

Marmara Bölgesi'nde Yarış Atı Yetiştirilen Haralardaki Taylarda *Rhodococcus equi* İnfeksiyonunun ELISA ile Erken Tanısı Üzerine Çalışmalar*

N. Yakut ÖZGÜR, Serkan İKİZ, A. Funda BAĞCIGİL

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Babür CARIÖĞLU

Türkiye Jokey Klübü, İzmit Pansiyon Hara, İzmit - TÜRKİYE

Ömer AKAY, Atilla ILGAZ

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Shinji TAKAI

Department of Animal Hygiene, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, Aomori, 034-8628 - JAPAN

Geliş Tarihi: 21.09.2001

Özet: Türkiye' de son yıllarda 1-4 aylık safkan taylarda *Rhodococcus equi* infeksiyonuna bağlı ölüm olgularındaki artış üzerine, safkan tay popülasyonunun yoğun olduğu Marmara Bölgesindeki haralarda hastalığın erken tanısı amacıyla, 30-60 günlük 454 tayın serum örnekleri ELISA ile incelendi. ELISA için *R. equi* ATCC 6939 suşu ile hazırlanan Tween 20 ekstraksiyon antijeni kullanıldı. 454 tayın 209 (% 46)'u sero-pozitif olarak saptandı. 30-40 günlük tayların % 43'ü, 41-50 günlük tayların % 40'ı ve 51-60 günlük tayların % 78'inde 0,3 (pozitif limit) ve üzerinde OD değeri belirlendi. 209 sero-pozitif tayın 126 (% 60)'sında çeşitli klinik belirtiler gözlemlendi. Tüm sero-pozitif taylar eritromisin+rifampin kombinasyonu ile tedavi edildi. Klinik belirti gösteren 126 sero-pozitif taydan 122 (% 97)'si düzeldi, ancak 4 tay tedavi sırasında öldü. Ölen taylara ait serumların OD değerlerinin 0,3'ün üzerinde olduğu gözlemlendi. Nekropside 4 taydan 3'ünde akciğer abseleri, birinde abdominal abseler görüldü. Ayrıca iki farklı harada ölen ve araştırma sırasında kan serumları ELISA ile incelenmemiş olan iki tayın nekropsilerinde de akciğerlerde abseler görüldü. Altı ölü tayın lezyonlarından virulent *R. equi* izole edildi. Tüm izolatlar 15- ile 17- kDa antijenler ve 85 kb tip-I virulens plazmidlerine sahipti. Bu sonuçlar Marmara Bölgesi'nde yetiştirilen safkan taylarda 85 kb tip-I plazmid içeren virulent *R. equi*'nin yaygın olduğunu ve ELISA' nın erken tanıdaki başarısını ortaya çıkardı.

Anahtar Sözcükler: Tay, *Rhodococcus equi*, ELISA, virulens, Türkiye

Studies on Early Diagnosis of *Rhodococcus equi* Infection by ELISA in Foals from Racehorse Breeding Studfarms in the Marmara Region

Abstract: Due to the recent increasing mortality rates in 1- to 4-month-old Thoroughbred foals with *Rhodococcus equi* infection in Turkey, serum samples from 454 foals between 30 and 60 days on studfarms of the Marmara Region, where the Thoroughbred foal population is concentrated, were investigated by ELISA for early diagnosis of the infection. The Tween 20-extracted antigen of the *R. equi* ATCC 6939 strain was used in the ELISA. Two hundred and nine (46%) of the 454 foals were found to be ELISA-positive. Optical density (OD) values of 0.3 (positive limit) or higher were detected in 43% of foals aged 30-40 days, 40% of those aged 41-50 days and 78% of those aged 51-60 days. Of the 209 ELISA-positive foals, 126 (60%) showed a variety of clinical signs. All ELISA-positive foals were treated with a combination of erythromycin and rifampin. Of the 126 ELISA-positive foals with clinical signs, 122 (97%) recovered, but 4 of the foals died during the treatment period. The OD values of the 4 dead foals were over 0.3. Necropsy confirmed that they had *R. equi* infection. Three of the 4 had lung abscesses and the remaining had abdominal abscesses. In addition, 2 foals died on 2 different studfarms unrelated with this ELISA surveