse oluşumu ile karakterize dış form (yüzeysel veya kutanöz) ve mediastinal, bronşiyal ve lomber gibi dahili lenf düğümlerinde ve diğer organlarda apse oluşumu ile karakterize visseral form olmak üzere iki şekilde ortaya çıkar. Visseral formdaki bu lezyonlar genellikle akciğer olmak üzere karaciğer, böbrekler ve meme bezleri de dahil olmak üzere çok sayıda organda bulunabilir, ancak nadiren kalp, testisler, skrotum, uterus, eklemler, beyin ve omurilikte de görülebilir (Torky ve ark. 2023, Dopud ve ark.2025). Bu formlar aynı zamanda tek bir hayvanda bir arada bulunabilir (Dorella ve ark. 2006).

Yüzeysel formda apseler; deri altında, kapsüllü, görünür kitlelere dönüşen ayrı, katı, ağrısız şişliklerdir. Tipik olarak periferik bir lenf düğümünün içinde veya yakınında meydana gelirler. Bu lezyonlar birkaç ay hatta yıllarca sürebilir. Olgunluğa ulaştıktan sonra, bir fistül yoluyla hızla patlarlar ve bakteri içeren kalın, kokusuz, yeşilimsi beyaz, pürülan, soğan halkasına benzeyen olgun apseler meydana gelir (Torky ve ark. 2023,

Dopud ve ark.2025). Patlayan apseler mikrobun haftalarca veya aylarca yaşayabileceği çevreyi kontamine etmesine neden olur. Olgun apseler, enfeksiyonun tam olarak ortadan kaldırılamaması nedeniyle aynı hayvanda aylar veya yıllar sonra sıklıkla tekrarlar (Williamson 2001, Baird 2007, Guimaraes ve ark. 2011, Habte ve ark. 2023).

Corynebacterium pseudotuberculosis enfeksiyonu; submandibular, parotis, preskapular ve prefemoral gibi ana lenf nodüllerini, supramammary, inguinal ve en yaygın olarak da akciğer ve mediastinal lenf nodüllerinde ve diğer lenf nodüllerinde apse oluşumu ile karakterizedir (Fu ve ark. 2022, de Oliveira Zamprogna ve ark. 2021). Mikroorganizma, enfeksiyonun birincil bölgesinden hematojen yolla yayılabilir ve ilerleyen kilo kaybı nedeniyle organ apseleri ve bunun sonucunda “zayıf koyun sendromu” gelişebilir (de Oliveira Zamprogna ve ark.2021). KLA’nın kuluçka süresi 2 ila 6 ay arasında değişir ve bu süre zarfında klinik belirtiler belirgin olmayabilir. Klinik semptom görülmemesi de klinik teşhisi zorlaştırır (Kyselová ve ark. 2025). Etkilenen koyunlarda aralıklı ateş, yem alımında azalma, pürülan burun salgısı, öksürük ve uyuşukluk görülebilir, bu da kötü vücut kondisyonuna ve kilo kaybına neden olur (de Oliveira Zamprogna ve ark. 2021, Kyselová ve ark. 2025). Apseler solunumu veya yutkunmayı engellemediği sürece, bu hayvanlar hastalık belirtileri göstermez. Hastalığın visseral formu tanısal bir zorluk teşkil eder. Çünkü *C. pseudotuberculosis* organ enfeksiyonları erken tanı için görüntüleme (radyografi veya ultrasonografi) veya transtrakeal lavaj gerektirir. Klinik semptom görülmediğinden de fark edilmezler (de Oliveira Zamprogna ve ark. 2021).

Corynebacterium pseudotuberculosis pyogranülom oluşumu ile karakterizedir ve bu durumdan dolayı "kazeöz lenfadenit" olarak adlandırılmıştır (Baird ve Fontaine 2007). *C. pseudotuberculosis*, fakültatif hücre içi bir patojendir ve hücre duvarı mikolik asitlerinin sağladığı koruma nedeniyle fagositler içinde hayatta kalabilmektedir. Fosfolipaz D (PLD), vasküler endotel hücrelerinin geçirgenliğini artırır, doğal bağışıklık sisteminin tamamlayıcı yolunu aktive eder ve nötrofillerin kemotaksisini bozar. Enfeksiyonu takiben apseler oluşur, ancak ekzotoksin ve/veya proteaz olmadığında veya nötralize edildiğinde enfeksiyon lokalize kalır. Nötrofilik infiltrasyon

ve endotel hücrelerin hasarı erken değişiklikleri meydana getirir. Apseli lezyonlar oluşur. İrin, lezyonun süresine göre kremi ya da kuru ve ufalanan bir karakter gösterebilir. Eski apseleri, genellikle periferik nötrofiller, dev hücreler ve fibröz doku içeren ölü makrofajlar oluşturur. Oluşan lezyonlarda her zaman *C. pseudotuberculosis* bulunmaktadır (Nagaraja 2022).

2.6. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Patogenezi

En yaygın giriş yolu derideki çizikler ve kesiklerdir (Habuš ve ark. 2015). *C. pseudotuberculosis*, koyun ve keçilerde kırkım ve travma sonucu oluşan yara ve sıyrıklardan bulaşarak lenf yollarıyla tüm vücuda yayılmakta ve dolaşım sistemine geçtikten sonra lenf yumrusuna ve iç organlara yerleşim göstererek kazeöz lezyon oluşturmaktadır (Nagaraja 2022). Bakteri konağa girdiği anda, tetiklenen immünolojik yanıt nedeniyle lizozomlar bakteriyi fagosite etmeye başlar. Bakteri, mumsu mikolik asit kaplaması sayesinde lizozomların hidrolitik enzimlerinden korunur ve fagositozdan kurtulur, konak içinde fakültatif hücre içi parazit olarak varlığını sürdürür. Bakteri lenfatik drenaj yoluyla bölgesel lenf düğümlerine yayılır ve burada çoğalmaya devam ederek lizozomların parçalanmasına neden olur. Mikolik asit ve fagositizan; lökositlerde dejeneratif değişikliklere ve ölüme yol açarak apse oluşumuna katkıda bulunur (Baird ve Fontaine 2007, Guimaraes ve ark. 2011, Osman ve ark. 2018). İnflamasyon hücreleri, kapsülü periferik olarak geçerek bir supürasyon tabakası ve yeni bir kapsül oluşturur. Bakteri parçalanır, gevşer ve bir kez daha fagosite edilir (Nagaraja 2022). Konak hücre membranlarında tekrarlayan nekroz döngüsü nedeniyle dış kapsül yeniden oluşur (Baird ve Fontaine 2007). Bu kapsül, özellikle koyunlarda meydana gelen “soğan halkası” görünümünü oluşturur. Eskiye lezyonlarda kalın fibröz kapsüller meydana gelir. Koyun ve keçiler arasında apse içeriğinde farklılıklar bulunmaktadır. Koyunlarda, konsantrik lifli doku katmanlarının neden olduğu içerik, kesildiğinde laminar bir forma sahiptir. Keçilerde ise içerik kalın macunsu bir yapıya sahiptir (Nagaraja 2022). Vücuda girdikten sonra enfeksiyon oluşturma süresi 1 ile 4 gün arasında, girdiği bölgede nötrofillerin bölgeye yoğunlaşması ve etkenin pyogranuloma oluşturabilmesi 5 ile 10 gün arasında sürmektedir (Pépin ve ark. 1997, Bastos ve ark. 2012). Koyunlarda, KLA lezyonlarının

başlıca bulunduğu yer akciğer parankimi ve mediastinal lenf düğümleri olmasına rağmen; bu lezyonlara karaciğer, böbrekler, meme ve daha nadiren kalp, testis, skrotum, uterus, eklemler, beyin veya omurilikte de karşılaşılabilmektedir (Baird ve Fontaine 2007). Devam eden inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve artan kan damarı geçirgenliği sonucunda ikincil apseler oluşabilir (Dopud ve ark. 2025). Bu durum, bir diğer önemli virülans faktörü olan güçlü ekzotoksin fosfolipaz D'nin kan damarı duvarlarındaki sfingomiyelini parçalayarak geçirgenliğin artmasına ve bakterilerin dokulara yayılmasına katkıda bulunmasından kaynaklanmaktadır (Oliviera ve ark. 2017).

Fosfolipaz D ve diğer virülans faktörleri enfeksiyonun oluşumunda rol oynamasının yanı sıra, hastalığın sistemik seyre dönmesine de yardımcı olmaktadır. *C. pseudotuberculosis* fagositoz için nötrofil ve makrofaj tarafından yakalandıktan sonra fagolizom içerisinde canlılığını sürdürmektedir (Batey 1986). *C. pseudotuberculosis* hücre içi özellik göstermektedir ve makrofaj içerisine yerleşip 48 saatten fazla sürede canlılığını korumaktadır. *C. pseudotuberculosis*'in fagositler içerisinde yok edilememesinin nedeni hücre duvarında bulunan lipid tabakası sayesinde olduğu bildirilmiştir (Stefańska ve ark. 2010). Ayrıca *C. pseudotuberculosis*, difteri toksini (DT) üretebilen veteriner hekimlik ve tıbbi öneme sahip türleri de içeren “*Corynebacterium diphtheriae* kompleksi” olarak bilinen bakteri grubuna dahildir ve insanlar için ölümcül olan difteri hastalığında bir beta-korynebakteriyofaj kullanarak difteri toksin genini kodlayarak DT'yi indükleyebilir. Bununla birlikte, bu türün toksini üretebilen çok sayıda suşu bulunmamaktadır (Schlicher ve ark. 2021, Nascimento Sousa ve ark. 2024).

2.7. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Virülans Faktörleri

Corynebacterium pseudotuberculosis; fakültatif hücre içi bir patojendir. Fosfolipaz D (PLD) ve hücre duvarının mikolik asitleri patogeneizde önemli rol oynayan iki virülans faktörüdür. Her iki faktörde mikroorganizmanın fagositozdan kaçma ve makrofajlar içinde çoğalma yeteneğini geliştirmektedir. Mikolik asit sonucu oluşan mumsu kaplama mikroorganizmanın çevre koşullarına karşı korunmasına katkıda bulunur. Virülans üzerine etkili olduğu düşünülen 40 kDa proteaz enzimidir. *C.*

pseudotuberculosis'in bazı suşları, tox genini taşıyan lizojenik profajı olarak difteri toksini üretirler (Nagaraja 2022).

2.7.1. Fosfolipaz D (PLD)

Fosfolipaz D korynefajı bulundurma ve difteri toksini aktarmanın yanı sıra; koyun ve keçilerde kazeöz lenfadenite neden olan mikroorganizma olan *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in önemli bir virülans faktörüdür. PLD'nin varlığı, Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) reaksiyonu ile tespit edilebilir. PLD düzenlemesi ve ekspresyonunun, bakterinin enfeksiyon bölgesinden lenf düğümlerine yayılmasına yardımcı olmayı ve ardından makrofaj canlılığını azaltmayı içeren karmaşık bir yol olduğu belirtilmiştir (Bernard ve Funke 2015).

PLD, sfingomyelinin kolin ve seramid fosfat parçalanmasına yardımcı olan sfingomyeline özgü bir fosfolipaz olarak tanımlanır. PLD, gliserofosfolipidlerdeki ester bağlarını hidrolize edebilme yeteneği göstermektedir. PLD deki D harfi, hedeflenen veya ayrılan spesifik ester bağına gösterir. *C. pseudotuberculosis* PLD geni üretilmiş ve sekanslanmıştır. PLD'nin, yaklaşık 31.4 kDa'lık bir proteini kodladığını ve ardından 2.7 kDa'lık olası bir salgılama sinyali dizisinin geldiğini ortaya çıkarmıştır (Baird ve Fontaine, 2007). Genel olarak, bir enzim olan fosfolipaz, ökaryotlarda hücre zarının korunmasında ve sinyal iletiminde önemli bir rol alır (Odah ve ark. 2022). PLD, ilk olarak Carne tarafından 1940 yılında var olduğu iddia edilmiştir (Baird ve Fontaine 2007). 1981 yılında, Barksdale ve arkadaşları *C. pseudotuberculosis*'ten PLD'yi tanımlamışlardır. Daha sonra, *C. pseudotuberculosis* ile enfekte olmuş tüm memeli türlerinde bulunmuştur. PLD'nin enfekte koyunların lenf düğümlerinde apse oluşumuna neden olamayacakları fakat *C. pseudotuberculosis* izolatlarında PLD'yi kodlayan PLD genlerinin var olması PLD'nin bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur (Odah ve ark. 2022). PLD, laboratuvar denemelerinde keçi makrofajlarını yok ettiği için aktyuvarlar için sitotoksik bir ekzotoksin olarak kabul edilir. PLD geni tarafından kodlanan enzim veya ekzotoksin, seramid fosfat ve kolin üretmek için konakçı hücre

zarlarındaki sfingomyelinin ester bağlarını hidrolize eder (Nagaraja 2022). Bakterilerin bu ekzotoksinleri, patojenin sistemik yayılmasını destekleyen bir geçirgenlik faktörü olarak rol oynar (Odah ve ark. 2022). PLD'nin diğer biyolojik aktiviteleri ise vasküler endotelial hücre zarı geçirgenliğini artırmak, koyun ve sığır eritrositlerini parçalamak, hücre dışı bir *Rhodococcus* eş faktörünün varlığında eritrositlerin sinerjistik parçalanmasını artırmak, eritrositlerin stafilokok beta hemolizin kaynaklı parçalanmasının engellemektir (Nagaraja 2022). PLD, endotel hücrelerin nekrozuna neden olarak *C. pseudotuberculosis* kılcal damarlara geçişini kolaylaştırır ve böylece lenfatik damarlara giriş gerçekleşir (Odah ve ark. 2022). PLD, nötrofillerin kemotaksisini bozar ve bunun sonucunda fagositozdan kaçarak *C. pseudotuberculosis*'in yerleşmesine yardımcı olur (Nagaraja 2022). Makrofaj hücrelerinin iç yüzeyinde de PLD bulunduğu söylenmiş ve bu yüzden *C. pseudotuberculosis*'in makrofaj hücrelerinden kaçtığı bildirilmiştir. PLD ile benzerlik gösteren ekzotoksinlerin, diğer bakteriyel patojenler için önemli virülans faktörleri olduğu bilinmektedir. Örneğin, *C. pseudotuberculosis* PLD ile insan difterisine neden olan *C. ulcerans*'in aktif ekzotoksini arasında %97 benzerlik bulunmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın önemli bir virülans faktöründe PLD benzeri bir ekzotoksinin olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde; vebaya neden olan *Yersinia pestis*' in ymt genide PLD'ye benzerlik göstermektedir. PLD ayrıca, zehirli Kuzey Amerika kahverengi münzevi örümceği *Loxosceles reclusa* tarafından üretilen bir enzim toksinine yapı ve biyolojik açıdan önemli derecede bir benzerlik göstermektedir (Baird ve Fontaine, 2007). PLD geni bulundurmayanlar, koyunlarda lenf nodülü apselerini oluşturamaz ve PLD'ye karşı verilen antitoksin, enfeksiyonun yayılmasını engeller (Nagaraja 2022).

2.7.2. Mikolik Asit

Mikolik asitlerin kimyasal yapısına ilk olarak 1950'de bakılmıştır. Mikolik asitler 3-hidroksil moleküllerinden oluşur ve bu moleküller, aşırı sıcaklıkta ters Claisen tipi yoğunlaşmaya benzer bir reaksiyonla "meromikolik zincir" olarak da adlandırılan bir "mero" aldehit ana zincirine ayrılma özelliğini kazandırır. Yapılan çalışmalarda,

Mycobacteria dışındaki cinslerin mikolik asit yapılarının, kimyasal fonksiyonlar açısından nispeten basit olduğu, yalnızca çeşitli sayıda çift bağ içeren homolog bir seriden oluştuğu ve *Tsukamurella* türleri için bu bağların 6'ya kadar olduğu bildirilmiştir (Odah ve ark. 2022).

Corynebacterium pseudotuberculosis'in hücre duvarı yüzeyi mikolik asit kaplı olmasına rağmen mikolik asit tabakası koruyucu kapsül üretmez (Baird ve Fontaine 2007). Mikolik asitler, bakteri hücre duvarını dış saldırılara karşı koruyan karmaşık bir yapıya sahiptir. Mikolik asitler, gliserol gibi organik çözücüler kullanılarak ya da arabinogalaktanın terminal Penta-arabinofuranosillerin esterleştirilmesiyle ekstrakte edilebilir (Odah ve ark. 2022).

Mikolik asit tabakası, sitotoksik özelliğinden dolayı patojenitede önemli rol oynamaktadır (Hard 1972). *C. pseudotuberculosis*'ten elde edilen mikolik asidin farelere deri altı uygulaması sonucunda, farelerde damarlarda tıkanıklık ve merkezi bir hemorajik nekroz alanı ile birlikte lokalize bir şişlik oluşması gözlenmiştir. Mikolik asit, fagositoz yapan lökositlerde dejeneratif değişikliklere uğramasına ve bunun sonucunda da hücrelerin ölümüne neden olur. Mikobakterilerden elde edilen mikolik asitin enjeksiyonu öldürücü olabilmesine rağmen, *C. pseudotuberculosis*'den elde edilen mikolik asidin öldürücü etkisi olmayıp, enjeksiyon bölgesinde sitotoksik etki gösterir (Baird ve Fontaine, 2007). *Corynebacterium*'un mutant suşlarında mikolik asitler bulunmamaktadır (Odah ve ark. 2022).

Aktinomiset ailesi üyelerinin ortak özelliği olan ve *C. pseudotuberculosis*'te de bulunan mikolik asitin, çevre şartlarına karşı uzun süre boyunca etkeni korumaktadır. Mikolik asit tabakası *C. pseudotuberculosis*'i, lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimlere karşı mekanik ve biyokimyasal koruma sağlar. Bu da bakterinin fagositozdan kaçmasını ve konakçıda fakültatif bir hücre içi parazit olarak kalmasına yardımcı olur. Bu nedenle bakterinin vücuda ilk giriş noktasından lezyon oluşan bölgeye gitmesine kadar hiçbir engelle karşılaşmamış olur. Mikolik asidin toksik doğası nedeniyle apse oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Baird ve Fontaine 2007).

2.7.3. Diğer Virölans Faktörleri

Virölans faktörleri, patojen bakterilerin yapışması, kolonizasyonu, konakçı içinde yayılması ve bağışıklık sisteminden kaçmasında önemli bir rol oynar; ayrıca konakçı içinde temas, penetrasyon ve hayatta kalmayı sağlarlar (Soares ve ark. 2013).

Demir alım gen bölgesi olarak adlandırılan fagABC operonu ve fagD geni, PLD geninin yapısında bulunan bir gen bölgesidir ve bakterinin demirin az olduğu ortamlarda hayatta kalmasını sağlayarak virölans rol oynadığı belirtilmiştir (Soares ve ark. 2013, Nagaraja 2022). Bu önemli virölans faktörleri arasında integral membran proteini (FagA), demir enterobaktin taşıyıcısı (FagB), ATP bağlayıcı sitoplazmik membran proteini (FagC) ve demir siderofor bağlayıcı protein (FagD) yer alır. Bunlar, keçilerdeki enfeksiyonlarda *C. pseudotuberculosis*'e kalıcılık sağlayan demir alımıyla ilgili bir operonda düzenlenir. Bu operon, PLD geninin aşağısında bulunur ve *C. pseudotuberculosis*'in virölansına katkı sağlar. Bu genler nadiren in vitro olarak aktarılır, ama in vivo olarak aktarıldıklarında *C. pseudotuberculosis*'in virölansını arttırmaları ki bu da bu genlerin aktarılması için konak faktörlerinin gerekli olabileceğini gösterir. PLD ve Fag genlerinin bakteriye özgü olması ve konakçı içinde çoğalma ve hayatta kalma yetenekleri nedeni ile bu genlerin canlı aşı üretimi için değerlendirilebileceği düşünülmektedir (Aquino de Sá ve ark. 2013).

Yapılan diğer çalışmalarda ise oligopeptid permease (*Opp*), pili tip protein C (*Spa C*), nöromidinase (*NanH*), süperoksit dismutase (*SodC*), sigma faktör E (SigE), nöroaminidaz (*NanH*), bakır direnci proteini (*CopC*), glutaredoksin benzeri protein (*NrdH*), pilus birleşme proteini (*CpaE*) ve Protein Kinaz C (*PknG*) genlerinin de potansiyel virölans faktörleri olabileceği düşünülmektedir (Li ve ark. 2018, Pathirana ve ark. 2022).

2.8. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Teşhisi

2.8.1. Bakteriyoskopi

Apseden, irinli ve etkilenen dokulardan hazırlanan preparatların gram boyanması sonucu *Corynebacterium*'ların "çin harflerine" benzer küçük, gram pozitif, çomak şekilli pleomorfik çubukların varlığı gözlemlenebilmektedir (Carter 1990, İpek ve ark 2012).

2.8.2. İzolasyon ve İdentifikasyon

Corynebacterium pseudotuberculosis'in teşhisinde kültür altın standart olarak kabul edilir. *Corynebacterium* türlerini izolasyonunda %5 Koyun Kanlı Agar, Sistin-Tellürit Kanlı agar (CTBA), Tinsdale agar, Loeffler's serum besiyeri, At Kanlı Agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır (Akbaş 2014, Bernard ve Funke 2015). Kullanılan besiyerlerine ait bilgiler Tablo 1'de sunuldu.

Tablo 1: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in izolasyonunda kullanılan besiyerleri (Akbaş 2014, Bernard ve Funke 2015)

İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri	Koloni Görünümü
%5 Koyun Kanlı Agar	Kültür için temel besiyeridir. 24 saat inkübasyondan sonra, sarımsı küçük koloniler oluşup 48 saat sonra 1-2 mm çapına ulaşabilirler.
Sistin-Tellürit Kanlı agar (CTBA)	Siyah koloni oluştururlar.
Tinsdale agar	<i>Corynebacterium</i> türleri 24 saatlik inkübasyonun ardından sistinaz aktivitesi göstererek kahverengi hale ile çevrili siyah koloniler meydana getirirler.
Loeffler's serum besiyeri	Mikroskopik morfolojiyi görebilmek amacıyla kullanılan besiyeridir.
At Kanlı Agar	Hemolizi gösteren bir besiyeridir

Etken %5 Koyun Kanlı Agarda, 37 °C de aerobik ya da anaerobik ortamda soluk renkli, kuru koloniler oluşturur ve koloniler öze ile agar yüzeyi üzerinde kolayca hareket ettirilebilir. 24 saat inkübasyondan sonra, sarımsı küçük koloniler oluşup 48 saat sonra 1-2 mm çapına ulaşabilirler. Üreme için besiyerine serum veya kan eklenmesi

gerekmektedir (Baird ve Fontaine, 2007). At Kanlı agarda beta hemoliz oluşturur. *C. pseudotuberculosis*, modifiye Tinsdale besiyerinde üretildiğinde sistinaz aktivitesinden dolayı haleli kahverengi koloniler oluşturur (Bernard ve Funke 2015). Kolonilerden hazırlanan preparatların Gram boyaması yapıldığında Gram pozitif, $0,5-0,6 \times 1,0-3,0$ µm çapında pleomorfik özellikte çomaklar ve metakromatik granüller gözlemlenmektedir (İpek ve ark 2012, Bernard ve Funke 2015). Glikoz, fruktoz, galaktoz, mannoz, maltoz, üreaz ve metil kırmızısı pozitifler. Arabinoz, sakaroz, dekstrin, trehaloz, jelatin, nitrat indirgemesi ve nişasta hidrolizi için değişken özellik gösterirler. Ksiloz, ramnoz, laktoz, rafinoz, salisin, eskülin ve hippurat hidrolizi negatif özelliktedir. Tirozini hidrolize edemezler ve kazeini sindiremezler. Biyokimyasal özellikleri bakımından en çok *C. ulcerans*'a benzemesine rağmen; nitratı indirgemesi ve nişasta, glikojen veya trehaloz ile negatif veya nadiren reaktif olmasıyla farklılık göstermektedir (Bernard ve Funke 2015).

2.8.3. Reverse CAMP testi

Çeşitli bakterilerin identifikasyonu amacıyla kullanılan CAMP testi bakterilerin oluşturduğu enzim etkinliği sonucu sinerjik veya antisinerjik etkileşimi belirlemektedir. Bu testin *C. pseudotuberculosis*'in identifikasyonu için de kullanıldığı bildirilmiştir. *C. pseudotuberculosis*'in sentezlediği PLD enzimi ile *Staphylococcus aureus*'un sentezlediği β-hemolizin ve *Rhodococcus equi*'nin sentezlediği fosfolipaz C enzimleri arasındaki ilişki Reverse CAMP test ile gösterilmektedir. *C. pseudotuberculosis*'in PLD enzim etkinliği, *R. equi*'nin sentezlediği fosfolipaz C enzimi ile sinerjik etki sonucu artarken, *S. aureus*'in sentezlediği stafilokokal β-hemolizin ile antisinerjik olarak azalmaktadır (Cuevas ve Songer 1993, El Tawab ve ark. 2019).

2.8.4. Serolojik Teşhis

Corynebacterium pseudotuberculosis'in serolojik teşhisinde indirekt hemagglütinasyon, komplement fiksasyonu, agar immünodifüzyon, sinerjistik hemoliz

inhibisyon, dot blot ve ELISA gibi testler kullanılmaktadır (Bastos ve ark. 2012, Menzies ve ark. 1994, Citartan 2021).

Dot blot testi, hücre membranı yüzeyinde immobilize edilmiş iki protein molekülü arasındaki etkileşimi araştıran hızlı, basit, ucuz ve antikor-antijen etkileşimini ölçen bir testtir. Western blot testi, antikor-antijen etkileşimlerini de incelerken, proteinlerin ilgili moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını da gerektirir. Bu işlem, çok zaman alıcı olabilir ve yüksek verimli bir analiz için daha az tercih edilen bir yöntemdir (Citartan 2021).

Agar İmmunodifüzyon Testi; vücuda giren enfeksiyöz ajanlara karşı hastalık yapma yeteneğini ortadan kaldıran nötralizan antikorların tespit edildiği bir testtir. Bu test sadece virüslara özgü olmayıp toksin ve enzimler için de uygulanabilir. Nötralizasyon testi hem antijenlerin (virüslerin) ve hem de spesifik nötralizan antikorların belirlenmesinde kullanılabilir. Sinerjistik hemoliz inhibisyon testi; PLD enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir testtir. *C. pseudotuberculosis* PLD enzim aktivitesi sayesinde *R. equi* ile sinerjistik hemoliz oluştururken *S. aureus* ile antagonistik hemoliz oluşturmaktadır (Sakmanoğlu ve ark. 2015).

Etkenin teşhisinde ELISA umut vaat eden bir testtir. Başlangıçta KLA' nın teşhis ELISA'larında antijen olarak ham *C. pseudotuberculosis* hücre duvarı preparatları veya süpernatant türetilmiş ekzotoksin kullanıldı. Test duyarlılığı genellikle iyi olarak kabul edilmektedir. Fakat antijen preparasyonlarında bulunan diğer proteinlerle çapraz reaksiyonlar nedeniyle özgüllük nispeten zayıftır. Bununla birlikte, bazı ELISA'ların saha teşhisi için yeterince spesifik ve duyarlı olduğu bildirilmiştir (Baird ve Fontaine, 2007). ELISA, PLD genini taşıyan bir plazmit içeren *Escherichia coli*'den rekombinant teknolojiyle türetilen bir PLD antijenine dayanmaktadır ve %86,3'lük bir test hassasiyeti ile %82,1'lik bir özgüllük rapor edilmiştir (Menzies ve ark. 1994). Yakalama antikoru olarak kullanılan poliklonal tavşan anti-PLD serumu olan *C. pseudotuberculosis* kültürünün süpernatantından saflaştırılan PLD ekzotoksine dayanan çift antikorlu sandviç ELISA yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin koyunlarda %99+1 özgüllüğe ve %79+5

duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir (Baird ve Fontaine, 2007). Hücre aracılı bağışıklığın bir belirteci olarak gamma interferon'u (IFN- γ) tespit etmek için bir ELISA testi geliştirilmiştir ve kontrol ve eradikasyon programlarında etkili olduğu bildirilmiştir (Nagaraja 2022).

2.8.5.Moleküler Teşhis

Türü doğrulamak ve diğer *Corynebacterium* türlerinden ayırt etmek için; 16S rDNA, rpoB (RNA polimeraz β -alt birimi için kodlar) ve pld genlerini hedefleyen bir multipleks PCR testi kullanılabilmektedir (Nagaraja 2022).

Corynebacterium pseudotuberculosis, nitrata nitrite dönüştürme yeteneklerine göre iki biovarda sınıflandırılabilir; nitrat pozitif suşlar biovar equi ve nitrat negatif olanlar biovar ovis olarak sınıflandırılır. *C. pseudotuberculosis* biovarlarını birbirinden ayıran baskın bir genetik özellik, biovar equi suşlarında nitrat indirgeme operonunun varlığıdır. Ek olarak, biovar equi suşları, narKGHJI operonu ve molibdopterinler moeB, moaE, molB, molA, moeY, moaC, moeA ve moaA ile iki varsayımsal proteini kodlayan bir gen kümesi de dahil olmak üzere biovar ovis suşlarında bulunmayan 15 gene sahiptir. Biovar equinin teşhisi için *C. pseudotuberculosis* biovar equi suşlarında bulunan narG gen bölgesi moleküler yönden tespit edilmektedir (Almeida ve ark. 2017). *C. pseudotuberculosis*'in teşhisinde kullanılan bir diğer gen bölgesi ise patojenite adacıklarında bulunan PIP gen bölgesidir (D'Afonseca ve ark. 2010, Parin ve ark. 2018).

2.8.6. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in 16S rRNA Sekansı

16S rRNA sekanslama çalışmaları, *Corynebacterium* cinsinin intrajenerik taksonomisi ve *Dietzia*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* ve *Turicella* gibi yakın ilişkili mikolik asit içeren cinsler arasındaki ilişkiler ortaya koymuştur. *Corynebacterium* türlerinin 16S rRNA dizilerinin belirlenmesi tamamlanmış ve verilerden filogenetik ilişkiler de çıkarılmıştır. 16S rRNA sekansı, *Corynebacterium* türlerinin kesin olarak tanımlanması için temel bilgiler sağlar (Pascual ve ark. 1995).

2.9. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Tedavisi

Beta-laktamlara (seftiofur dahil), eritromisin, kloramfenikol, lincomycin, tetrasiklin, enrofloksasin ve trimetoprim-sulfonamide duyarlı iken aminoglikozidlere dirençli bir mikroorganizmadır. Genellikle, kazeöz lenfadenit apseleri, kalın kapsüllenme nedeniyle antibiyotik tedavisine direnç gösterirler. Koyun, keçi ve atlarda, uzun süreli (dört ila altı hafta) sistemik antibiyotik (penisilinler veya eritromisin, genellikle yağda çözünen rifampin ile kombinasyon halinde) tedavisi, iç apselerin tedavisinde ve dış apselerin cerrahi müdahale ile uzaklaştırma sonrası tekrarlama şansını azaltmada etkili olmaktadır (Nagaraja 2022, Baird ve Fontaine 2007).

Yapılan bir çalışmada 3 günlük aralıklarla oksitetrasiklin depo formülasyonu enjeksiyonuyla birlikte, 10 günlük bir süre boyunca günde iki kez rifamisin tedavisi uygulanmış ve bu uygulama etkilenen koyunların dış lenf düğümlerindeki KLA lezyonlarının boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir. Fakat, tedavi sonrası nekropsi yapılmadığı için koyunların ne kadar süreyle hastalıksız kaldığı belirlenememiştir (Baird ve Fontaine 2007). Türkiye de yapılan bir çalışmada 14 (%87,5) *C. pseudotuberculosis* izolatu enrofloksasine, 13 (%81,2) izolat neomisin/basitrasin/tetrasikline, 12 (%75,0) izolat penisilin/novobiyosine, 11 (%68,7) izolat oksitetrasikline, 11 (%68 7) izolat amoksisilin/klavulanik aside, 10 (%62,5) izolat kloksasiline, 9 (%56,2) izolat tetrasikline, 5 (%31,2) izolat ampisilin/sulbaktama ve 3 (%18,7) izolat trimetoprim/sülfametoksazole duyarlı bulunmasına rağmen izolatların tümü streptomisine dirençli bulunmuştur (İlhan 2020).

2.10. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'te Koruma ve Kontrol

Enfekte veya apseli hayvanların sürüye girişi enfeksiyonun birincil kaynağıdır ve iki ile üç yıl içinde apse prevalansı önemli ölçüde artar. Bu nedenle kontrol programları, sürüdeki tüm hayvanların düzenli klinik muayenelerini ve periyodik olarak serolojik testlerin yapılmasını içermelidir. Klinik semptomlar gösteren veya serolojik olarak

pozitif tespit edilen hayvanlar sağlıklı olanlardan ayrılmalı ve itlaf edilmelidir. Çünkü sürüye bir kez hastalık girdiğinde diğer hayvanlara bulaşması olağandır (Guimaraes ve ark. 2009, Windsor 2011, Baazizi ve ark. 2024).

Voigt ve arkadaşlarına (2012) göre, her üç ayda bir kan testleri yapılarak ve kültür veya seropozitifliği pozitif çıkan hayvanlar sürüden ayrılarak sürü seropozitifliğinin sadece iki yıl içinde %10'dan %0,4'e düştüğü bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu tür bir prosedürün yüksek masraflar, test verimliliğini ve ekonomik sonuçları etkileyebilecek yanlış pozitif ve negatifler gibi zorluklar da dahil olmak üzere birçok dezavantajı bulunmaktadır (Gascoigne ve ark. 2020).

Bir sürüdeki KLA tedavisinin antibiyotik tedavisine dirençli olduğu için ortadan kaldırılmasının zor olduğu kanıtlanmıştır. Hastalıklı koyun ve keçiler antibiyotik kullanılarak başarılı bir şekilde tedavi edilmesine rağmen, bu strateji normalde KLA'yı kontrol altına almak için uygun bir strateji olarak kabul edilmemektedir (Dorella ve ark. 2009). Düz tel çitlerin kullanılması, aletlerin ve kırkım ekipmanının sterilize edilmesi, tek kullanımlık iğneler, böcek kontrolü ve yaraların %10 iyot ile dezenfekte edilmesi gibi çevresel yaralanmalara karşı önlemler alınmalıdır. Çiftlikler %10 formaldehit ile dezenfekte edilmelidir (Williamson 2001, Baird ve Fontaine 2007). Ayrıca, KLA'nın bulaşma riskini azaltmak için genç, yeni kırılmış koyunların izole edilmesi, önce genç koyunların kırılması, kırkım sonrası yapağının uzama süresinin en aza indirilmesi ve ektoparazit banyolarının azaltılması önerilmektedir (Windsor 2011). Enfekte hayvanların tespiti/izolasyonu ile birlikte aşılanmanın bu hastalığı kontrol altına almak için en güvenilir strateji olduğu konusunda bir fikir birliği vardır. Bu önlemlerin yanı sıra lezyonlu veya teşhis amacıyla yapılan testlerde pozitif çıkan hayvanların itlaf edilmesi gibi daha sert önlemler önerilmektedir. Fakat testlerin yanlış pozitif sonuçlara yol açarak enfekte olmayan hayvanlarında itlaf edildiği göz önünde bulundurulmalıdır. Endemik bölgelerde hem seropozitif hem de seronegatif hayvanların itlaf edilmesinin yararlı olabileceği düşünülmektedir. Bu radikal önlemler genellikle etkisiz olduğundan, hastalığın kontrolü, yayılmasını önlemek için damızlık kontaminasyonunu önleyen stratejilere dayanmalıdır. Daha iyi tespit yöntemlerinin ve daha etkili aşı

formülasyonlarının koruma ve kontrole karşı daha etkili olacağı düşünülmektedir (Dorella ve ark. 2009). Aşılama hastalığı tamamen ortadan kaldırmasa da enfeksiyonun yayılmasını yavaşlatır ve hastalık prevalansında kademeli bir düşüşe neden olur (Windsor ve Bush 2016). Bu nedenle, hayvanların düzenli olarak aşılınması, bakteri yükünü azaltmak ve yaşlı enfekte hayvanlar itlaf edilirken genç hayvanları korumak için gereklidir. Ayrıca, aşılarda koyun ve keçiler arasında etkinlik açısından farklılık gösterdiği ve özel aşılama programları gerektirdiği de unutulmamalıdır (Windsor 2011, Burmahan ve Brundage 2021).

Corynebacterium pseudotuberculosis, fakültatif hücre içi bir bakteri olup KLA'ya sebebiyet vermektedir. Bu yüzden ideal aşının hem hücresel hem de humoral bağışıklığı uyarması gerekmektedir (Bastos ve ark. 2012). Kullanılan ticari KLA aşı teknolojisi, toksoidler, bakterin ve canlı zayıflatılmış bakteriler gibi geleneksel aşılama yöntemlerine dayanmaktadır (Eggleton ve ark. 1991, Piontkowski ve Shivvers 1998). Ancak son yıllarda, KLA aşılarının etkinliğini ve güvenliğini artırmayı amaçlayan modern stratejiler deneysel düzeyde test edilmeye başlandı. Uygun bağışıklık ve yüksek koruma sağlamak amacıyla alt birim rekombinant, DNA ve vektör aşıları test edilmiştir (Brum ve ark. 2017, Leal ve ark. 2018, Rezende ve ark. 2016). Araştırmacıların çoğu, IgG ve interferon alfa'yı kaliteli KLA aşıları için immünolojik belirteçler olarak kullanmaktadır (Bastos ve ark. 2012).

Ticari aşılarda çoğu, *Clostridium* (*Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi*, *Clostridium chauvoei* ve *Clostridium septicum*) patojenlerinden inaktive edilmiş ve *C. pseudotuberculosis*'in PLD geni ile formüle edilmiş çok amaçlı toksoid aşılardır (Dorella ve ark. 2006). Kombine aşılarda uygulandığı sürülerde etkenin saçılımının azaldığı ve hayvanlarda bulunan apse büyüklüklerinin ve de apse sayılarının düştüğü bildirilmiştir (Paton ve ark. 2003, Williamson 2001).

Ticari aşılarda yıllardır kullanımda olmasına rağmen hiçbir KLA'ya karşı tam koruma sağlayamamaktadır. Sağladıkları bağışıklık genellikle yetersiz ve sadece kısmen etkilidir, keçiler ve koyunlar arasında farklılık gösterir. Ayrıca, ateş, uyuşukluk,

enjeksiyon bölgesi enfeksiyonları veya apseler ve süt üretiminde azalma gibi yan etkiler bildirildiği için güvenlikleri tartışmalıdır (Dorella ve ark. 2006, Ribeiro ve ark. 2014, de Pinho ve ark. 2021).

Ülkemizde de *C. pseudotuberculosis*'e karşı farelerde ve koyunlarda inaktif aşı çalışmaları yapılmıştır (Erganiş ve ark. 2014).

Sonuç olarak, KLA bir kez ortaya çıktığında, sürü içinde hızla yayılması ve enfekte bireylerin rezervuar olarak yerleşmesi nedeniyle kontrol edilmesi ve ortadan kaldırılması zordur. Hastalık kontrolü için en etkili strateji olarak enfekte bireylerin belirlenmesi ve izole edilmesi veya itlaf edilmesi ile birlikte sağlıklı hayvanların aşılanması olduğu belirtilmektedir (Habte 2023).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma İzni

Çalışmanın izinleri; Kars Tarım ve Orman Müdürlüğü'nün, 03.10.2023 tarih ve E-52516679-125.99-11477779 sayılı yazısıyla ve Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 03.10.2023 tarih ve KAÜ-HADYEK- 2023/120 sayılı karar ile onaylandı.

3.1.2. Çalışma Planı ve Örnek Materyalinin Toplanması

Çalışma, Eylül 2023-Haziran 2024 tarihleri arasında gerçekleştirilen prospektif gözlemsel ve tanımlayıcı epidemiyolojik bir çalışma şeklindedir. Çalışma evrenini koyunculuk işletmelerindeki kazeöz lenfadenitli (KLA) koyunlar oluşturdu. Çalışma materyalini, evreni temsilen örneklenen 105 adet koyuna ait apse içeriği örnekleri oluşturdu. Çalışmanın örnek hacmi GPower 3.1.7.9 programı ile, testin gücü “0.99”, hata payı (alfa) “0,05” ve etki büyüklüğü “0,5” alınarak toplam 95 olarak belirlendi.

Çalışmada, Kars Merkez ilçe dahil Sarıkamış, Arpaçay, Akyaka, Digor ve Kağızman olmak üzere 6 ilçeden 18 köye ait 23 koyunculuk işletmesinden toplam 105 adet apse içeriği örneği toplandı (Tablo 2). Numune alım sırasında çekilen fotoğraflardan bazıları Resim 1’de gösterilmiştir.



Resim 1: Kazeöz lenfadenit olgularından numune alımı

Tablo 2: Çalışmaya ait apse içeriği örneklerinin lokasyon, köy ve işletme bazlı dağılımı

İlçe (n: 6)	Köy (n: 18)	İşletme Sayısı (n: 23)	Numune Sayısı (n: 105)
Merkez (n: 23 Numune)	Başkaya	3	9
	Hapanlı	1	4
	Esenkent	1	5
	Büyük Aküzüm	1	5
Sarıkamış (n: 2 Numune)	Yeniköy	1	2
Arpaçay (n: 21 Numune)	Merkez	2	5
	Telek	1	1
	Akçalar	2	9
	Küçükçatma	1	1
	Kümbet	1	1
	Güvercin	1	4
Akyaka (n: 3 Numune)	Merkez	1	1
	Demirkent	1	2
Digor (n: 43 Numune)	Uzunkaya	1	24
	Bacalı	2	11
	Halıkışlak	1	8
Kağızman (n: 13 Numune)	Ortaköy	1	12
	Tunçkaya	1	1

3.1.3. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Malzemeler

3.1.3.1. Transport Sıvı ve Enjektör

Apse içeriği örneklerinin toplanması ve laboratuvara ulaştırılması amacıyla; steril, tek kullanımlık, besiyeri içermeyen taşıyıcı tüp içerisinde bulunan sıvılar (Microcult Transport Swap, 051123) ya da steril ve tek kullanımlık 10 ve 20 mL'lik enjektörler (Ayset, 062) kullanıldı.

3.1.3.2. Kanlı Agar Besiyeri İçeriği ve Hazırlanışı

Blood Agar Base No.2 besiyeri içeriği (Oxoid CM0271)

Bileşim	Miktar g/L
Proteose peptone	15,0
Liver digest	2,5
Yeast extract	5,0
Sodium chloride	5,0
Agar	12,0
pH: 7,4±0,2	

Besiyerini hazırlamak için 40 g besiyeri tartıldı ve içerisinde bir miktar (yaklaşık 300 ml) distile su bulunan 1 L'lik erlene aktarıldı. Besiyeri hafifçe çalkalandıktan sonra kalan kısım göz kararı 930 mL çizgisine kadar distile su ile tamamlandı. Besiyeri, tamamen çözülmesi için 50-60 °C'lik Benmaride 10 dk bekletildi. Sonrasında otoklavda 121 °C'de 15 dk boyunca sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra 45-50 °C sıcaklık aralığına kadar soğutulan besiyeri içerisine 70 ml defibrine koyun kanı eklendi. Homojen hale getirilen besiyerinden her bir steril petri kutusuna içerisinde yaklaşık 20 ml olacak şekilde bek alevi yanında döküldü. Besiyerlerinin soğuması ve donması beklendikten sonra, kontaminasyon kontrol amacıyla birer adet besiyeri oda ısısında ve 37 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Diğer besiyerleri muhafaza amacıyla +4 °C'deki buzdolabına kaldırıldı. Kanlı agar, *C. pseudotuberculosis*'in izolasyonu, elde edilen şüpheli kolonilerin saflaştırılması,

fenotipik identifikasyon testleri, antibakteriyel duyarlılık testleri için saf kültürlerin canlandırılması ve PCR çalışmaları için ihtiyaç duyulan DNA'ların ekstraksiyonunda saf bakteri kültürlerinin elde edilmesi için kullanıldı.

3.1.3.3. Tinsdale Agar Besiyeri İçeriği ve Hazırlanışı

Tinsdale Agar besiyeri içeriği (Oxoid CM0487)

Bileşim	Miktar g/L
Proteose peptone	20,0
Yeast extract	5,0
Sodium chloride	5,0
L-cystine	0,24
Agar	15,0
pH: 7,9±0,2	

Besiyerini hazırlamak için 45 g besiyeri tartıldı ve içerisinde bir miktar (yaklaşık 300 ml) distile su bulunan 1 L'lik erlene aktarıldı. Besiyeri hafifçe çalkalandıktan sonra kalan kısım 1L çizgisine kadar distile su ile tamamlandı. Besiyeri, ısıtmalı manyetik karıştırıcıda düşük ısıda tamamen çözdürüldü. Besiyeri kaynama sıcaklığında olan Benmaride tamamen çözünene kadar tutuldu ve 50°C'ye kadar soğumaya bırakıldı. Besiyerine aseptik olarak 1 vial Oxoid Tinsdale Supplement (SR0065) eklendi. Homojen hale getirilen besiyerinden her bir steril petri kutusuna içerisinde 20 ml olacak şekilde bek alevi yanında paylaştırıldı. Besiyerlerinin soğuması ve donması beklendikten sonra, kontaminasyon kontrol amacıyla birer adet besiyeri oda ısısında ve 37 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Diğer besiyerleri muhafaza amacıyla +4 °C'deki buzdolabına kaldırıldı. Tinsdale Agar besiyeri *Corynebacterium* türlerinin izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.1.3.4. %20 Gliserollü Brucella Broth İçeriği ve Hazırlanışı

%20 Gliserollü Brucella Broth besiyeri içeriği (BD BBL™ 211088)

İçindekiler	Miktar g/l
Pancreatic digest of casein	10,0
Peptic digest of Animal Tissue	10,0
Sodium chloride	5,0
Yeast Extract	2,0
Dextrose	1,0
Sodium Bisulfite	0,1
pH: 7.0 ± 0.2	

Besiyerini hazırlamak için 2,8 g besiyeri tartıldı ve içerisinde bir miktar (yaklaşık 30 ml) distile su bulunan 100 mL'lik Pyrex cam şişelerine aktarıldı. Besiyeri hafifçe çalkalandıktan sonra kalan kısım göz kararı 80 ml çizgisine kadar distile su ile tamamlandı. Üzerine 20 ml gliserol (Sigma Aldrich 15524) eklendikten sonra iyice karıştırıldı. Ardından otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Sterilizasyon işleminde sonra besiyerinin soğuması beklendi ve soğuduktan sonra 1,5 ml hacimde PCR tüplerine 750 µl olacak şekilde dağıtıldı. Hazırlanan besiyeri +4°C'de kullanılıncaya kadar saklandı. %20 Gliserollü Brucella Broth izole edilen bakterileri -20 ve -80 °C'de stoklamak amacıyla kullanıldı.

3.1.4. Fenotipik İdentifikasyonda Kullanılan Malzemeler

3.1.4.1. Gram Boyama Malzemeleri

Çalışmada, RTA Labor Diagnostik marka ve YMG003 kodlu kullanıma hazır Gram boyama seti kullanıldı. Set, kültürel yöntemlerle elde edilen izolatların Gram boyanma özellikleri ile birlikte mikroskopik morfolojilerini analiz etmek amacıyla kullanıldı.

3.1.4.2. Katalaz Testi Malzemeleri

Katalaz testinde kullanılmak üzere %30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonu (MERCK 1.07209) %3'lük derişimde olacak şekilde seyreltildi. Bu amaçla konsantre solüsyondan 3 ml alınarak 27 ml distile su ile karıştırıldı.

3.1.4.3. Üre Agar Besiyeri İçeriğı ve Hazırlanışı

Urea agar (Base) acc. CHRISTENSEN Besiyeri İçeriğı (Merck 1.08492)

Bileşim	Miktar g/L
Peptone from meat	1,0
D(+) Glucose	1,0
NaCl	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0
Phenol red	0,012
Agar	12,0
pH: 6.8 ± 0.2	

Besiyerini hazırlamak için 21 gr besiyeri tartıldı ve içerisinde bir miktar (yaklaşık 300 ml) distile su bulunan 1 L'lik erlene aktarıldı. Besiyeri hafifçe çalkalandıktan sonra kalan kısım göz kararı 950 mL çizgisine kadar distile su ile tamamlandı. Besiyeri, tamamen çözülmesi için 50-60 °C'lik Benmaride 10 dk bekletildi. Sonrasında otoklavda 121 °C'de 15 dk boyunca sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri soğumaya bırakıldı. 45-55 °C'ye kadar soğuyan besiyerine filtre ile steril edilmiş %40'luk üre solüsyonundan 50 ml eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri petri kutularına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Kontaminasyon kontrolü amacıyla birer adet besiyeri oda ısısında ve 37 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan besiyeri +4°C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Üre Agar besiyeri elde edilen izolatların üreaz testi için kullanıldı.

3.1.4.4. Nitrat Broth Besiyeri İçeriği ve Hazırlanışı

Nitrat Broth Besiyeri İçeriği (Merck 72548)

Bileşim	Miktar g/L
Meat extract	3,0
Potassium nitrate	1,0
Peptone	5,0
pH: 7.0 ± 0.2	

Besiyerini hazırlamak için 9 gr besiyeri tartıldı ve içerisinde bir miktar (yaklaşık 300 ml) distile su bulunan 1 L'lik erlene aktarıldı. Besiyeri hafifçe çalkalandıktan sonra kalan kısım 1L çizgisine kadar distile su ile tamamlandı. Besiyeri, tamamen özölmesi için 50-60 °C'lik Benmaride 10 dk bekletildi. Sonrasında otoklavda 121 °C'de 15 dk boyunca sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işleminden sonra besiyerinin soğuması beklendi. Vida kapaklı steril cam tüplere 5 ml olacak şekilde aktarılan besiyerinden birer adet alınarak kontaminasyon kontrolü amacıyla oda ısısında ve 37 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan besiyerleri +4°C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Nitrat Broth besiyeri elde edilen izolatların nitrat indirgeme testi amacıyla kullanıldı.

3.1.5. Moleküler İdentifikasyonda Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmada, elde edilen izolatların moleküler identifikasyon amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve sekans analizi kullanıldı.

3.1.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Malzemeler

- Vorteks (Heidolph Reax top 040522348)
- Derin Dondurucu
- Otomatik Pipet Seti (Gilson) (2, 10, 20,100, 200, 1000 µL'lik)
- Taq DNA Polimeraz Seti (Genedirex MB101-0500)
- 10xPCR Buffer (Genedirex MB101-0500)

- dNTP Miks 10 mM dNTP Mix (A.B.T. B12-01-01)
- Nükleaz Ari Su (Sigma W1754)
- Primerler (Probesynthesis Biyoteknoloji)
- Termal Döngü Cihazı (Bio-Rad MJ Mini Thermal Cycler, PTC1148)
- Referans Suş (ATAFEN *C. pseudotuberculosis* NCTC 3450)

3.1.5.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal

Maddeler

- Elektroforez Tankı (BIORAD MINI-SUB CELL GT)
- UV Transilluminatör (Vilber Lourmat, V038464)
- Agaroz (Biosharp Agarose BS081)
- 100 bp Plus DNA Molecular Weight Marker XIV 50 µG (Genedirex DM003-0500)
- Ethidium Bromide (Sigma E1510)
- 6X DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific™ R0611)
- 10X Tris-borate-EDTA (TBE) (Ecotech TBE1000)

3.1.6. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Kullanılan Malzemeler

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının antibiyotik duyarlılık testlerini yapmak için; fizyolojik tuzlu su, steril tahta saplı sıvı, McFarland (Biosan, SIA) cihazı, saf kültürler, steril tek kullanımlık öze, Mueller Hinton Agar (MERCK 1.05437), vida kapaklı steril cam tüpler, antibiyotik diskleri ve E- test şeritleri kullanıldı.

3.1.6.1. Mueller-Hinton Agar Besiyeri İçeriği ve Hazırlanışı

Mueller-Hinton Agar besiyeri içeriği (MERCK 1.05437)

Bileşim	Miktar g/L
Meat infusion	2,0
Casein hydrolysate	17,5
Starch	1,5
Agar	13,0
pH: 7,4±0,2	

Besiyerini hazırlamak için 34 g besiyeri tartıldı ve içerisinde bir miktar (yaklaşık 300 ml) distile su bulunan 1 L'lik erlene aktarıldı. Besiyeri hafifçe çalkalandıktan sonra kalan kısım göz kararı 950 mL çizgisine kadar distile su ile tamamlandı. Besiyeri, tamamen çözülmesi için 50-60 C'lik Benmaride 10 dk bekletildi. Hazırlanan besiyerine otoklavda 121 C'de 15 dk boyunca sterilizasyon işlemi uygulandı. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra 45-50 C sıcaklık aralığına kadar soğutulan besiyeri içerisine 50 mL defibrine koyun kanı eklendi. Besiyeri, her bir steril petri kutusuna içerisinde 25 ml olacak şekilde bek alevi yanında döküldü. Besiyerlerinin soğuması ve donması beklendi. Kontaminasyon kontrolü amacıyla birer adet besiyeri oda ısısında ve 37 C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan besiyeri +4C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Bu besiyeri, elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının antibiyotik duyarlılık analizlerinin yapılması için kullanıldı.

3.1.6.2. Antibiyotik Diskleri

Elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının antibiyotik duyarlılığının disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesi kapsamında, siprofloksasin (CIP-5 g, Bioanalyse), rifampin (RA-5 g, Bioanalyse), klindamisin (DA-2 g, Bioanalyse), penisilin G (P-1 UI, Bioanalyse), linezolid (LNZ-30 g, Bioanalyse), vankomisin (VA-5 g, Bioanalyse) ve tetrasiklin (TE-30 g, Bioanalyse) antibiyotik diskleri kullanıldı.

3.1.6.3. Gradient Test (E-test) Şeritleri

Elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının antibiyotik duyarlılığının ve MİK değerlerinin gradient testle belirlenmesi kapsamında, linezolid (Bioanalyse, LZ-0.016-256 µg/mL), tetrasiklin (Bioanalyse, TC-0.016-256 µg/mL), siprofloksasin (Bioanalyse, CI-0.002-32 µg/mL), rifampisin (Bioanalyse, RI-0.002-32 µg/mL), penisilin G (Bioanalyse, PG-0.016-256 µg/mL), vankomisin (Bioanalyse, VA-0.016-256 µg/mL) ve klindamisin (Bioanalyse, CM-0.016-256 µg/mL) E-test şeritleri kullanıldı.

3.1.7. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Suşlarının 16S rRNA Sekanslanması ve Filogenetik Analizinde Kullanılan Malzemeler

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının 16S rRNA gen bölgelerinin sekanslanması ve filogenetik analizi, ticari bir firmadan (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara-Türkiye) hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Bu kapsamda, Gene MATRIX Tissue&Bacterial DNA Purification Kiti (EurX, E3551), DNA'nın saflık kontrolü için NanoPhotometer spectrophotometer (Implen, CA, USA) ve konsantrasyonu kontrolü için Qubit 2.0 Fluorometer'de (Life Technologies, CA, ABD) Qubit DNA Assay Kiti kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması

Çalışma kapsamında, Kars ili ve ilçelerinde bulunan köylerde aile tipi koyunculuk işletmelerinde KLA semptomu gösteren sürülere ziyaretler gerçekleştirilip toplam 105 adet apse içeriği toplandı. KLA semptomu gösteren hayvanların apseli bölgelerin traşı yapıldı ve %70'lik alkolle silindi. Açık olan apselerden steril sıvap ile kapalı olan apselerden ise enjektör yardımıyla yaklaşık 1-2 ml apse içerikleri alındı. Sıvapla apse örneği alınırken sıvapın apse cidarına temas etmesine dikkat edildi. Alınan numuneler izolasyon ve identifikasyon çalışmaları amacıyla soğuk zincir altında aynı

gün Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na ulaştırıldı.

3.2.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in İzolasyonu

Alınan svap ve apse içerik örneklerinin, %5 Koyun Kanlı Agar ve Tinsdale besiyerine ilk ekim hattı sıvayla oluşturulup steril öze aracılığıyla çizgi ekim yöntemi kullanılarak ekimleri gerçekleştirildi. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C'de aerop ortamda 24-48 saat inkübe edildi (Akbaş 2014, Bernard ve Funke 2015). Kanlı agarda 24 saat inkübasyondan sonra, sarımsı küçük 48 saat sonra 1-2 mm çapına ulaşabilen soluk renkli, kuru ve öze ile agar yüzeyi üzerinde kolayca hareket ettirilebilen koloniler şüpheli olarak kabul edildi (Baird ve Fontaine, 2007). Şüpheli koloniler saflaştırmak amacıyla kanlı agara pasajlandı ve 37 °C'de 24-48 saat aerop ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda saf olarak elde edilen izolatlar fenotipik identifikasyon, moleküler identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık durumlarının belirlenmesi amacıyla %20 Gliserinli Brucella Broth' a aktarılarak stoklandı.

3.2.3. Fenotipik Yöntemlerle *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in İdentifikasyonu

Kültürel analizler sonrasında izole edilen ve saflaştırılan kolonileri oluşturan bakterilerin *C. pseudotuberculosis* yönünden fenotipik identifikasyonu Gram boyama sonrası gözlenen mikroskopik morfolojilerine, katalaz, üreaz ve nitrat indirgeme özelliklerine göre ve Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) testi ile *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* bakterileri eşliğinde artan hemoliz aktivitesine göre gerçekleştirildi (İpek ve ark. 2012, Torky ve ark. 2023).

3.2.3.1. Gram Boyama

Gram boyaması yapılacak izolatların %5 Koyun Kanlı agarda 37 °C'de aerop ortamda 24-48 saat inkübe edilerek taze katı kültürleri hazırlandı. Lam üzerine steril öze yardımı ile 1 damla steril fizyolojik tuzlu su konuldu. Taze saf bakteri kolonilerden steril

öze vasıtasıyla bir miktar alındı ve lam üzerindeki FTS ile homojen bir şekilde karıştırıldı. Hazırlanan preparat kurumaya bırakıldı ve fiziksel tespit işlemi yapıldı.

Preparat hazırlandıktan sonra boyama işlemine geçildi. Preparatın üzerine Kristal Viyole döküldü ve 2 dakika beklendi. Süre sonunda preparat distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine Lugol solüsyonu döküldü ve 1 dakika beklendi. Süre sonunda preparat önce distile su ile yıkandı daha sonra %96'lık etil alkolle 30 saniye muamele edilerek dekolorizasyon işlemi uygulandı. Ardından distile su ile yeniden yıkama yapıldı. Preparatın üzerine Sulu fuksin döküldü ve 30 saniye beklendi. Süre sonunda preparat distile suyla yıkandı, kurutulup, immersiyon yağı damlatılıp ışık mikroskopunda x100'lük objektifte incelendi (Leber ve ark. 2016).

Boyanan preparatların incelenmesinde Gram pozitif, $0,5-0,6 \times 1,0-3,0 \mu\text{m}$ boyutlarında pleomorfik özellikte basillerin görüldüğü preparatlar *C. pseudotuberculosis* yönünden şüpheli kabul edildi (İpek ve ark. 2012, Bernard ve Funke 2015).

3.2.3.2. Katalaz Testi

Katalaz testi yapılacak izolatların %5 Koyun Kanlı agarda 37°C 'de aerop ortamda 24-48 saat inkübe edilerek taze katı kültürleri hazırlandı. Lam üzerine steril öze ile 1 damla %3'lük H_2O_2 konuldu. Taze katı kültür kolonilerinden steril öze ile bir miktar alınıp lam üzerindeki %3'lük H_2O_2 ile karıştırıldı. Köpürmenin şekillenmesi pozitif olarak kabul edildi (Leber ve ark. 2016). Pozitif sonuç veren izolatlar *C. pseudotuberculosis* yönünden şüpheli kabul edildi (Bernard ve Funke 2015).

3.2.3.3. Üre Testi

İzole edilen saf koloniler üre testi için hazırlanan üre agara çizgi ekim yöntemi ile ekildi ve 37°C 'de aerop ortamda 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üre agarda meydana gelen pembe renk oluşumu pozitif olarak kabul edildi. Pozitif sonuç veren izolatlar *C. pseudotuberculosis* yönünden şüpheli kabul edildi (Bernard ve Funke 2015, Leber ve ark. 2016).

3.2.3.4. Nitrat İndirgeme Testi

Nitrat indirgeme testi yapılacak izolatların %5 Koyun Kanlı agarda 37 °C’de aerop ortamda 24-48 saat inkübe edilerek taze katı kültürleri hazırlandı. Taze katı kültüre ait saf kolonilerden steril öze ile bir miktar alınarak daha önce hazırlanan ve steril vida kapaklı tüplerin içinde bulunan 5 ml nitrate brotha ekildi. Ekim yapılan tüpler 37 °C’de aerop ortamda 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere ayıraç A (%0,8 sulfanilik asit) ve ayıraç B (%0,5 N,N-dimethyl—naftilamin)’ den eşit miktarlarda damlatıldı (Bernard ve Funke 2015, Leber ve ark. 2016). Ayıraçların damlatıldığı tüplerde renk değişimi olmaması negatif, pembe renge dönmesi ise pozitif olarak kabul edildi (Leber ve ark. 2016). Nitrat indirgeme testi *C. pseudotuberculosis*’in biyovar ayırımında kullanılmış olup, nitrat negatif sonuç verenler *C. pseudotuberculosis* biyovar ovis, pozitif sonuç verenler ise *C. pseudotuberculosis* biyovar equi olarak kabul edildi (Schlicher ve ark. 2021).

3.2.3.5. Reverse CAMP Testi

Reverse CAMP testi için aralarında mesafe olacak şekilde %5 koyun kanlı agarın sol tarafına *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşu ve sağ tarafına *Rhodococcus equi* ATCC 6939 standart suşu vertikal bir şekilde ekildi. Bu iki standart suşunun ekim hattına dik olacak şekilde *C. pseudotuberculosis* şüpheli izolatlar horizontal şekilde ekildi ve 37 °C’de aerop ortamda 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. *C. pseudotuberculosis*’in PLD enzim etkinliği, *R. equi*’nin sentezlediği fosfolipaz C enzimi ile sinerjik etki sonucu artmasına ve *S. aureus*’un sentezlediği stafilokokal β -hemolizin ile antisinerjik olarak azalması nedeniyle *S. aureus* yönünde hemoliz şekillenmemesi pozitif olarak kabul edildi (Cuevas ve Songer 1993, Leber ve ark. 2016, El Tawab ve ark. 2019).

3.2.4. *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu

Fenotipik yöntemlerle *C. pseudotuberculosis* olarak tanımlanan izolatların moleküler yöntemlerle identifikasyonu/konfirmasyonu tür spesifik PCR ile gerçekleştirildi. PCR işlemlerinde pozitif kontrol amacıyla *C. pseudotuberculosis* NCTC 3450 standart suşu kullanıldı.

3.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarından DNA ekstraksiyonunda kaynatma yöntemi kullanıldı. -80 °C'de stoklanan izolatlar izolatların %5 Koyun Kanlı agarda 37 °C'de aerob ortamda 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreyen saf kolonilerden steril öze ile 2-3 koloni alınarak içerisinde 100 µL nükleaz ari su bulunan PCR tüplerine konuldu ve vortekslenerek iyice karışması sağlandı. Hazırlanan PCR tüplerine termal döngü cihazında 99 °C'de 15 dakika ısıt işlem uygulandı. Isıt işlem sonunda tüpler 7000 devirde 2,5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj işlemi sonunda tüplerin üst kısmında DNA'nın yer aldığı süpernatanttan 30-40 ul toplanarak steril PCR tüplerine aktarıldı. Toplanan bu DNA' lar yapılan tüm PCR analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de stoklandı.

3.2.4.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının PCR temelli moleküler identifikasyonu, *16S rRNA*, *pld* ve *rpoB* gen bölgelerinin eş zamanlı analiz edileceği multipleks PCR ile gerçekleştirildi (Torky ve ark. 2023, Torres ve ark. 2013).

Tablo 3: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının multipleks PCR ile identifikasyonunda kullanılan primerler

Hedef Gen	Primer Adı	Primer Dizisi (5'—3')	Amplikon Boyutu (bp)	Kaynak
16S rRNA	16S-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	816	Çetinkaya ve ark. 2002
	16S-R	TCTCTACGCCGATCTTGTAT		
<i>rpoB</i>	C2700F	CGTATGAACATCGGCCAGGT	446	Khamis ve ark. 2004
	C3130R	TCCATTTCGCCGAAGCGCTG		
<i>pld</i>	Pld F	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	203	Pacheco ve ark. 2007
	Pld R	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG		

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının tür düzeyinde konfirmasyonu için kullanılan multipleks PCR bileşenleri ve amplifikasyon koşulları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Multipleks PCR bileşimi ve reaksiyon koşulları

Hedef Gen	Reaksiyon hacmi	Miksin bileşimi	Reaksiyon koşulları
16S rRNA	25 µl	2,5 µl buffer (10X)	95°C'de 3 dk. ön denatürasyon, 95 °C'de 1 dk. denatürasyon, 58°C'de 40 sn. primer bağlanması, 68°C'de 90 sn. uzama 40 siklus ve 68°C'de 7 dk. final uzama protokolü uygulandı (Pacheco ve ark. 2007). Sonuç alınamaması nedeniyle referans kaynak 95°C'de 3 dk. ön denatürasyon, 95 °C'de 1 dk. denatürasyon, 55°C'de 40 sn. primer bağlanması, 68°C'de 90 sn. uzama 35 siklus ve 68°C'de 5 dk. final uzama olarak değiştirildi ve % 1'lik agaroz jelde UV ışığında görüntülendi (Torres ve ark. 2013).
<i>rpoB</i>		0,5 µl dNTP mix (10 mM), Forward ve reverse olmak üzere 1'er µl her bir primerden (10 µM), 0,25 µl Taq DNA Polimeraz (5 U/µl), 10,75 µl nükleazsız su su	
<i>pld</i>		5 µl Kalıp DNA	

3.2.4.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biyovarlarının PCR ile Belirlenmesi

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının biyovar identifikasyonu *C. pseudotuberculosis* biyovar *equi* suşlarında bulunan *narG* gen bölgesinin amplifikasyonunu sağlayan monopleks PCR ile gerçekleştirildi (Almeida ve ark. 2017).

Tablo 5: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının biyovarlarının belirlenmesinde kullanılan primerler

Hedef Gen	Primer Adı	Primer Dizisi (5'—3')	Amplikon Boyutu (bp)	Kaynak
<i>narG</i>	narG -F	ACCCGTACTTGCACTCTTTC	612	Almeida ve ark. 2017
	narG -R	AGTCAGTACTTCCGCAGGTC		

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının biyovar identifikasyonu için kullanılan monopleks PCR bileşenleri ve amplifikasyon koşulları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının biyovarlarının belirlenmesinde kullanılan PCR bileşimi ve reaksiyon koşulları

Hedef Gen	Reaksiyon hacmi	Miksin bileşimi	Reaksiyon koşulları
<i>narG</i>	25 µl	2,5 µl buffer (10X), 0,5 µl dNTP mix (10 mM), Forward ve reverse olmak üzere 1'er µl her bir primerden (10 µM), 0,25 µl Taq DNA Polimeraz (5 U/µl), 14,75 µl nükleazsız su su 5 µl Kalıp DNA	95°C'de 4 dk. ön denatürasyon, 95 °C'de 30 sn. denatürasyon, 58°C'de 30 sn. primer bağlanması, 72 °C'de 90 sn. uzama 30 siklus ve 72°C'de 5 dk. final uzama protokolü uygulandı ve % 1'lik agaroz jelde UV ışığında görüntülendi (Almeida ve ark. 2017).

3.2.4.4. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının Virülans Genlerinin Belirlenmesi

Tanımlanan *C. pseudotuberculosis* izolatlarında virülans gen analizleri kapsamında; integral membran proteini (*FagA*), demir enterobaktin taşıyıcısı (*FagB*), ATP bağlayıcı sitoplazmik membran proteini (*FagC*), demir siderofor bağlayıcı protein (*FagD*) ve prolin iminopeptidazı (*PIP*) kodlayan genlerinin varlığı gen spesifik primerler eşliğinde monopleks PCR'ler ile tespit edildi (D' Afonseca ve ark. 2010, Aquino de Sá ve ark. 2013).

Tablo 7: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in virülans genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Hedef Gen	Primer Adı	Primer Dizisi (5'--3')	Amplikon Boyutu (bp)	Kaynak
<i>Fag_A_</i>	<i>Fag A-F</i>	AGCAAGACCAAGAGACATGC	245	Aquino de Sá ve ark. 2013
	<i>Fag A-R</i>	AGTCTCAGCCCAACGTACAG		
<i>Fag_B</i>	<i>Fag B- F</i>	GTGAGAAGAACCCCGGTATAAG	291	Aquino de Sá ve ark. 2013
	<i>Fag B-R</i>	TACCGCACTTATTCTGACACTG		
<i>Fag_C</i>	<i>Fag C-F</i>	GTTTGGCTATCTCCTTGGTATG	173	Aquino de Sá ve ark. 2013
	<i>Fag C-R</i>	CGACCTTAGTGTTGACATACCC		
<i>Fag_D</i>	<i>Fag D-F</i>	GAGACTATCGACCAGGCAGA	226	Aquino de Sá ve ark. 2013
	<i>Fag D-R</i>	ACTTCTTGGGGAGCAGTTCT		
<i>PIP</i>	<i>PIP F</i>	AACTGCGGCTTTCTTTATTC	551	D' Afonseca ve ark 2010
	<i>PIP R</i>	GACAAGTGGGAACGGTATCT		

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının virülans genlerinin analizi için kullanılan monopleks PCR bileşenleri ve amplifikasyon koşulları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının virölans genlerinin belirlenmesinde kullanılan PCR bileşimi ve reaksiyon koşulları

Hedef Gen	Reaksiyon hacmi	Miksin bileşimi	Reaksiyon koşulları
<i>Fag_A_</i>	25 µl	2,5 µl buffer (10X), 0,5 µl dNTP mix (10 mM), Forward ve reverse olmak üzere 1'er µl her bir primerden (10 µM), 0,25 µl Taq DNA Polimeraz (5 U/µl), 14,75 µl nükleazsız su 5 µl Kalıp DNA	94°C'de 30sn. ön denatürasyon, 94 °C'de 40 sn. denatürasyon, 58°C'de 40 sn. primer bağlanması, 72 °C'de 40 sn. uzama 40 siklus ve 72°C'de 10 dk. final uzama protokolü uygulandı. Amplifikasyon ürünleri daha sonra %1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Aquino de Sá ve ark. 2013).
<i>Fag_B</i>			94°C'de 30sn. ön denatürasyon, 94 °C'de 40 sn. denatürasyon, 55°C'de 40 sn. primer bağlanması, 72 °C'de 40 sn. uzama 40 siklus ve 72°C'de 10 dk. final uzama protokolü uygulandı. Amplifikasyon ürünleri daha sonra %1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Aquino de Sá ve ark. 2013).
<i>Fag_C</i>			94°C'de 30sn. ön denatürasyon, 94 °C'de 40 sn. denatürasyon, 60 °C'de 40 sn. primer bağlanması, 72 °C'de 40 sn. uzama 40 siklus ve 72°C'de 10 dk. final uzama protokolü uygulandı. Amplifikasyon ürünleri daha sonra %1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Aquino de Sá ve ark. 2013).
<i>Fag_D</i>			94°C'de 30sn. ön denatürasyon, 94 °C'de 40 sn. denatürasyon, 61 °C'de 40 sn. primer bağlanması, 72 °C'de 40 sn. uzama 40 siklus ve 72°C'de 10 dk. final uzama protokolü uygulandı. Amplifikasyon ürünleri daha sonra %1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Aquino de Sá ve ark. 2013).
<i>PIP</i>			95°C'de 5 dk. ön denatürasyon 94 °C'de 30 sn. denatürasyon, 54 °C'de 45 sn. primer bağlanması, 72 °C'de 45 sn. uzama 35 siklus ve 72°C'de 5 dk. final uzama protokolü uygulandı. Amplifikasyon ürünleri daha sonra %1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (D' Afonseca ve ark 2010).

3.2.5. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının antibiyotik duyarlılık analizleri disk difüzyon ve gradient test yöntemleri ile gerçekleştirildi. Bu kapsamda, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST 2025: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_15.0_Breakpoint_Tables.pdf Erişim Tarihi: 11.06.2025) test manuellere dikkate alındı. Antibiyotik duyarlılık analizleri kapsamında veteriner hekimlikte *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan, penisilin G (PEN, 1 U), klindamisin (CLI, 2 µg), rifampicin (RA, 5 µg), siprofloksasin (CIP, 5 µg), tetrasiklin (TE, 30 µg) ve EUCAST (2025) 'te göre taranması önerilen linezolid (LNZ, 10 µg) ve vankomisin (VAN, 5 µg) antibiyotik diskleri ve E- test şeritleri kullanıldı.

Test kapsamında, %5 Koyun Kanlı Agarda 24 saatlik taze kültürleri yapılan *C. pseudotuberculosis* izolatlarından, McFarland 0,5'e göre inokulum hazırlandı. Bu inokulumlardan %5 Koyun Kanlı Mueller-Hinton Agar yüzeyine 100 ul aktararak steril bir sıvayla aracılığıyla yayma ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerlerinin oda ısısında 5-10 dk kuruması sağlandıktan sonra, test edilecek antibiyotik diskleri veya E-test şeritleri yerleştirildi. Besiyerleri, %5 CO₂'li ortamda, 35±1°C'de 16-20 saatlik inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası sonuçlar değerlendirildi. Testlerin sonuçları EUCAST (2025) manueli dikkate alınarak yorumlandı.

3.2.6. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının 16S rRNA Sekanslanması ve Filogenetik Analizi

Tanımlanan *C. pseudotuberculosis* izolatlarının 16S rRNA gen bölgelerinin sekanslanması ve filogenetik analizi, ülkemizde bu kapsamda hizmet veren ticari bir firmadan (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara-Türkiye) hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

Bu kapsamda öncelikle *C. pseudotuberculosis* izolatlarının 16S rRNA PCR analizleri gerçekleştirildi. *16S rRNA* geni, 16S-F (5'-ACCGCACTTTAGTGTGTGTG-3') ve 16S-R (5'-TCTCTACGCCGATCTTGTAT-3') primerleri kullanılarak PCR ile amplifiye edildi (Çetinkaya ve ark. 2002). PCR reaksiyonu, her numune için 50 µL hacimde olacak şekilde 25 µL Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, UK), 5 µL primer karışımı, 5 µL DNA ve 15 µL nükleaz ari su ile oluşturuldu. Reaksiyon, 95 °C'de 3 dakika ön denatürasyon, ardından 95 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 68 °C'de 90 saniye uzamadan oluşan 35 siklus ve 68 °C'de 5 dakika süreyle son bir uzama şeklinde uygulandı. Amplifiye edilen ürünler %1,5 yatay jel elektroforezinde analiz edildi ve *16S rRNA* gen pozitifliği için 816 bp'lik PCR ürünleri değerlendirildi (Torres ve ark. 2013).

PCR ürünlerinin sekans analizi ticari bir firmadan (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara-Türkiye) hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Sekans işlemi *16S rRNA* geninin amplifikasyonunda kullanılan 16S-F (5'-ACCGCACTTTAGTGTGTGTG-3') ve 16S-R (5'-TCTCTACGCCGATCTTGTAT-3') primerleri eşliğinde gerçekleştirildi (Çetinkaya ve ark. 2002). Sekans analizi sonrası elde edilen *16S rRNA* gen dizileri, en yakın akraba türlerin belirlenebilmesi amacıyla NCBI GenBank veri tabanında BLAST araması ile karşılaştırıldı ve benzerlik oranı %97 ve üzeri olan referans suşlar filogenetik analizde kullanılmak üzere seçildi. Tüm diziler MEGA X yazılımına aktarıldı ve çoklu dizi hizalaması Clustal W algoritması ile gerçekleştirildi. Hizalanan diziler kullanılarak filogenetik ağaç Neighbor-Joining (NJ) yöntemiyle oluşturuldu. Model seçimi olarak Tamura 3-parametre modeli (T92) tercih edildi, geçiş ve transversiyonları (Transitions + Transversions) kapsayan bir substitüsyon matrisi uygulandı. Siteler arası evrimsel değişim oranları için yalnızca Gamma dağılımı (G) kullanıldı ve gamma parametresi 1.00 olarak belirlendi. Türler arası evrimsel değişim paterni homojen (same among lineages) olarak kabul edildi. Veri kaybı ve boşluklar için %95 site kapsama eşiği ile kısmi silme (partial deletion) yöntemi uygulandı. Filogenetik ağacın istatistiksel güvenilirliği 1000 bootstrap tekrarı ile değerlendirildi. Analizde dış grup (outgroup) olarak *Escherichia coli* strain U 5/41 16S rRNA dizisi kullanıldı.

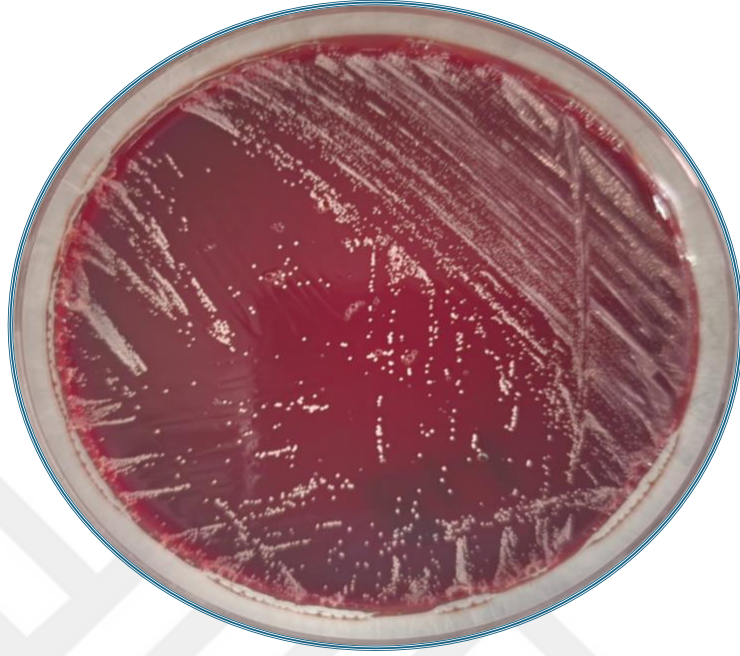
4. BULGULAR

4.1. İzolasyon Sonuçları

%5 koyun kanlı agar besiyerine gerçekleştirilen kültürel analizler sonucu 105 adet apse içeriği örneğinin 95'ine (%90,47) kültür pozitifliği elde edildi (Tablo 9).

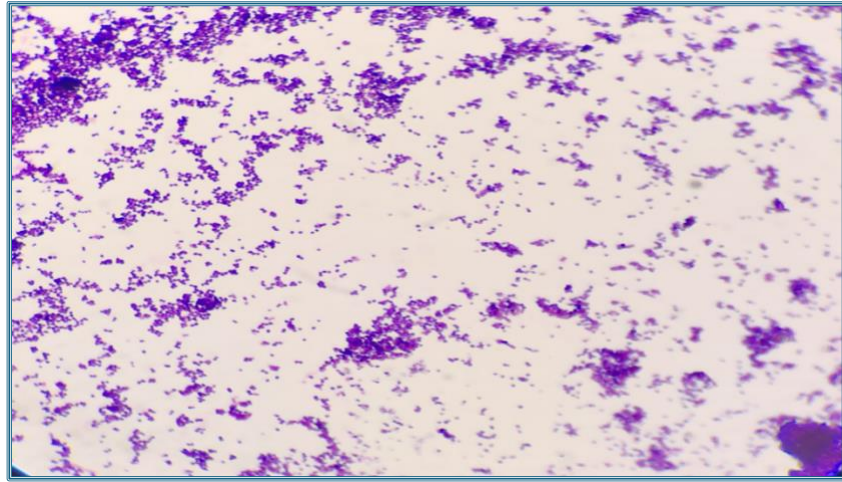
Tablo 9: Kültürel analiz sonucu *Corynebacterium pseudotuberculosis* şüpheli kabul edilen 95 izolata ait bilgiler

İlçe n=6	Köy n=18	İzolot n=95
Merkez (21 İzolat)	Başkaya	9
	Hapanlı	2
	Esenkent	5
	Büyük Aküzüm	5
Arpaçay (20 İzolat)	Merkez	5
	Telek	1
	Küçükçatma	1
	Kümbet	1
	Akçalar	9
	Güvercin	3
Akyaka (3 İzolat)	Merkez	1
	Demirkent	2
Sarıkamış (2 İzolat)	Yeniköy	2
Digor (36 İzolat)	Uzunkaya	22
	Bacalı	8
	Halıkışlak	6
Kağızman (13 İzolat)	Ortaköy	12
	Tunçkaya	1



Resim 2: *Corynebacterium pseudotuberculosis* şüpheli izolatların %5 koyun kanlı agar besiyerindeki koloni görüntüsü

Kültür pozitif örneklerin %5 koyun kanlı agar besiyerindeki saf kolonilerinden (Resim 2) preparat hazırlanarak Gram boyama yapıldı.



Resim 3: *Corynebacterium pseudotuberculosis* şüpheli izolatların Gram boyama görüntüsü

Kültürel analizler sonucunda elde edilen 95 adet izolatın 85 adedinin Gram pozitif pleomorfik morfoloji gösterdiği belirlendi (Resim 3).

4.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Şüpheli İzolatların İdentifikasyon Sonuçları

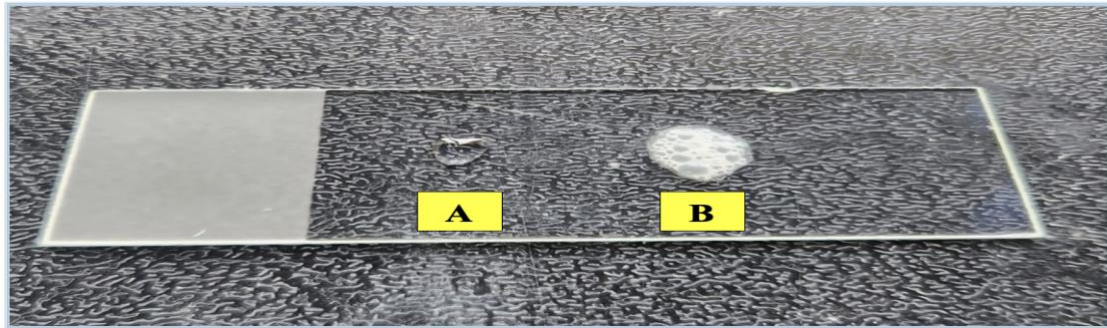
Kültürel analiz sonucu Gram pozitif pleomorfik morfolojiye sahip 85 izolata *C. pseudotuberculosis* yönünden identifikasyon amacıyla katalaz, üreaz, nitrat indirgeme ve reverse Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) testi uygulandı.

Tablo 10: *Corynebacterium pseudotuberculosis* şüpheli izolatlara uygulanan fenotipik identifikasyon testleri ve beklenen sonuçlar

Test	Sonuç
Katalaz	+
Üre Testi	+
Nitrat İndirgeme Testi	d
Reverse CAMP	+

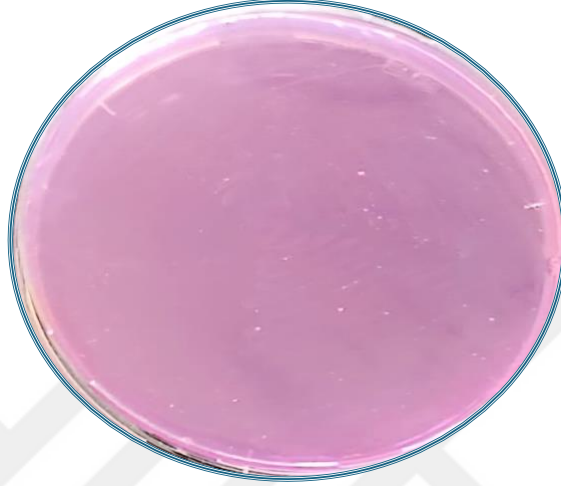
+ : pozitif, - : negatif ve d : değişken

İzolatların taze kültürlerinden elde edilen kolonilere katalaz testi yapıldı. Yapılan katalaz testi sonucunda 85 izolatın 77'sinin katalaz pozitif olduğu tespit edildi (Resim 4).



Resim 4: *Corynebacterium pseudotuberculosis* şüpheli izolatlara uygulanan katalaz testi sonuç görüntüleri (A: katalaz negatif / B: katalaz pozitif)

Üre agar besiyerinde 77 adet katalaz pozitif izolat için gerçekleştirilen üreaz testi sonucu, izolatların 70'inin üreaz pozitif olduğu tespit edildi (Resim 5).



Resim 5: *Corynebacterium pseudotuberculosis* şüpheli izolatların üre agar besiyerindeki görüntüsü

Üreaz pozitif tespit edilen 70 izolata nitrat indirgeme testi uygulandı. Nitrat indirgeme testi sonucunda tüm izolatların nitrat negatif olduğu tespit edildi (Resim 6).

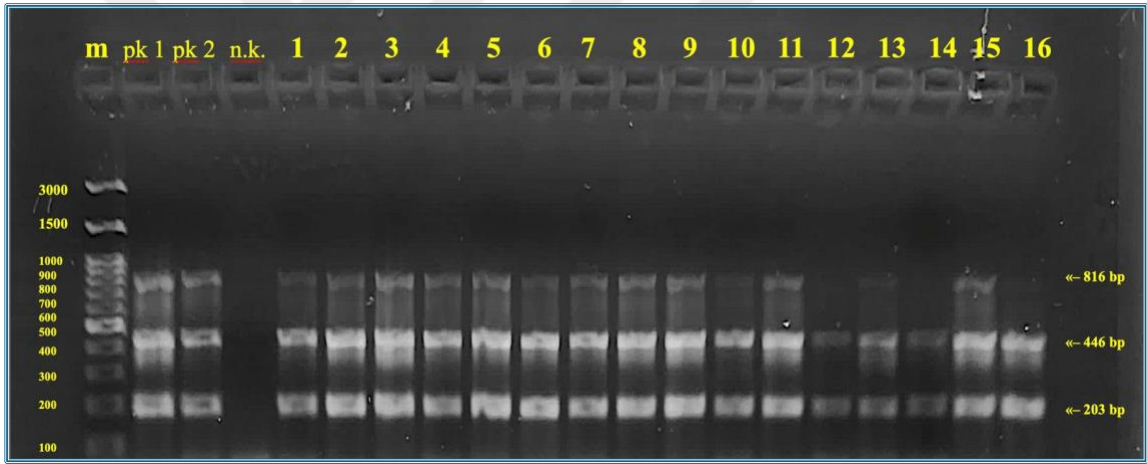


Resim 6: *Corynebacterium pseudotuberculosis* şüpheli izolatların nitrat indirgeme testi görüntüsü (kırmızı renk oluşumu pozitif, renk değişikliği olmaması negatif sonuç)

İzolatların taze kültürlerinden elde edilen kolonilere reverse CAMP testi uygulandı ve 70 izolatın tamamının pozitif olduğu tespit edildi.

4.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatların Moleküler İdentifikasyon Sonuçları

Fenotipik testler sonucunda *C. pseudotuberculosis* olarak identifiye edilen 70 izolatın moleküler identifikasyonu, *16S rRNA*, *pld* ve *rpoB* gen bölgelerinin eş zamanlı analiz edildiği multipleks PCR ile gerçekleştirildi.



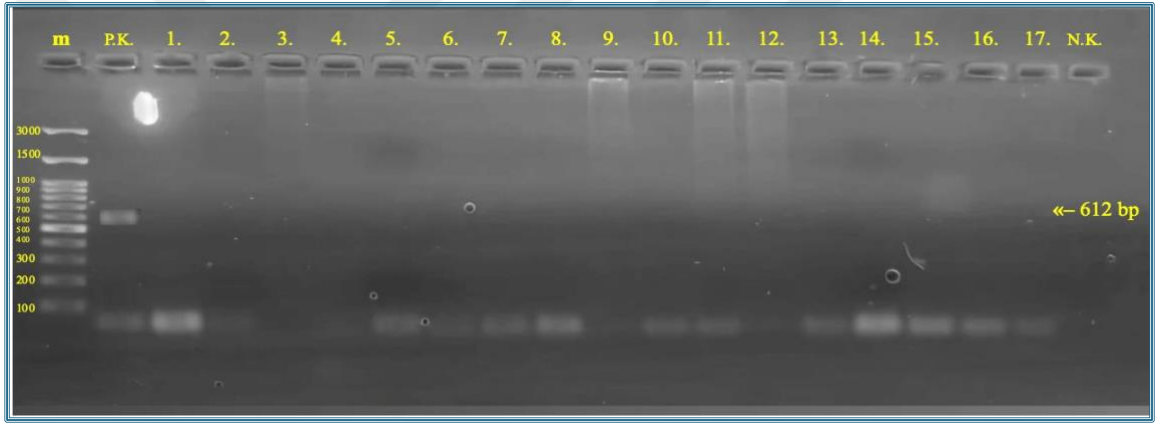
Resim 7: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in moleküler identifikasyonunda kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü

m: 100 bp plus Marker (100-3000 bp), **PK1:** Pozitif Kontrol (*C. pseudotuberculosis* NCTC 3450 standart suş), **PK2:** Pozitif Kontrol (Pozitif saha suşu) **N.K.:** Negatif Kontrol (Steril nükleazsız su), **1-16:** Taranan izolatlar.

Multipleks PCR sonucunda; fenotipik testlerle *C. pseudotuberculosis* olarak identifiye edilen 70 izolatın 47 (%67,14)'si *C. pseudotuberculosis* olarak konfirme edildi (Resim 7).

4.4. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının Biyovarlarına Ait PCR Sonuçları

Multipleks PCR ile *C. pseudotuberculosis* olarak doğrulanan 47 adet izolatın biyovar tayini, *C. pseudotuberculosis* biyovar equi suşlarında bulunan *narG* gen bölgesinin PCR analizi ile gerçekleştirildi. PCR analizi sonucunda 47 izolatın hiçbirisinde *narG* gen pozitifliği saptanmadı. İzolatlar böylelikle *C. pseudotuberculosis* biyovar ovis olarak tespit edildi (Resim 8).



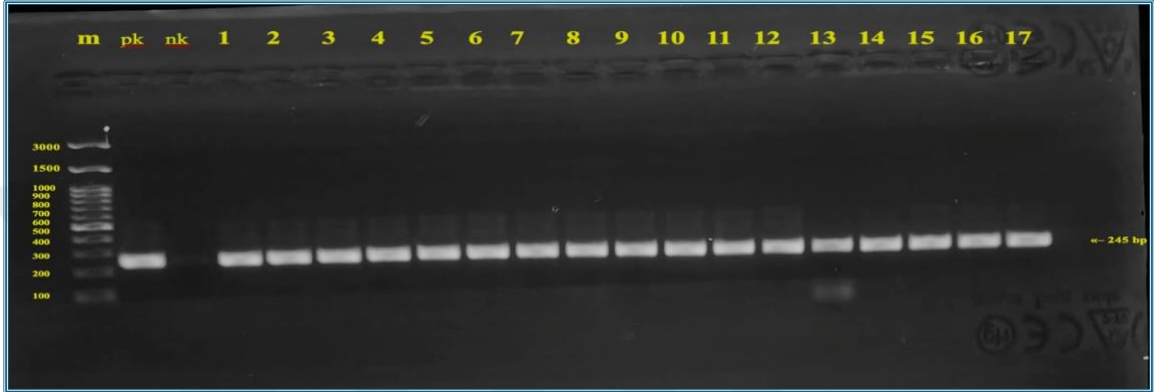
Resim 8: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in biyovarlarının PCR analizine ait ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü

m: 100 bp plus Marker (100-3000 bp), **P.K.:** Pozitif Kontrol, **N.K.:** Negatif Kontrol (Steril nükleazsız su), **1-17:** Taranan izolatlar

4.5. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının Virülans Genleri Varlığı Yönünden Moleküler Değerlendirme Sonuçları

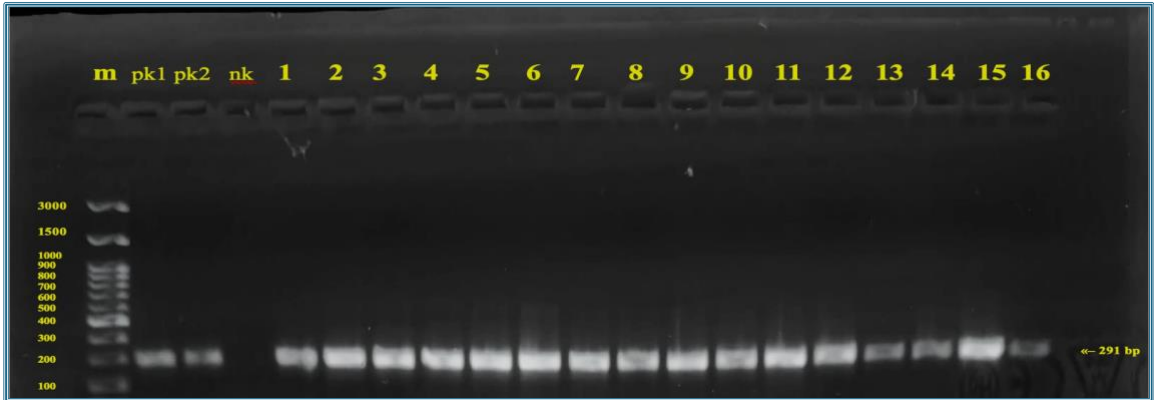
Multipleks PCR ile *C. pseudotuberculosis* olarak doğrulanan 47 adet izolatın virülans genleri kapsamında, integral membran proteini (*FagA*), demir enterobaktin taşıyıcısı (*FagB*), ATP bağlayıcı sitoplazmik membran proteini (*FagC*), demir siderofor bağlayıcı protein (*FagD*) ve prolin iminopeptidazı (*PIP*) kodlayan genlerinin spesifik primerler eşliğinde PCR analizleri gerçekleştirildi.

FagA gen spesifik PCR analizi sonucunda, 245 bp boyutunda bant veren isolatların *FagA* gen bölgesi taşıdığı belirlendi (Resim 9). PCR analizi gerçekleştirilen 47 adet *C. pseudotuberculosis* izolatının tümünde (%100) *FagA* gen pozitifliği belirlendi.



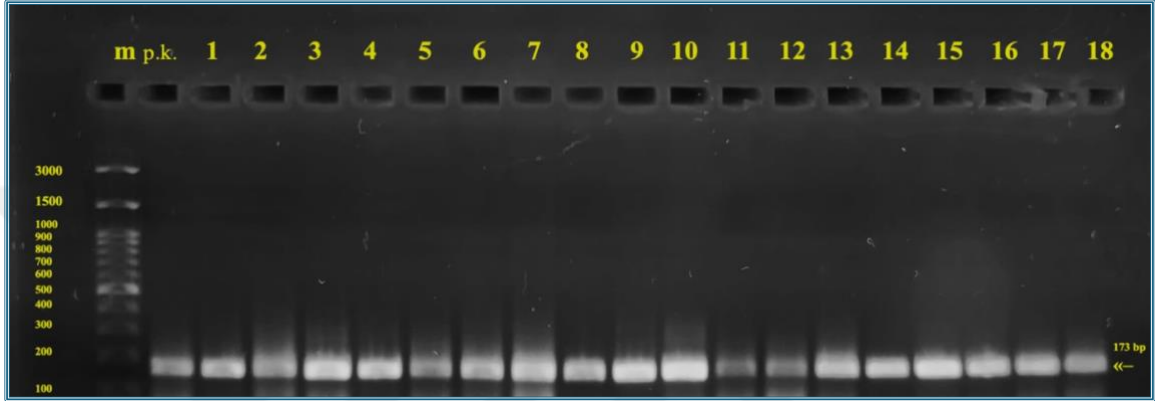
Resim 9: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in *FagA* geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü
m : 100 bp plus Marker (100-3000 bp), **pk** :Pozitif Kontrol (*C. pseudotuberculosis* NCTC 3450 standart suş), **nk** : Negatif Kontrol (Steril nükleazsız su), **1-17** : Taranan isolatlar.

FagB gen spesifik PCR analizi sonucunda, 291 bp boyutunda bant veren isolatların gen bölgesini taşıdığı belirlendi (Resim 10). PCR analizi gerçekleştirilen 47 adet *C. pseudotuberculosis* izolatının tümünde (%100) *FagB* gen pozitifliği belirlendi.



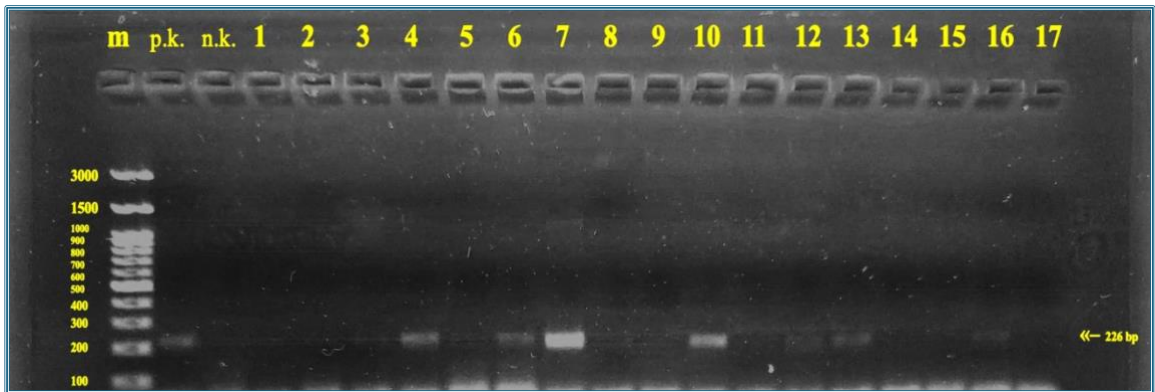
Resim 10: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in *FagB* geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü
m : 100 bp plus Marker (100-3000 bp), **pk1** : Pozitif Kontrol (*C. pseudotuberculosis* NCTC 3450 standart suş), **pk2** : Pozitif Kontrol (Pozitif saha suşu) **nk** : Negatif Kontrol (Steril nükleazsız su), **1-16** : Taranan isolatlar.

FagC gen spesifik PCR analizi sonucunda, 173 bp boyutunda bant veren isolatların gen bölgesini taşıdığı belirlendi (Resim 11). PCR analizi gerçekleştirilen 47 adet *C. pseudotuberculosis* izolatının tümünde (%100) *FagC* gen pozitifliği belirlendi.



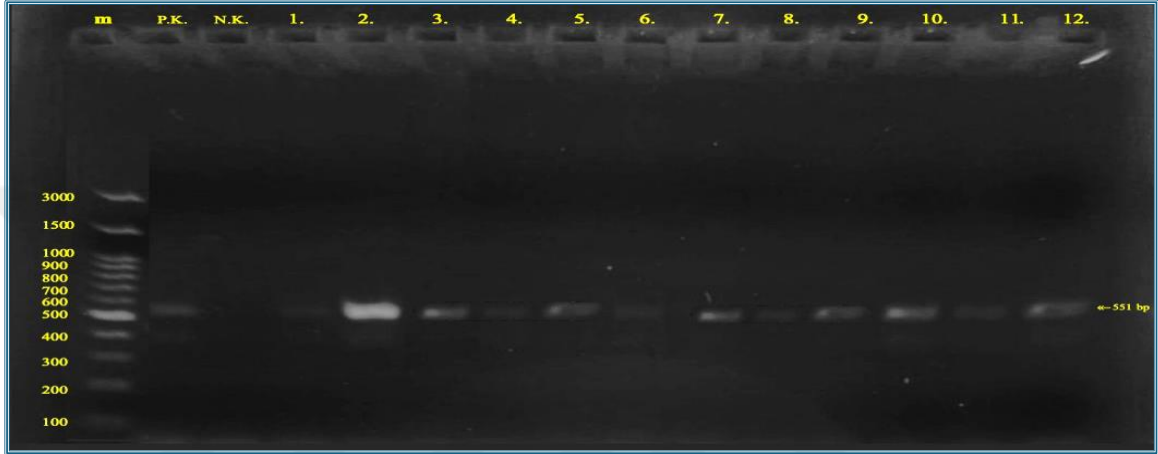
Resim 11: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in *FagC* geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü
m : 100 bp plus Marker (100-3000 bp), **p.k. :** Pozitif Kontrol (*C. pseudotuberculosis* NCTC 3450 standart suş), **1-18 :** Taranan izolatlar.

FagD gen spesifik PCR analizi sonucunda, 226 bp boyutunda bant veren isolatların gen bölgesini taşıdığı belirlendi (Resim 12). PCR analizi gerçekleştirilen 47 adet *C. pseudotuberculosis* izolatının 23 (%48,94)'ünün *FagD* gen pozitifliği belirlendi.



Resim 12: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in *FagD* geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü
m : 100 bp plus Marker (100-3000 bp), **p.k. :** Pozitif Kontrol (*C. pseudotuberculosis* NCTC 3450 standart suş), **n.k. :** Negatif Kontrol (Steril nükleazsız su), **1-17 :** Taranan izolatlar.

PIP gen spesifik PCR analizi sonucunda, 551 bp boyutunda bant veren izolatların gen bölgesi taşıdığı belirlendi (Resim 13). PCR analizi gerçekleştirilen 47 adet *C. pseudotuberculosis* izolatının 12 (%25,53)'sinin *PIP* gen bölgesi taşıdığı belirlendi.



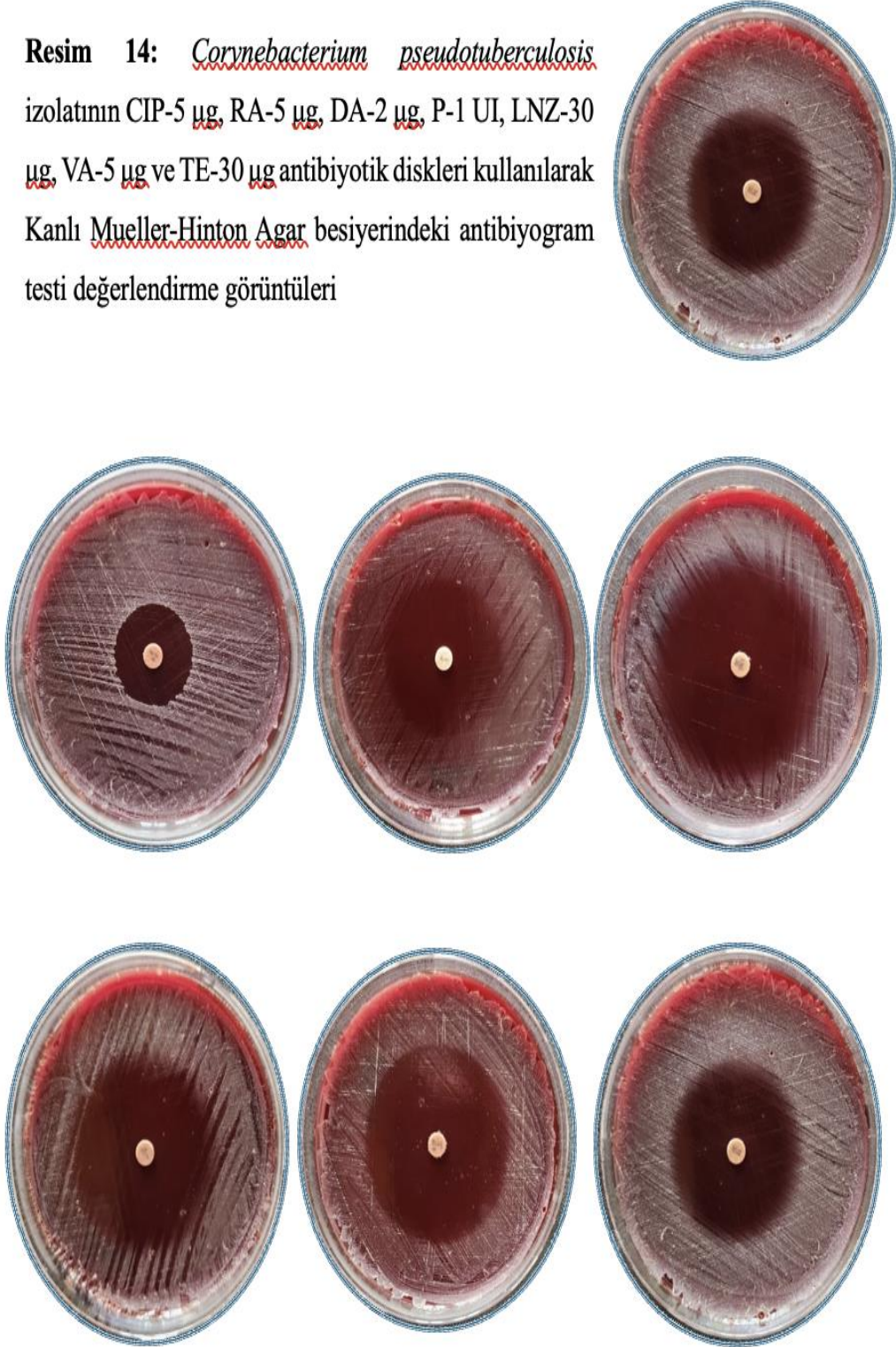
Resim 13: *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in *PIP* geni varlığının moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü

m: 100 bp plus Marker (100-3000 bp), **P.K.:** Pozitif Kontrol (*C. pseudotuberculosis* NCTC 3450 standart suş), **N.K.:** Negatif Kontrol **1-12:** Taranan izolatlar

4.6. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Değerlendirme Sonuçları

İzolatların antibiyotik direnç profillerini belirlemek amacıyla European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2025) kuralları doğrultusunda siprofloksasin (CIP-5 µg, Bioanalyse), rifampin (RA-5 µg, Bioanalyse), klindamisin (DA-2 µg, Bioanalyse), penisilin G (P-1 UI, Bioanalyse), linezolid (LNZ-30 µg, Bioanalyse), vankomisin (VA-5 µg, Bioanalyse) ve tetrasiklin (TE-30 µg, Bioanalyse) antibiyotik diskleri kullanıldı (EUCAST 2025).

Resim 14: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatının CIP-5 µg, RA-5 µg, DA-2 µg, P-1 UI, LNZ-30 µg, VA-5 µg ve TE-30 µg antibiyotik diskleri kullanılarak Kanlı Mueller-Hinton Agar besiyerindeki antibiyogram testi değerlendirme görüntüleri



Tablo 11: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının antibiyotik direnç profili değerlendirme sonuçları

Antibiyotik Suş Adı	Kinolonlar	Rifamisinler	Linkozamidler	Glikopeptidler	Oksazolidinonlar	Penisilinler	Tetrasiklinler
Direnç Durumu	CIP 5µg	RA 5µg	DA 2µg	VA 5µg	LNZ 30µg	P 1U	TE 30µg
Duyarlı / S Dirençli / R	≥ 50 ≤ 25	≥ 30 ≤ 30	≥ 20 ≤ 20	≥ 17 ≤ 17	≥ 25 ≤ 25	≥ 50 ≤ 12	≥ 24 ≤ 24
Nctc 3450	50	50	45	25	60	45	45
A3-3	45	45	35	20	55	40	48
B1	50	46	40	23	56	40	47
B1.1	50	48	42	24	58	43	45
B2	50	47	37	24	62	39	45
B6.1	51	52	45	25	61	42	50
B6.2	52	53	51	27	62	43	49
B7	51	50	40	24	58	40	47
B8	52	45	37	23	42	41	43
B8.1	50	49	43	25	60	32	45
D1	47	48	42	24	54	47	50
E1	46	47	39	22	62	43	48
E1 İzolat	43	44	47	21	55	40	46
E4	50	45	35	23	47	39	42
F1	40	18	31	24	45	30	22
I2	43	15	26	22	49	15	22
J1	41	15	29	24	48	15	21
J1.1	47	45	42	23	59	38	44
J2	50	47	41	24	58	42	48
J2.1	46	45	38	23	56	39	44
K1	45	46	39	25	55	42	49
M1.2	51	45	40	24	40	35	45
M3	45	47	42	24	56	42	45
O1 KA	48	49	39	23	58	40	46
O1 HA	48	48	40	22	56	38	44
O2 KA	50	48	41	25	55	41	48
O2 HA	50	47	40	24	56	38	47
O3	48	50	41	24	56	43	46
O5	45	47	40	23	52	38	43
Ö1	48	47	40	24	58	41	48
Ö2	50	50	42	26	59	41	47
Ö3	50	51	41	24	62	43	48
Ö4	51	49	40	28	64	44	49
Ö5	43	45	38	21	59	41	48
Ö6	45	45	36	22	55	39	44
Ö7	46	48	41	23	58	39	46
Ö8	50	50	42	25	56	43	47
Ö9	50	49	41	24	57	42	48
Ö10	50	52	43	25	60	41	48
Ö11	47	47	42	20	53	40	46
Ö12	50	47	39	23	55	36	43
Ö16	43	42	39	22	56	35	44
Ö19	50	48	41	24	60	41	47
Ö20	47	49	40	26	48	40	38
Ö23	50	48	40	25	60	40	45
Ş7	42	45	40	24	50	45	44
Ş9	46	45	39	25	56	33	43
P1	48	49	41	24	57	45	43

Tablo 12: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin genel değerlendirmesi

ANTİBİYOTİK GRUBU	ANTİBİYOTİK DİSKİ	KODU VE ANTİBİYOTİK DOZU	İZOLATLARIN DİRENÇ DURUMU		
			Dirençli	Duyarlı	Toplam
PENİSİLİNLER	Penisilin	P (1 U)	(-)	47(%100)	47
OKSAZOLİDİNONLAR	Linezolid	LNZ (30 µg)	(-)	47(%100)	47
RİFAMİSİNLER	Rifampisin	RA (5 µg)	3(%6,38)	44(%93,61)	47
GLİKOPEPTİDLER	Vancomisin	VA (5 µg)	(-)	47(%100)	47
KİNOLONLAR	Siprofloksasin	CIP (5 µg)	(-)	47(%100)	47
LİNKOZAMİDLER	Klindamisin	DA (2 µg)	(-)	47(%100)	47
TETRASİKLINLER	Tetrasiklin	TE (30 µg)	3(%6,38)	44(%93,61)	47

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST (2025) kurallarına göre değerlendirildi. *C. pseudotuberculosis* izolatlarının 3 (%6,38)'ünün rifampisine ve 3 (%6,38)'ünün de tetrasikline karşı dirençli olduğu tespit edildi.

Değerlendirme sonucunda, direnç gösteren izolatlardan, direnç zon çapına yakın olan izolatlardan ve duyarlı zon çapından daha geniş zon çapı gösteren izolatlardan 10' ar tane seçilerek gradient test şeritleri (e- test striptleri) kullanılarak direnç durumlarına bakıldı.

Gradient testler için; linezolid (Bioanalyse, LZ-0.016-256 µg/mL), tetrasiklin (Bioanalyse, TC-0.016-256 µg/mL), siprofloksasin (Bioanalyse, CI-0.002-32 µg/mL), rifampisin (Bioanalyse, RI-0.002-32 µg/mL), penisilin G (Bioanalyse, PG-0.016-256 µg/mL), vankomisin (Bioanalyse, VA-0.016-256 µg/mL) ve klindamisin (Bioanalyse, CM-0.016-256 µg/mL) e-test şeritleri kullanıldı.



Resim 15: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatının LZ-0.016-256 µg/mL, TC-0.016-256 µg/mL, CI-0.002-32 µg/mL, RI-0.002-32 µg/mL, PG-0.016-256 µg/mL, VA-0.016-256 µg/mL, CM-0.016-256 µg/mL e-test şeritleri kullanılarak Kanlı Mueller-Hinton Agar besiyerindeki antibiyogram testi değerlendirme görüntüleri

Tablo 13: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının e-test değerlendirme sonuçları

Antibiyotik	Kinolon	İzolat Adı	Rifamisin	İzolat Adı	Linkozamid	İzolat Adı	Glikopeptid	İzolat Adı	Oksazolidinon	İzolat Adı	Penisilin	İzolat Adı	Tetrasiklin
İzolat Adı	CI 0.002-32 µg/ml	Direnç Durumu	RI 0.002-32 µg/ml	Direnç Durumu	CM 0.016-256 µg/ml	Direnç Durumu	VA 0.016-256 µg/ml	Direnç Durumu	LZ 0.016-256 µg/ml	Direnç Durumu	PG2 0.016-256 µg/ml	Direnç Durumu	TC 0.016-256 µg/ml
Duyarlı / S Dirençli / R	S ≤ 0.001 R > 1	Duyarlı / S Dirençli / R	S ≤ 0.06 R > 0.06	Duyarlı / S Dirençli / R	S ≤ 0.5 R > 0.5	Duyarlı / S Dirençli / R	S ≤ 2 R > 2	Duyarlı / S Dirençli / R	S ≤ 2 R > 2	Duyarlı / S Dirençli / R	S ≤ 0.001 R > 1	Duyarlı / S Dirençli / R	S ≤ 2 R > 2
NCTC 3540	0.47	NCTC 3540	0.006	NCTC 3540	0.032	NCTC 3540	1.0	NCTC 3540	0.19	NCTC 3540	0.064	NCTC 3540	0.25
A3.3	0.64	B1	0.006	A3.3	0.064	A3.3	0.75	B2	0.064	B8.1	0.064	B6.2	0.25
E1 İzolat	0.64	B6.2	0.006	B6.2	0.094	B6.2	0.75	B8	0.064	D1	0.064	D1	0.25
F1	0.64	F1	0,75	F1	0.094	I2	0.75	F1	0.25	F1	2.0	F1	0.30
I2	0.94	I2	0.004	I2	0.094	K1	0.50	I2	0.25	I2	0.19	I2	1.5
J1	0.94	J1	0.006	J1	0.19	M3	1.0	J1	0.38	J1	0.094	J1	0.125
K1	0.47	E1 İzolat	0.004	M3	0.19	E1	1.0	J1.1	0.38	Ö4	0.047	O5	0.25
Ö5	0.94	O3	0.002	E1 İzolat	0.064	O1	1.0	E1	0.125	Ö16	0.064	Ö4	0.25
Ö16	0.94	Ö2	0.003	Ö6	0.125	Ö11	1.5	Ö10	0.19	Ş9	0.047	Ö20	0.25
Ş7	0.64	Ş9	0.006	Ö8	0.094	Ö20	1.5	Ö20	0.38	P1	0.064	E4	0.25

Tablo 14: *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının e-test genel değerlendirmesi

ANTİBİYOTİK GRUBU	ANTİBİYOTİK DİSKİ	KODU VE ANTİBİYOTİK DOZU	İZOLATLARIN DİRENÇ DURUMU		
			Dirençli	Duyarlı	Toplam
PENİSİLİNLER	Penisilin	PG2 (0.016-256 µg/ml)	1 (%10)	9 (%90)	10
OKSAZOLİDİNONLAR	Linezolid	LZ (0.016-256 µg/ml)	(-)	10 (%100)	10
RİFAMİSİNLER	Rifampisin	RI (0.002-32 µg/ml)	1 (%10)	9 (%90)	10
GLİKOPEPTİDLER	Vancomisin	VA (0.016-256 µg/ml)	(-)	10 (%100)	10
KİNOLONLAR	Siprofloksasin	CI (0.002-32 µg/ml)	(-)	10 (%100)	10
LİNKOZAMİDLER	Klindamisin	CM (0.016-256 µg/ml)	(-)	10 (%100)	10
TETRASİKLINLER	Tetrasiklin	TC (0.016-256 µg/ml)	(-)	10 (%100)	10

Yapılan e- test sonuçları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2025) kurallarına göre değerlendirildi. *C. pseudotuberculosis* izolatlarının 1 (%10)'inin penisiline, 1 (%10)'inin de rifampisine dirençli olduğu tespit edildi. İki antibiyotiğe de direnç gösteren izolatın aynı izolat olduğu belirlendi.

4.7. *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının 16S rRNA Sekanslanması ve Filogenetik Analizi Sonuçları

İzolatlara uygulanan 16S rRNA sekanslanması sonucunda tüm izolatlar *Bacteria>Bacillati>Actinomycetota>Actinomycetes>Mycobacteriales>Corynebacteriaceae>Corynebacterium* olarak taksonomik yönden doğrulandı.

Tablo 15: *C. pseudotuberculosis* izolatlarının sekans bilgileri

İzolat Numarası	İzolat Kodu	Kaynak	Erişim Numarası
CP1	A3.3	Koyun	PV871574
CP2	B6.1	Koyun	PV871575
CP3	F1	Koyun	PV871576
CP4	I2	Koyun	PV871577
CP5	J1.1	Koyun	PV871578
CP6	M3	Koyun	PV871579
CP7	O1	Koyun	PV871580
CP8	Ö12	Koyun	PV871581
CP9	Ş7	Koyun	PV871582
CP10	P1	Koyun	PV871583

16S rRNA genine dayalı olarak oluşturulan cins bazında Neighbor-Joining filogenetik ağacı, CP kodlu izolatların tamamının aynı ana klad içerisinde yer aldığını göstermektedir. Bu klad içerisinde *Corynebacterium pseudotuberculosis* referans suşları da (NR_119175.1, CP_021251.1) yer almakta olup bu durum, *C. pseudotuberculosis* izolatlarının referans suşlarla filogenetik açıdan yakın akrabalık ilişkisi taşıdığını ortaya koymaktadır.

16S rRNA sekanlaması yapılan tüm izolatlar; NCBI Genbank'ta bulunan Birleşik Arap Emirlikleri (MW276090), Rusya (MK965655, MK965878), Hindistan (MT649220, PP348281), İsrail (CP001809), Brezilya (CP010795, CP054555), Güney Kore (MT784766), Çin (PV628296, OQ980206, OQ363296), Mısır (PP722686) ve İran (OQ552881)'da 16S rRNA sekanlaması yapılan izolatlar ile %97,45-99,85 oranlarında benzerlik gösterdi.



Şekil 1: 16S rRNA sekansı gerçekleştirilen *C. pseudotuberculosis* izolatları ile yüksek düzeyde sekans eşleşmesi sağlanan *C. pseudotuberculosis* izolatlarının ve standart suşlarının GenBank'tan seçilmiş genomların filogenetik ağaç üzerindeki ilişkisi (Filogenetik ağaçta yer alan renkli göstergeler, izolatların kaynağı ve sınıflandırılmasına göre; kırmızı 16S rRNA dizilimiyle elde edilen saha izolatları, mavi standart suşlar, yeşil ise diğer ülkelerden elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarını göstermektedir. GenBank erişim numaraları takson isimlerinin başında belirtilmiştir.)

Bu çalışmada, *Corynebacterium pseudotuberculosis* izolatlarının filogenetik ilişkileri, 16S rRNA gen bölgesine dayalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen filogenetik ağaç türün küresel düzeyde genetik çeşitliliğini yansıtmaktadır. Aynı zamanda referans suşların bu klad içinde yer alması, bu grubun filogenetik olarak türün klasik genetik yapısını temsil ettiğini göstermektedir. Türkiye kökenli izolatların aynı klad altında güçlü bootstrap desteği ile kümelenmesi, genetik homojenliği ve muhtemelen ortak bir ata kaynağa dayalı lokal evrimsel gelişimi işaret etmektedir. Bu durum, bölgesel hastalık yayılımı, bulaşma zincirleri ve epidemiyolojik dinamikler açısından dikkat çekicidir. Ayrıca referans suşlarla aynı dalda yer alması, Türkiye'deki izolatların referans suşlarla aynı karakterde olabileceğini ve aynı özellikleri taşıyabileceğini düşündürmektedir. Dış grup olarak kullanılan *Escherichia coli* U 5/41 suşu (NR_024570.1), hedef türden net bir şekilde ayrılmıştır ve ağaç yapısının doğru kalibre edildiğini göstermektedir. Genel olarak bu sonuçlar, çalışmada elde edilen izolatların genetik olarak kümelenmesine rağmen farklı kıtalarda, ülkelerde de görülen diğer izolatlar ile genetik olarak birbirlerine benzediğini ve ortak özelliklere sahip olabileceğini göstermektedir. Bu durum, bölgesel kontrol stratejileri, aşı geliştirme süreçleri ve moleküler sürveyans açısından değerli bilgiler sunmaktadır.

5. TARTIŞMA

Corynebacterium pseudotuberculosis, küçük ruminantlarda kazeöz lenfadenite (KLA) yol açan bakteriyel bir etkindir. KLA, ölümcül olabilen, kronik ve bulaşıcı bir hastalık olması nedeniyle koyun keçi üretimi için ekonomik öneme sahip bir patojendir (Odhah ve ark. 2022, Demir ve Erdenliğ Gürbilek 2023, Di Donato ve ark. 2024). Yüksek morbiditeye, yün kayıplarına, süt ve et değerlerinin düşmesine ve dolayısıyla ekonomik gerilemeye neden olan bu hastalık küçükbaş hayvan üretimi ve et endüstrisini etkileyen önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Odhah ve ark. 2022). Ayrıca, zoonotik potansiyele sahip olmasından dolayı nadiren de olsa insanlara bulaşabilmektedir. Enfekte hayvanlarla yakın temas halinde olan bireyler için mesleki bir tehlike oluşturabilmektedir (Kyselová ve ark. 2025).

Kazeöz lenfadenit olgusu gösteren sürülerde bakterinin antimikrobiyallere zayıf yanıt göstermesi, çevresel kalıcılığı ve subklinik enfeksiyonların tanımlanmasındaki zorluklar tedavisini güçleştirmekte ve endemik bir boyuta ulaşmaktadır (Mustaffa ve ark. 2024). Kazeöz lenfadenit olgularında apsede oluşan kapsül antibiyotiğin etkisini sınırlandırdığından tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle KLA olgularında kullanılan antibiyotikler çoğunlukla semptomları ortadan kaldırmak amacıyla kullanılır ve kapsamlı tedavi sunmaz. KLA olgularında tedavi yerine koruma önem arz etmektedir. Sürülerde karşılaşılan kötü bakım besleme, sürülerin kalabalıklığı, sanitasyona dikkat edilmemesi sonucu meydana gelen meraların ve barınakların kontaminasyonu, sürülerde bulunan primer ya da sekonder enfeksiyonlar hastalığın sürülerdeki görülme oranını arttıran predispoze faktörlerdir (Sakmanoğlu ve ark. 2015). Enfekte hayvanlar klinik semptom göstermese bile enfeksiyonun ana kaynağıdır (Dopud ve ark. 2025).

Kazeöz lenfadenit olgularında *C. pseudotuberculosis* birincil etken olmasına rağmen KLA lezyonlarından zaman zaman *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus* türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces pyogenes*, *Rhodococcus equi*, *Micrococcus* türleri, *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* türleri, *Morganella morganii*, *Citrobacter* türleri, *Aeromonas* türleri ve *Moraxella* türleri dahil olmak üzere diğer mikroorganizmalar da izole edilmiştir

(Yousfi ve ark. 2024, Esmaceli ve ark. 2025). Tarhane ve Büyük (2024) koyunlardan alınan apse örnekleri ile yaptığı çalışmada apse örneklerinin %36,59'unun *C. pseudotuberculosis*, %9,76'sının *Pseudomonas* türleri ve %1,22'sinin *Enterobacter cancerogenus* olarak tespit edildiğini bildirmiştir. Firozeh ve ark. (2025) koyun ve keçilerden alınan apse örnekleri ile yaptığı çalışmada apse örneklerinin %19,6'sı *C. pseudotuberculosis* bulunurken, %7,8'i *Actinobacillus* türleri, %3,9'u *Trueperella pyogenes*, %1'i *Acinetobacter* türleri ve %1'i *Yersinia* türleri olarak tespit edilmiştir. Esmaceli ve ark. (2025) koyun ve keçilerden alınan apse örnekleri ile yaptığı çalışmada apse örneklerinin ise %68,4'ü *C. pseudotuberculosis* bulunurken, %1'i *Moraxella* türleri, %5,1'i, *Trueperella pyogenes*, %1,9'u *Micrococcus* türleri, %4,4'ü *Rhodococcus equi*, %3,8'i *Actinomyces pyogenes*, %3,2'si *Pseudomonas aeruginosa*, %2,6'sı *Bacillus* türleri, %5,8'i *Staphylococcus epidermidis*, %3,4'ü de *Staphylococcus aureus* olarak tespit edilmiştir.

Kazeöz lenfadenit olgularında *C. pseudotuberculosis* çalışmalarında ise Mısır'da yapılan bir çalışmada koyunlarda *C. pseudotuberculosis* prevalansı %45,74 olarak bildirilirken (Selim ve ark. 2022), Mısır'da koyun ve keçilerde yapılan diğer bir çalışmada ise *C. pseudotuberculosis* prevalansı %24,54 bildirilmiştir (El Damaty ve ark. 2023). Çin'de yapılan bir çalışmada keçilerde *C. pseudotuberculosis* prevalansı %39,22 olarak bildirilmiştir. (Li ve ark. 2018), Cezayir'de yapılan bir çalışmada ise *C. pseudotuberculosis* prevalansı yaşları 2-5 arasında olanlarda %16,7, yaşları 5'ten büyük olanlarda ise %33,3 olarak bildirilmiştir (Baizizi ve ark. 2024). Meksika'da yapılan bir çalışmada ise *C. pseudotuberculosis* prevalansı %35,62 olarak bildirilmiştir (Guerrero ve ark. 2018). Fas'ta yapılan bir çalışmada *C. pseudotuberculosis* prevalansı %31,1 olarak bildirilmiştir (El Khalfaoui ve ark. 2024). Türkiye'de Çetinkaya ve ark. (2002) tarafından Elazığ'da yapılan bir çalışmada koyunlarda *C. pseudotuberculosis* prevalansı %3,5, keçilerde ise %1,1 olarak bildirilmiştir. İlhan (2020) tarafından yapılan bir başka çalışmada Bigadiç Belediye Mezbahanesinden toplanan koyun akciğer örneklerinden %23,8'lik *C. pseudotuberculosis* prevalansı bildirilmiştir. İkinci Yıldız ve İçen (2022) tarafından Diyarbakır'da yapılan çalışmada *C. pseudotuberculosis* prevalansı PCR ile %28,9, ELISA ile %18,9 ve konvansiyonel yöntemler ile %13,3 olarak bildirilmiştir. Tarhane ve Büyük (2024) tarafından Çankırı'da yapılan bir çalışmada ise *C.*

pseudotuberculosis prevalansı %36,59 olarak bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında *C. pseudotuberculosis* prevalansı %44,76 olarak saptandı. *C. pseudotuberculosis* prevalansının Fas, Meksika, Mısır, Cezayir, Çin, Türkiye’de bildirilen prevalans değerlerinden yüksek olduğu, Mısır’ da bildirilen prevalans değerlerinden ise düşük olduğu belirlendi. Prevalansın yüksek çıkmasına sürülerde bulunan primer ya da sekonder enfeksiyonların, sürüde cinsiyete veya yaşa göre ayırım yapılmamasının, apselerin patlamadan önce tedavi edilmemesinin, seropozitif hayvanların itlafının gecikmesinin, kötü bakım besleme koşullarının, sürülerin kalabalıklığının ve hijyen yetersizliğinin neden olabileceği düşünülmektedir.

Dünyada genelinde yapılan çalışmalarda koyunlarda KLA olgularında lenf dokusu ve apse içeriği örnekleri kullanılmış ve alınan örneklerden *C. pseudotuberculosis*’in izolasyonu çoğunlukla koyun kanlı agar gibi zenginleştirilmiş besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir (İlhan 2020, El Damaty ve ark. 2023, Tarhane ve Büyük 2024). Benzer şekilde diğer birçok çalışmada küçük ruminantlarda KLA olgularında *C. pseudotuberculosis*’nın kültürel analizi koyun kanlı agarda gerçekleştirilmiş ve bu besiyerinin etkinliği vurgulanmıştır. (El Khalfaoui ve ark. 2024, Esmacili ve ark. 2025, İlhan 2020, El Damaty ve ark. 2023, Tarhane ve Büyük 2024, Di Donato ve ark. 2024, Guerrero ve ark. 2018) Kültür pozitif örneklerden *C. pseudotuberculosis*’in identifikasyonu genellikle fenotipik yöntemlerle yapılmaktadır. Bu amaçla kültürel ve morfolojik özelliklerinin yanı sıra katalaz, üreaz, nitrat indirgeme ve reverse CAMP testi gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır (Çetinkaya ve ark. 2002, Guerrero ve ark. 2018, El Damaty ve ark. 2023). Bu tez çalışmasında da koyunlarda KLA olgularından elde edilen apse içeriği örneklerinden *C. pseudotuberculosis* izolasyonu koyun kanlı agarda ve identifikasyonu katalaz, üreaz, nitrat indirgeme ve reverse CAMP testlerinin kullanıldığı fenotipik yöntemlerle gerçekleştirilmiş ve %66,67 (70/105) oranında *C. pseudotuberculosis* pozitifliği elde edilmiştir. Erişilebilirlik ve maliyet açısından halen yaygın kullanılan fenotipik ve biyokimyasal identifikasyon yöntemlerinin çoklu etiyojiye sahip olabilen KLA olguların tanımlanması ve *C. pseudotuberculosis* gibi çeşitli varyantları içeren bakterilerin mutlak identifikasyonunda ileri mikrobiyolojik teşhis yöntemleriyle konfirme edilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır (Tarhane ve Büyük 2024, El Khalfaoui ve ark. 2024, Esmacili ve ark. 2025). Kazeöz lenfadenitin tanısı

temel olarak koyun ve keçilerde görülen karakteristik klinik bulgular ve etkenin apselerden izole edilmesine dayanırken, kültüre edilen mikroorganizmaların *C. pseudotuberculosis* olarak tanımlanması çoğunlukla fenotipik ve biyokimyasal testlerle gerçekleştirilmektedir (Guerrero ve ark. 2018, El Damaty ve ark. 2023, Torky ve ark. 2023, El Khalfaoui ve ark. 2024, Esmaili ve ark. 2025). Fakat bakterinin biyokimyasal özellikleri yönünden elde edilen suşlar arasında görülen değişkenlikler, atipik suşların varlığı veya test yöntemlerinin yetersizliği tanının sadece bu yöntemlerle konulmasını zorlaştırmakta veya yanlış veya gecikmiş tanıya yol açmaktadır. Şüpheli izolatların tanımlanmasını kolaylaştırmak ve tanı güvenliği sağlamak amacıyla son dönemlerde *C. pseudotuberculosis*'e özgü birçok moleküler tanı yöntemi geliştirilmiştir. Moleküler teknikler arasında PCR, *C. pseudotuberculosis*'e özgü ve korunaklı gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlayarak güvenilir ve hızlı tanı sağlamaktadır (Çetinkaya ve ark. 2002, Khamis ve ark. 2004, Pacheco ve ark. 2007).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu saha ve laboratuvar ortamları için güçlü bir teşhis yöntemidir (Esmaili ve ark. 2025). *C. pseudotuberculosis*'in moleküler tanısında *pld*, *rpoB*, *16S rRNA* gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlayan PCR yöntemleri kullanılmıştır. Bu gen bölgelerinden herhangi bir tanesinin varlığı etkenin moleküler doğrulama için yeterli iken, tümünün eş zamanlı tarandığı ve tanı doğruluğu ve güvenilirliğinin daha yüksek olduğu multipleks PCR yöntemlerine de başvurulmuştur (Çetinkaya ve ark. 2002, Khamis ve ark. 2004, Pacheco ve ark. 2007, Torres ve ark. 2013, Algammal 2016, Ekinci Yıldız ve İçen 2022, El Damaty ve ark. 2023, Tarhane ve Büyük 2024). Pacheco ve arkadaşlarının 2007 yılında ve bu çalışmada da kullanılan PLD gen bölgesine ait PLD primerlerinin kullanıldığı çok sayıda çalışma bildirilmiştir (Akgül ve ark. 2018, Almeida ve ark. 2017, Foley ve ark. 2004, Guerrero ve ark. 2018, Jung ve ark. 2015, Sakmanoğlu ve ark. 2015, de Oliveira Zamprogna ve ark. 2021, El-Sebay ve ark. 2021). Yine, Çetinkaya ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı çalışmada tasarlanan 16S rRNA gen bölgesine ait 16S rRNA primerleri kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmıştır (Algammal 2016, Almeida ve ark. 2017, Kim ve ark. 2019, El Sebay ve ark. 2021, Khanamir ve ark. 2023, El Damaty ve ark. 2023, Polat ve ark. 2023, Bolotin ve ark. 2023). *rpoB* gen bölgesine ait primerler ise Khamis ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı çalışmada

tasarlanmış ve bu primerler kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmıştır (Torres ve ark. 2013, Almeida ve ark.2017, El Sebay ve ark. 2021, Abdulrahman 2021, Aftabuzzaman ve ark. 2023, Sunder ve ark. 2024) Türkiye’de yapılan bir çalışmada kültürel izolasyon ve identifikasyon sonucunda 39 izolat *C. pseudotuberculosis* yönünden pozitif bulunurken bu 39 izolatın 30 tanesi PCR yöntemi ile doğrulanmıştır (Tarhane ve Büyük 2024). Mısır’da yapılan bir çalışmada ise 120 örnekten PCR yöntemi ile 12 tanesi *C. pseudotuberculosis* yönünden pozitif olduğu doğrulanmıştır (Torky ve ark. 2023). Çin’de yapılan bir çalışmada ise 102 adet örneğin 40 tanesi *C. pseudotuberculosis* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (Li ve ark. 2018). Bu tez çalışmasında, fenotipik yöntemlerle *C. pseudotuberculosis* olarak identifiye edilen 70 adet izolatın yalnızca 47 (%67,14)’si, *16S rRNA*, *pld* ve *rpoB* genlerinin amplifikasyonunu sağlayan multipleks PCR ile *C. pseudotuberculosis* olarak doğrulandı. Böylece, KLA olgularında *C. pseudotuberculosis*’in moleküler prevalansı %44,76 (47/105) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, kültürel ve moleküler yöntemlerle elde edilen pozitiflik oranlarının, Türkiye’de yapılan benzer bir çalışmada bildirilen oranlardan düşük, Mısır ve Çin’de yapılan çalışmalarda bildirilen oranlardan ise yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Türkiye’deki çalışmalarda izolasyon ve identifikasyon oranlarının düşük olması, PCR doğrulama sonuçlarının bu tez çalışmasıyla belirli ölçüde paralellik göstermesine neden olmuştur. Bununla birlikte, bu çalışmada izolasyon ve identifikasyon oranı Türkiye’deki söz konusu çalışmadan daha yüksek bulunmasına rağmen, genel doğrulama oranı bakımından daha düşük sonuç elde edilmiştir. Bu durum, çalışmalardaki örnek sayısı, örneklerin alındığı bölge, hayvanların sağlık durumu ve kullanılan laboratuvar yöntemlerindeki farklılıklar gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilmektedir.

Corynebacterium pseudotuberculosis biyovarlarının neden olduğu hastalıklar, duyarlı konaklarda farklı klinik belirtilere neden olurlar ve biyovar tanımlaması, enfeksiyonun epidemiyolojisini anlamak ve sonuç olarak hastalık kontrolü için önemlidir. *C. pseudotuberculosis* biyovarlarını birbirinden ayıran baskın bir genetik özellik, biyovar *equi* suşlarında nitrat indirgeme operonunun varlığıdır (Almeida ve ark. 2017). Biyovar ayrımı Almeida ve ark. (2017) tarafından tasarlanan *narG* gen bölgesine ait primer veya Li ve ark. (2018) tarafından tasarlanan *fusA* gen bölgesine

at primerler kullanılarak PCR yöntemi ile teşhis edilmektedir. Bu tez çalışmasında narg gen bölgesine ait primerler kullanıldı ve tüm izolatlar *C. pseudotuberculosis* biyovar ovis olarak tespit edildi.

Virülans faktörleri, patojen bakterilerin yapışması, istilası, kolonizasyonu, konakçı içinde yayılması ve bağışıklık sisteminden kaçmasında, ayrıca konakçı içinde temas, penetrasyon ve hayatta kalmayı sağlamasında önemli bir rol oynar (Soares ve ark. 2013). *C. pseudotuberculosis* virülansında; integral membran proteini (FagA), demir enterobaktin taşıyıcısı (FagB), ATP bağlayıcı sitoplazmik membran proteini (FagC), demir siderofor bağlayıcı protein (FagD), prolin iminopeptidazı (PIP), oligopeptid permease (*Opp*), pili tip protein C (*Spa C*), nöromidinase (*NanH*), süperoksit dismutase (*SodC*), sigma faktör E(SigE), nöroaminidaz (*NanH*), bakır direnci proteini (CopC), glutaredoksin benzeri protein (NrdH), pilus birleşme proteini (CpaE) ve protein kinaz C (*PknG*) genlerinin rol oynadığı belirtilmiştir (Li ve ark. 2018, Pathirana ve ark. 2022, Soares ve ark. 2013, Nagaraja 2022).

Ruiz ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan bir çalışmada 2 *C. pseudotuberculosis* izolatının genomu analiz edilmiş ve patojenite adacıklarında bulunan FagA, FagB, FagC, FagD ve PIP gen bölgelerinin virülansda rol aldığı bildirilmiştir. De Sa ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı bir çalışmada tasarlanan, FagA gen bölgesine ait primerler, FagB gen bölgesine ait primerler, FagC gen bölgesine ait primerler, FagD gen bölgesine ait primerler kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (de Sa ve ark. 2013, El Damaty ve ark. 2023, Li ve ark. 2018). de Sa ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada izolatların %100'ünün FagA ve FagB gen bölgesini taşıırken %99,40'ının FagC, %95,23'ünün de FagD gen bölgesini taşıdığını bildirmiştir. Li ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise izolatların %100'ünün FagA, FagB, FagC ve FagD gen bölgesini taşıdığı bildirilmiştir. El Damaty ve ark. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada ise FagA gen bölgesi koyun ve keçilerden alınan tüm izolatlarda bulunurken, FagB, FagC ve FagD gen bölgesinin koyun izolatlarında sırasıyla %100, %83 ve %75'inde, keçi izolatlarında ise %87, %87 ve %60'ında bulunduğu bildirilmiştir. Ülkemizde koyunlarda KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarında FagA, FagB, FagC ve FagD bölgelerinin PCR ile analizi üzerine gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bir diğer

virülansta rol oynayan PIP geni D'Afonseca ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada tasarlanan PIP gen bölgesine ait primerler kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (Kumar ve ark.2012, Parin ve ark. 2018, El Damaty ve ark. 2023, Yeshitila ve ark. 2024). El Damaty ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada koyun ve keçilerden alınan tüm izolatlarda, Yeshitila ve ark. (2024) tarafından *C. pseudotuberculosis*'in teşhisi için yapılan çalışmada koyun ve keçilerden toplanan örneklerden sırasıyla %9 ve %8,9'unda, Parin ve ark. (2018) tarafından *C. pseudotuberculosis*'in teşhisi için yapılan çalışmada koyunlardan toplanan apse örneklerinin %17'sinde, Kumar ve ark. (2012) tarafından *C. pseudotuberculosis*'in teşhisi için yapılan çalışmada ise örneklerin %2,4'ünde PIP gen bölgesi bulunduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında koyunlarda KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarında *FagA* gen pozitifliği %100 (47/47), *FagB* gen pozitifliği %100 (47/47), *FagC* gen pozitifliği %100 (47/47), *FagD* gen pozitifliği 23 %48,94 (23/47) ve *PIP* gen pozitifliği %25,53 (12/47) olarak saptanmıştır. Diğer çalışmalarla kıyaslandığında virülans gen frekanslarındaki bu farklılıkların bakterinin evrimsel ve genetik farklılıkları, operon yapısı ve dağılım farklılıkları, kaynak ve invazivite farkları, coğrafi ve genetik çeşitlilikle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonunun klinik tedavisi antibiyotik tedavisi veya cerrahi müdahaleyle yapılmaktadır. Ampirik ve aşırı antibiyotik kullanımı *C. pseudotuberculosis* izolatları arasında antimikrobiyallere dirençli suş yaygınlığını artırmakta ve tedavi başarısını olumsuz etkilemektedir (Li ve ark. 2024, İlhan 2020). Klinik sahada KLA olgularının tedavisinde yaygın kullanım alanı bulan siprofloksasin, klindamisin, rifampisin, penisilin, vankomisin, linezolid ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç oranları değişkenlik arz etmektedir (Abdulrahman 2021, Algammal 2016, El Damaty ve ark. 2023, Sunder ve ark. 2024). Genellikle hızlı tanı amaçlı Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilen antibiyotik duyarlılık testleri, MİK değerlerinin belirlendiği gradient testlerle (E-test) de desteklenmiştir (Gallardo ve ark. 2019, Heggelund ve ark. 2015, Markova ve ark. 2024). Abdulrahman tarafından 2021 yılında Irak'ta yapılan çalışmada KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* suşlarının tamamının siprofloksasin ve klindamisine karşı duyarlı olduğu, rifampisine ise %81,8 oranında duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir. Mısır'da Algammal tarafından 2016 yılında yapılan bir

çalışmada KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının çoğunun (%96,2) penisiline dirençli oldukları, siprofloksasine ise oldukça duyarlı (%96,2) oldukları bildirilmiştir. Mısır'da El Damaty ve arkadaşları tarafından 2023 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının penisilin ve vankomisine dirençliliği (%92,6 ve %7,4) olarak bildirilmiştir. Hindistan'da 2024 yılında Sunder ve arkadaşlarının 2024 yılında yapmış olduğu çalışmada ise KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının rifampisine karşı %100 dirençli olduğu, siprofloksasin, penisilin ve vankomisine karşı %50 dirençli olduğu ve tetrasikline %75 duyarlı olduğu bildirilmiştir. Torky ve arkadaşlarının 2023 yılında yapmış olduğu çalışmada ise KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının %100'ünün siprofloksasine ve %91,6'sının ise klindamisine duyarlı olduğu bildirilmiştir. Yeshitila ve ark. (2024) yapmış olduğu çalışmada ise KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının tamamının tetrasikline ve siprofloksasine duyarlı olduğu bildirilmiştir. Meng ve arkadaşlarının 2023 yılında yapmış olduğu çalışmada ise KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının tamamının tetrasikline, siprofloksasine, rifampisine, vankomisine ve penisiline duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde ise 2020 yılında İlhan tarafından yapılan çalışmada KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatların %75'inin penisiline ve %81,2'sinin tetrasikline duyarlı oldukları bildirilmiştir. Tarhane ve Büyük tarafından 2024 yılında yapılan çalışmada ise KLA olgularından elde edilen *C. pseudotuberculosis* izolatlarının penisiline karşı %60'ının duyarlı, %40'nın ise dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, koyunların KLA olgularından tanımlanan *C. pseudotuberculosis* izolatlarının 3 (%6,38)'ünün rifampisine ve 3 (%6,38)'ünün de tetrasikline karşı dirençli olduğu disk difüzyon yöntemi ile tespit edildi. Dirençli izolatlar, direnç zon çapına yakın olan izolatlar ve duyarlı izolatlardan 10'ar adet seçilerek gerçekleştirilen gradient test ile izolatların 1 (%10)'ünün penisiline, 1 (%10)'ünün de rifampisine dirençli olduğu tespit edildi. Bu çalışmada antibiyotiklere karşı duyarlılık durumları, EUCAST 2025 kriterleri esas alınarak değerlendirilmiştir. Ancak vankomisin ve linezolid özellikle çoklu ilaç dirençli Gram-pozitif bakterilerin tedavisinde son çare antibiyotikler arasında olup, Dünya Sağlık Örgütü tarafından da “insan sağlığı için kritik” kategorisinde

sınıflandırılmaktadır. Türkiye'de 2024 yılında yürürlüğe giren “İnsanlarda Belirli Enfeksiyonların Tedavisi İçin Ayrılmış Antimikrobiyallerin veya Antimikrobiyal Gruplarının Belirlenmesi Hakkında Tebliğ” kapsamında, linezolid (oksazolidinon grubu) ve vankomisin (glikopeptid grubu) gibi antibiyotiklerin veteriner hekimlikte kullanımı yasaklanmıştır. Bu durum, söz konusu antibiyotiklere karşı gözlenen direnç düzeylerinin, doğrudan veteriner kullanıma bağlı değil; çevresel maruziyet, önceki uygulamalar ya da yatay gen transferi gibi dolaylı yollarla şekillenebileceğini düşündürmektedir. Veteriner sahada yaygın kullanılan diğer antibiyotiklere karşı direnç durumunun değişkenlik göstermesi enfeksiyonun seyri, antibiyotik kullanım geçmişi, izolatların genetik ve biyotip farklılıkları, direnç gen farklılıkları, coğrafi ve ekolojik farklılıklar gibi nedenlerle olabilir.

16S rRNA gen dizilimi, çeşitli kaynaklardan izole edilen bakterilerin tanımlanması için oldukça güçlü bir araç olarak tanımlanmaktadır. Epidemiyolojik ve filogenetik analizlerde sıklıkla kullanılan 16S rRNA gen dizilimi ülkeler arasındaki sınır nedeniyle farklı coğrafyalardaki olası ortak ata salgınlarını ve suş benzerliklerini ortaya çıkarabilir (Janda ve Abbott 2007). Dünya genelinde *C. pseudotuberculosis*' in filogenetik ağacının çıkarılmasında 16s rRNA sekanslaması üzerine çalışmalar yapılmıştır. (Pascual ve ark. 1995, Takahashi ve ark. 1997, El Damaty ve ark. 2023). Türkiye' de ise *C. pseudotuberculosis*' in filogenetik ağacının çıkarılmasında 16s rRNA sekanslaması üzerine çalışmalara rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, 16S rRNA sekanslama ve sonrasında oluşturulan filogenetik ağaç ile *C. pseudotuberculosis* izolatlarının tamamının aynı ana klad içerisinde yer aldığını gösterilmiştir. Aynı zamanda referans suşların bu klad içinde yer alması, bu grubun filogenetik olarak türün klasik genetik yapısını temsil ettiğini göstermektedir. Farklı ilçelerden ve köylerden alınan saha izolatlarının birbirine yakın pozisyonlarda yer almaları bu izolatların genetik olarak benzer veya aynı kökenden türemiş olabileceğini düşündürmektedir. Türkiye kökenli izolatların aynı klad altında güçlü bootstrap desteği ile kümelenmesi, genetik homojenliği ve muhtemelen ortak bir ata kaynağa dayalı lokal evrimsel gelişimi işaret etmektedir. Bu durum, bölgesel hastalık yayılımı, bulaşma zincirleri ve epidemiyolojik dinamikler açısından dikkat çekicidir. Ayrıca referans suşlarla aynı dalda yer alması, Türkiye'deki izolatların referans

suşlarla aynı karakterde olabileceğini ve aynı özellikleri taşıyabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada oluşturulan filogenetik analiz, *C. pseudotuberculosis* suşları arasındaki genetik benzerliği ve farklılıkları açık bir şekilde ortaya koymuştur. Özellikle saha izolatlarının referans suşlarla olan yüksek genetik yakınlığı, izolatların doğru tanımlandığını ve potansiyel olarak benzer patojenik özelliklere sahip olabileceklerini düşündürmektedir. Bu durum, saha izolatlarının tanı ve aşı geliştirme çalışmalarında referans suşlara alternatif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.



6. SONUÇ

Bu çalışma, Kars ilinde kazeöz lenfadenit (KLA) olgusu görülen koyunlardan alınan apse içeriği örneklerinden *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in izolasyonu, fenotipik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, elde edilen izolatların virülans genlerinin ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi ve 16S rRNA temelli sekans analizleri ile identifikasyonun doğrulanması ve filogenetik pozisyonlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, 105 apse içeriğinin 95'inde (%90,48) kültür pozitifliği saptanmasına rağmen, fenotipik testler izolatlardan 70'i (%66,67) *C. pseudotuberculosis* olarak tanımlanmıştır. 16S rRNA, *pld* ve *rpoB* gen bölgelerini hedefleyen multipleks PCR ile izolatların yalnızca 47'si (%67,14) *C. pseudotuberculosis* olarak doğrulanmıştır. Böylece yöre koyunlarında KLA olgularında *C. pseudotuberculosis*'in moleküler prevalansı %44,76 olarak belirlenmiştir. PCR ile tüm izolatlar *C. pseudotuberculosis* biyovar *ovis* olarak tiplendirilmiştir. Bu bulgular, KLA olgularında *C. pseudotuberculosis* tür ve varyantlarının saptanmasında PCR'nin yüksek özgüllüğe sahip olduğunu gösterirken, konvansiyonel ve fenotipik testlerin PCR temelli moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Corynebacterium pseudotuberculosis izolatlarının PCR ile virülans gen analizi kapsamında ise *FagA*, *FagB* ve *FagC* genleri tüm izolatlarda (%100) tespit edilirken, izolatlar arasında *FagD* genine %48,94, *PIP* genine ise %25,53 oranında rastlanmıştır. Bu durum, klinik belirtilere sahip KLA olgularından tanımlanan suşların potansiyel yüksek patojenitesini göstermekte olup, bu virülans genlerinin varlığı aşı ve kontrol çalışmalarında dikkate alınmalıdır.

Çalışmada, tanımlanan *C. pseudotuberculosis* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı analizler sonucu çoğunlukla penisilin, rifampisin ve tetrasikline duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Bölgede etkene yönelik tedavilerde bu durumun dikkate alınması gerekmektedir.

Çalışmada, tanımlanan 10 adet *C. pseudotuberculosis* izolatının 16S rRNA sekans ve filogenetik analizleri yapılmış, tüm izolatların *C. pseudotuberculosis* tür kompleksine ait olduğu ve referans suşlarla %97,45–99,85 oranlarında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum 16S rRNA sekanslamanın *C. pseudotuberculosis*'in tür ve tür içi varyantlarının (biyovar) tanımlanmasında yeterli duyarlığa sahip olduğunu ortaya koymakla birlikte, ilave belirteçlerle desteklenmesi gerekebileceğini de göstermektedir. Çalışmada ayrıca, Kars ilinde koyunlarda KLA olgularından saptanan *C. pseudotuberculosis* suşlarının hem fenotipik hem de genetik açıdan farklı atalardan kaynaklı olabilecek çeşitli alt tiplere sahip olduğunu göstermektedir.

Corynebacterium pseudotuberculosis'in fakültatif hücre içi bakteri olması ve apselerde oluşturduğu kapsül nedeniyle hem hücresel savunma mekanizmalarından kaçmasına hemde antibiyotiklerin etkisini sınırlandırmasına neden olmaktadır. Ayrıca apseler sayesinde immun kaçış, antijenik varyasyon ve suş farklılığı, aşılardan oluşturduğu yetersiz hücresel immunité, virölans faktörlerinin immun sistemi baskılayıcı etkisi ve aşının kısa süreli koruyuculuğu gibi nedenlerle de hastalığın önüne geçilememesi bakteriyi önemli kılmaktadır. *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonlarından korunmak amacıyla yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi, sürülerde düzenli taramaların yapıp pozitif çıkan hayvanların izolasyonu ve eradikasyonu, kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapılarak bulaşmanın minimuma indirilmesi, sürü sanitasyonunun sağlanması, kullanılan bakım ve besleme aletlerinin rutin dezenfeksiyonunun sağlanması, hayvan yetiştiricilerinin bilinçlendirilmesi, farklı suşları içeren kapsamlı, etkili aşılardan üretilmesi ve aşılama çalışmalarının yapılması gerekmektedir. *C. pseudotuberculosis*'e yönelik tanı, tedavi, koruma ve kontrol stratejileri planlanırken etkenin fenotipik ve genotipik davranışlarının ve yöreye özgü bu veri çeşitliliğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Ayrıca hastalığa yönelik antibiyotik tedavisinin yeterli olmadığı için etkene yönelik aşı çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin aşı çalışmalarında faydalı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdulrahman RF:** Virulence potential, antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from caseous lymphadenitis in sheep and goats in duhok city, iraq. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 9(6), 919-925, 2021.
- Aftabuzzaman M, Pioquinto JM, Espiritu H, Valette EJ, Kim SH, Jin SJ ve Cho YI:** Pilot study on the distribution of caseous lymphadenitis in Korean native goats and the relationship between sex and age in disease occurrence. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1274359, 2023.
- Akbaş E:** Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/rehberler/UMS_LabTaniRehberi_Cilt_1.pdf, 2014.
- Al-Gaabary MH, Osman SA, Oreiby AF:** Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Ruminant Research*, 87, 116–121, 2009.
- Algammal A:** Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats suffering from caseous lymphadenitis. *Zagazig Veterinary Journal*, 44(1), 1-8, 2016.
- Almeida S, Dorneles EM, Diniz C, Abreu V, Sousa C, Alves J, Azevedo V:** Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar Ovis and Equi. *BMC Veterinary Research*, 13, 1-8, 2017.
- Alves JRA, de Farias AEM, da Silva JD, Viana MP, Lima AMC, Faccioli-Martins PY, Alves CJ:** Factors associated with the seroprevalence of caseous lymphadenitis in sheep from Northeastern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 182, 105098, 2020.
- Anonim:** Tarım ve Orman Bakanlığı, İllere Göre Küçükbaş Hayvan Sayıları, 2024. <https://albinacmsfile.albinasoft.com/Dosyalar/61/311/LK311D126022025144544O63.pdf> Erişim Tarihi: 07.06.2025)
- Aquino de Sá Mda C, Gouveia GV, Krewer Cda C, Veschi JL, de Mattos-Guaraldi AL, da Costa MM:** Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. *Genet Mol Biol.*, 36(2):265-268, 2013.
- Araújo CL, Alves J, Nogueira W, Pereira LC, Gomide AC, Ramos R, Azevedo V, Silva A, Folador A:** Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. *Gene*, 702, 36-45, 2019.
- Arsenault J, Girard C, Dubreuil P, Daignault D, Galarneau JR, Boisclair J, Simard C, Bélanger D:** Prevalence of and carcass condemnation from maedi–visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.*, 59, 67–81, 2003.
- Baazizi R, Mimoune N, Chahed A, Baroudi D, Ramoul K, Abdul-Hussain AS ve Khelef D:** Prevalence and identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in slaughtered sheep in central Algeria. *Veterinarska stanica*, 55(3), 2024.
- Baird G:** Current perspectives on Caseous lymphadenitis. *In practice* 25, 62-68, 2003.

- Baird GJ, Fontaine MC:** *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J Comp Pathol.* 137(4), 179-210, 2007.
- Barksdale L, Linder R, Suleal T, Pollice M:** Phospholipase D Activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a Distinctive Marker Within the Genus *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol.* 13(2):335-43. 1981. <https://doi.org/10.1128/jcm.13.2.335-343.1981> PMID:7204550
- Bastos BL, Dias Portela RW, Dorella FA, Nbia RD, Castro TLP, Miyoshi A, Oliveira SC, Meyer R, Azevedo A:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models ve Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunol*, 4 (5), 1-15, 2012.
- Batey RG:** Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust Vet J*, 63, 269-272, 1986.
- Bernard KA, Funke G:** *Corynebacterium*. In: Whitman WB, Rainey FA, Kmpfer P, Trujillo ME, Chun J, DeVos P, Hedlund B, Dedysh S (Eds): *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Wiley Online Library, p: 245-300, 2015.
- Binns SH, Bailey M, Green LE:** Postal survey of ovine Caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Vet Record*, 150(9), 263-268, 2002.
- Bolotin VI, Kalinichenko TV, Marchenko NV, Kutsenko VA, Ramazanov TP, Karkhut TO:** A study of caseous lymphadenitis in goats from a smallholder farm in Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 9(3), 3-5, 2023.
- Brum AA, de Fatima Silva Rezende A, Brilhante FS, Collares T, Begnine K, Seixas FK, Collares TV, Dellagostin OA, Azevedo V, Santos A, Portela RW, Borsuk S:** Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. *J Med Microbiol*, 66, 635-642, 2017.
- Burmayan A, Brundage CM:** Caseous lymphadenitis outbreak in a small ruminant herd. *Open Vet. J.* 11, 530-534, 2021.
- Burrell DH:** Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. *Research in Veterinary Science*, 24, 269-276, 1978.
- Carter GR:** *Corynebacterium*. In *Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology*. Elsevier. 263-270, 1990.
- Citartan M:** Aptamers as the powerhouse of dot blot assays. *Talanta*, 1;232:122436, 2021.
- Cuevas WA, Songer JG:** *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Infect Immun.* 61(10), 4310-4316, 1993.
- etinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, De Baere T, Vaneechoutte M:** Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary microbiology*, 88(1), 75-83, 2002.
- D'Afonseca V, Prosdocimi F, Dorella FA, Pacheco LGC, Moraes PM, Pena I, Azevedo V:** Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiological research*, 165(4), 312-320, 2010.

de Oliveira Zamprogna T, Ribeiro D, Azevedo VAC, Lara GHB, Motta RG, da Silva RC, Siqueira AK, de Nardi Júnior G, Listoni FJP, de Souza Araújo Martins L, da Silva AV, Portilho FVR, da Rocha Mota A, Rodrigues CA, de Almeida BO, Ribeiro MG: Bacteriological, cytological, and molecular investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mycobacteria, and other bacteria in caseous lymphadenitis and healthy lymph nodes of slaughtered sheep. *Braz J Microbiol.* 52(1), 431-438, 2021.

de Pinho RB, de Oliveira Silva MT, Bezerra FSB, Borsuk S: Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(6), 2287-2296, 2021.

Demir M, Erdenlig Gürbilek S: Açlık Stresine Maruz Kalan *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in SDS-PAGE İle Proteinlerinin Analizi. *Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 12(2), 223-227, 2023.

Dercksen DP, Brinkhof JMA, Dekker-Nooren T, Van Maanen K, Bode CF, Baird G, Kamp EM: A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet Microbiol*, 75, 167–175, 2000.

Di Donato A, Gambi L, Ravaioli V, Perulli S, Cirasella L, Rossini R, Luppi A, Tosi G ve Fiorentini L: First Report of Caseous Lymphadenitis by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and Pulmonary Verminosis in a Roe Deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) in Italy. *Animals*, 14(4), 566, 2024.

Dopud M, Reil I, Zdelar-Tuk M, Špičić S, i Duvnjak S: Caseous Lymphadenitis in sheep and goats – “Cheese Glands”. *Veterinarska stanica*, 56 (3), 303-316, 2025.

Dorella FA, Pacheco LG, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V: *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res.*, 37(2), 201-218, 2006.

Dorella FA, Pacheco LG, Seyffert N, Portela RW, Meyer R, Miyoshi A, Azevedo V: Antigenes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Rev Vaccines.*, 8(2), 205-213, 2009.

Eggleton DG, Haynes JA, Middleton HD, Cox JC: Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Aust Vet J*, 68(10), 322–325, 1991.

Ekinci Yıldız A, İçen H: Koyunlarda Kazeöz Lenfadenitisin Moleküler ve ELISA Yöntemiyle Karşılaştırmalı Teşhisi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(2), 104-109, 2022.

El Damaty HM, El-Demerdash AS, Abd El-Aziz NK, Yousef SG, Hefny AA, Abo Remela EM, Shaker A, Elsohaby I: Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibilities of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated from Caseous Lymphadenitis of Smallholder Sheep and Goats. *Animals*, 13(14), 2337, 2023.

El Khalfaoui, N, El Amiri B, Cabaraux JF, Chentouf M, Raes M, Marcotty T, Kirschvink N: Rearing Management and Its Impact on Caseous Lymphadenitis in Sheep. *Animals (Basel)*, 14(10), 1504, 2024.

- El-Sebay NA, Abd Elmonem MM, El-Sergany EF, M Abbas A, M Osman R ve Abd El-Moaty DA:** Genetic Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates in Egypt. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 6(2), 15-21, 2021.
- El Tawab AAA, Rizk AM, Afifi SE ve Mohamed SR:** *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in small ruminant and molecular study of virulence and resistance genes in Beni-Suef governorate. *BVMJ*, 37 (1), 122-127, 2019.
- Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Sakmanoğlu A, Sayın Z, Pınarkara Y:** Efficacies of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines against caseous lymphadenitis in mice and sheep. *Eurasian J Vet Sci.*, 30(2), 72–79, 2014.
- Esmaceli H, Joghataei SM, Khanjari A, Khiyabani FHA:** Comprehensive survey of caseous lymphadenitis in sheep and goat flocks of Iran: clinical, bacteriological, and molecular insights. *Small Rumin Res.*, 246, 107490 2025.
- EUCAST:** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 15.0, 2025. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_15.0_Breakpoint_Tables.pdf Erişim Tarihi: 11.06.2025.
- Firozeh A, Mohammadi GR, Rad M:** Clinical and microbiological insights into caseous lymphadenitis in sheep and goats of Khorasan Razavi, Iran. *Arch Razi Inst.*, 7:[Epub ahead of print], 2025.
- Foley JE, Spier SJ, Mihalyi J, Drazenovich N, Leutenegger CM:** Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. *American journal of Veterinary Research*, 65(12), 1734-1737, 2004.
- Fontaine MC, Baird G, Connor KM, Rudge K, Sales J ve Donachie W:** Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24, 5986-5996, 2006.
- Fontaine M, Baird GJ:** Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*. 76, 42-48, 2008.
- Fu MZ, Xu X, Cheng Z, Zhu J, Sun A, Xu G, An X:** Combined Transcriptomic and Proteomic of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in the Spleen of Dairy Goats, *Animals*, 12, 3270, 2022.
- Gallardo A, Toledo R, González Pasayo RA, Azevedo V, Robles C, Paolicchi FA, Estevao Belchior S:** *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis: Evaluation of antibiotics susceptibility in vitro. *Rev Argent Microbiol.*, 51(3), 335–341, 2019.
- Gascoigne E, Ogden N, Lovatt F ve Davies P:** Update on caseous lymphadenitis in sheep. *In practice*, 42, 105-114, 2020.
- Guerrero JAV, de Oca Jiménez RM, Dibarrat JA, León FH, Morales-Erasto V, Salazar HGM:** Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. *Microbial Pathogenesis*, 117, 304-309, 2018.
- Guimaraes AS, Seyffert N, Bastos BL:** Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Rumin. Res.* 87, 86-91, 2009.

Guimarães AS, Carmo FB, Heinemann MB, Portela RW, Meyer R, Lage AP, Seyffert N, Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia AM: High seroprevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC. Vet. Res.* 7, 68, 2011.

Guimaraes AS, Carmo FB, Pauletti RB, Seyffert N, Ribeiro D, Lage AP, Heinemann MB, Miyoshi A, Azevedo V ve Guimaraes Gouveia AM: Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *The IIOAB J.* 2, 33-43, 2011.

Gülmez Sağlam A, Otlı S, Coşkun MR, Çelik E, Büyük F, Şahin M: Prevalence of subclinical mastitis in cows, isolation of agents and determination of their antibiotic susceptibility. *Eurasian J Vet Sci*, 34 (2), 92-98, 2018.

Habte D: Caseous lymphadenitis: A case of sheep and its management in Ethiopia. *Ethiop. Vet. J.* 23, 187-195, 2023.

Habuš J, Matanović K, Štritof Majetić Z, Rukavina T, Ćorić A, Milas Z, Starešina V, Šeol Martinec B, Turk N: Comparison of the epizootiological and clinical features of caseous lymphadenitis and Morel's disease in goats. *Vet. Arhiv*, 85, 163-173, 2015.

Hard GC: Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. *Journal of Medical Microbiology*, 5, 483-491, 1972.

Heggelund L, Gaustad P, Håvelsrud OE, Blom J, Borgen L, Sundset A, Sørum H, Frøland SS: *Corynebacterium pseudotuberculosis* Pneumonia in a Veterinary Student Infected During Laboratory Work. *Open Forum Infect Dis*, 2(2), 1–5, 2015.

İlhan Z: Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis*' in ELISA ve Dot-Blot ELISA ile Teşhisi. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27(6), 713–720, 2003.

İlhan Z: In vitro antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep with caseous lymphadenitis, 13(2), 267-271, 2020.

İpek V, Akgül Ö, Kahraman MM, Öztürkoğlu Sİ, Büyükcangaz E., Mecitoğlu Z, Mecitoğlu GY: Merinos Irkı Bir Koyunda İç Organ Tutulumlu Kazeöz Lenfadenitis Olgusu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 31(2), 71-76, 2012.

Jaén-Luchoro D, Gonzales-Siles L, Karlsson R, Svensson-Stadler L, Molin K, Cardew S, Jensie-Markopolous S, Ohlén M, Inganäs E, Skovbjerg S, Tindall BJ, Moore ERB: *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and environmental associated *corynebacterium*. *Syst Appl Microbiol.* 43(1), 126039, 2020.

Janda JM, Abbott SL: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.*, 45(9), 2761–2764, 2007.

Jung BY, Lee SH, Kim HY, Byun JW, Shin DH, Kim D, Kwak D: Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Tropical Animal Health and Production*, 47, 657-661, 2015.

Khamis A, Raoult D, La Scola B: *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 42, 3925–3931, 2004.

- Khanamir RA, Issa NA ve Abdulrahman RF:** First study on molecular epidemiology of caseous lymphadenitis in slaughtered sheep and goats in Duhok Province, Iraq. *Open Veterinary Journal*, 13(5), 588-598, 2023.
- Kim SW, Han SJ, Lee YR, Kim BY ve Park SC:** First report of a Risso's dolphin (*Grampus griseus*) stranded in Jeju Island, Republic of Korea: findings from necropsy, histopathology and microbiome analysis. *Veterinary Record Case Reports*, 7(4), e000860, 2019.
- Kittl S, Studer E, Brodard I, Thomann A, Jores J:** *Corynebacterium uberis* sp. nov. frequently isolated from bovine mastitis. *Syst Appl Microbiol*, 45(4), 126325, 2022.
- Kumar J, Singh F, Tripathi BN, Kumar R, Dixit SK ve Sonawane GG:** Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in Sirohi goats of Rajasthan, India. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1319-1322, 2012.
- Kyselová J, Tichý L, Marková J, Gurgul A, Sztankóová Z, Vališ K, Šlosárková S, Kavanová K, Beinhauerová M, Szmátola T:** Genome-wide association study of the antibody response to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep, *Arch. Anim. Breed.*, 68, 109–124, 2025.
- Leal KS, deOliveira SilvaMT, de Fátima Silva RezendeA, Bezerra FSB, Begnini K, Seixas F, Collares T, Dellagostin O, Portela RW, de Carvalho Azevedo VA, Borsuk S:** Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine*, 36, 3578–3583. 2018.
- Leber AL:** Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th ed. Washington (DC): *ASM Press*, 2016.
- Li H, Yang H, Zhou Z, Li X, Yi W, Xu Y, Wang Z, Hu S:** Isolation, Antibiotic Resistance, Virulence Traits and Phylogenetic Analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Goats in Southwestern China. *Small Ruminant Research*, 168, 69-75, 2018.
- Li D, Jiang Y, Cui Z, Ma M, Zhu F, Li G, Ma W:** *Lactobacillus acidophilus* protects against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection by regulating the autophagy of macrophages and maintaining gut microbiota homeostasis in C57BL/6 mice. *MSystems*, 9(7), e00484-24, 2024.
- Lopez J, Wong F ve Quesada J:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*. First case of human infection. *American Journal of Clinical Pathology*, 46, 562-567. 1966.
- Markova J, Langova D, Babak V ve Kostovova I:** Ovine and Caprine Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* on Czech Farms-A Comparative Study. *Microorganisms*, 12, 875, 2024.
- Meng W, Chen S, Huang L, Yang J, Zhang W, Zhong Z, Zhou Z, Liu H, Fu H, He T ve Peng G:** Isolation, characterization and pathogenicity assessment of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strains from alpacas (*Vicugna pacos*) in China. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1206187, 2023.
- Menzies PI, Muckle CA, Hwang YT, Songer JG:** Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Small Rumin Res.*, 13, 193–198, 1994.
- Middleton MJ, Epstein WM, Gregory GG:** Caseous lymphadenitis on Flinders Island: Prevalence and management surveys. *Aust. Vet. J.*, 68, 311–312, 1991.

- Mustaffa NDAN, Hian CM, Al-Rashdan Y, Al-Jaff KM, Ghazali MF, Ibrahim NS:** Comprehensive Review On Prevalence Of Caseous Lymphadenitis (Cla) In Dairy Goats, *A Systematic Review And Meta-Analysis Veterinary Integrative Sciences*, 23(3), 2024.
- Nagaraja TG:** *Corynebacterium*. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa M M, Wilkes R (Eds): *Veterinary Microbiology* (4th ed.), John Wiley & Sons, Inc. 2022.
- Nascimento Sousa SM, Sodre Lima AC, Goncalves De Moura VA:** *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis strains isolated from small ruminants herds from the Brazilian Amazon present clonal genomic profile. *Small Rumin. Res.*, 233, 107227, 2024.
- O'Reilly KM, Green LE, Malone FE, Medley GF:** Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Prev Vet Med.*, 83, 242–259, 2008.
- Odiah MN, Firdaus F, Thlama P, Chung ELT, Faeza M, Norsidin M, Garba B, Mohd LM:** A Current Review on Mycolic Acid Immunogen of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 12(2), 177-186, 2022.
- Oliveira A, Oliveira LC, ABURJAILE F:** Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertaining the Role of Pathogenic and Nonpathogenic Species. *Front. Microbiol.* 8, 1937, 2017.
- Osman AY, Nordin ML, Kadir AA ve Saharee AA:** The Epidemiology and Pathophysiology of Caseous Lymphadenitis. *J. Vet. Med. Res.*, 5, 1129. 2018.
- Pacheco LG, Pena RR, Castro TL, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R ve Azevedo, V:** Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of medical microbiology*, 56(4), 480-486, 2007.
- Parin U, Kirkan S, Ural K, Savasan S, Erbas G, Gultekin M ve Balikci C:** Molecular identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Acta Veterinaria Brno*, 87(1), 3-8, 2018.
- Pascual C, Lawson PA, Farrow JA, Gimenez MN ve Collins MD:** Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *International journal of systematic bacteriology*, 45(4), 724–728. 1995.
- Pathirana HNKS, Cho HS, Cho YI., Kim CL, Wimalasena SHMP, Rajapaksha LGTG, Shin GW:** Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from skin abscesses of native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 2074-2082. 2022.
- Paton MW, Walker SB, Rose IR, Watt GF:** Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust Vet J.* 81(1-2):91-95, 2003.
- Pepin M, Pittet JC, Olivier M ve Gohin I:** Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *Journal of Leukocyte Biology*, 56, 666-670. 1994.
- Pépin M, Seow HF, Corner L, Rothel JS, Hodgson AL, Wood PR:** Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet Res*, 28(2), 149-163, 1997.

- Piontkowski M ve Shivvers D:** Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J Am Vet Med Assoc*, 212, 1765–1768, 1998.
- Polat E, Kaya E, Karagülle B ve Akin H:** Effects of caseous lymphadenitis agent (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) isolated from superficial abscesses of sheep on oxidative stress factors: Oxidative Stress in Sheep with Caseous Lymphadenitis. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 74(3), 6213-6221, 2023.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD:** Veterinary medicine (10th ed.), *Saunders Elsevier*, Philadelphia, p: 795–798, 2007.
- Rezende AFS, Brum AA, Reis CG, Angelo HR, Leal KS, Silva MTO, Simionatto S, Azevedo V, Santos AR, Portela RW, Dellagostin O, Borsuk S:** In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. *J Med Microbiol*, 65, 521–529, 2016.
- Ribeiro D, Rocha FDS, Morais K, Leite C, Soares SDC, Silva A, Wagner R, PortelaD, Meyer R, Miyoshi A, Oliveira SC, AzevedoV, Dorella FA:** An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Vet Res*, 45(1), 1–6, 2014.
- Ruiz JC, D'Afonseca V, Silva A, Ali A, Pinto AC, Santos AR ve Azevedo V:** Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PloS one*, 6(4), e18551, 2011.
- Sağlam YS, Türkütanıt SS, Taştan R, Bozoğlu H, Otlı S:** Etiological and pathological studies on bacterial abortions of sheeps and cattles in North-East Anatolia Region. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 14(1), 133–145, 1998.
- Sakmanoğlu A, Hadimli HH, Erganiş O, Pınarkara Y, Sayın Z, Kav K:** Koyunlardan izole edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Eurasian J Vet Sci*, 31(2), 116-121, 2015.
- Schlicher J, Schmitt S, Stevens MJA, Stephan R, Ghielmetti G:** Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated over a 15-Year Period in Switzerland. *Vet Sci*. 8(8), 151, 2021.
- Selim AM, Atwa SM, El Gedawy AA, Younis EE:** Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in sheep of Dakhliya, Egypt. *Animal Biotechnology*, 33(7), 1655-1660, 2022.
- Soares SC, Silva A, Trost E, Blom J, Ramos R, Carneiro A, Ali A, Santos AR, Pinto AC, Diniz C, Barbosa EG, Dorella FA, Aburjaile F, Rocha FS, Nascimento KK, Guimarães LC, Almeida S, Hassan SS, Bakhtiar SM, Pereira UP, Abreu VA, Schneider MP, Miyoshi A, Tauch A, Azevedo V:** The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. *PLoS One*. 8(1): e53818. 2013.

- Spier SJ, Leutenegger CM, Carroll SP, Loye JE, Pusterla JB, Carpenter TE, Mihalyı JE ve Madigan JE:** Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 65, 829-834, 2004.
- Stefańska I, Gieryńska M, Rzewuska M, Binek M:** Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Pol J Vet Sci*, 13, 143-49. 2010.
- Stoops SG, Renshaw HW, Thilsted JP:** Ovine caseous lymphadenitis: Disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 557–561, 1984
- Sunder J, De AK, Sujatha T, Chakraborty G, Mayuri SC, Bhattacharya D ve Chakurkar EB:** Isolation and Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Goats in Andaman and Nicobar Islands, India. *Microbiology Research*, 15(4), 2274–2285, 2024.
- Takahashi T, Mori Y, Kobayashi H, Ochi M, Kikuchi N, Hiramune T:** Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine corynebacterial isolates based on the 16S rDNA sequence. *Microbiol Immunol.* 41(9), 649–655, 1997.
- Tarhane S, Büyük F:** The Etiological and Antimicrobial Susceptibility Profiles of the Bacteria Obtained from Ovine Caseous Lymphadenitis Cases in the Çankırı Region, Türkiye. *Life*, 14(9), 1078, 2024.
- Torky HA, Saad HM, Khaliel SA, Kassih AT, Sabatier JM, Batiha GES, Hetta HF, Elghazaly EM, De Waard M:** Isolation and Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Association with Proinflammatory Cytokines in Caseous Lymphadenitis Pyogranulomas. *Animals*, 13, 296, 2023.
- Torres Lde F, Ribeiro D, Hirata R Jr, Pacheco LG, Souza MC, dos Santos LS, dos Santos CS, Salah M, Costa MM, Ribeiro MG, Selim SA, Azevedo VA, Mattos-Guaraldi AL:** Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 108(3), 272–279, 2013.
- TÜİK:** Hayvancılık istatistikleri, 2024. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvancilik-Istatistikleri-Haziran-2024-53811> Erişim Tarihi: 07.06.2025.
- Voigt K, Baird GJ, Munro F, Murray F ve Brulsauer F:** Eradication of caseous lymphadenitis under extensive management conditions on a Scottish hill farm. *Small Rumin. Res.*, 106, 21-24, 2012.
- Yeshitila G, Gocmen H, Yesilovali HT:** Determination of Antibiotic Resistance Pattern and Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Lymph Node Samples of Sheep and Goats in Ethiopia. *Pakistan J. Zool.*, 56(5), 2255–2261, 2024.
- Yitagesu E, Alemnew E, Olani A, Asfaw T, Demis C:** Survival analysis of clinical cases of caseous lymphadenitis of goats in North Shoa, Ethiopia. *Vet. Med. Int.* 20, 1-8. 2020.

Yousfi C, Oueslati S, Daaboul D, Girlich D, Proust A, Bentchouala C & Naas T: Antibiotic susceptibility profiles of bacterial isolates recovered from abscesses in cattle and sheep at a slaughterhouse in Algeria. *Microorganisms.*, 12(3), 524, 2024.

Zavoshti FR, Khoojine ABS, Helan JA, Hassanzadeh B ve Heydari AA: Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Comp. Clin. Pathol.*, 21, 667-671, 2012.

Williamson LH: Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin N Am Food Anim Pract*, 17, 359-371, 2001.

Windsor PA: Control of Caseous lymphadenitis. *Vet. Clin. Food Anim.*, 27, 193-202, 2011.

Windsor PA ve Bush RD: Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? *Small Rumin. Res.*, 142, 6-10. 2016.



ÖZGEÇMİŞ

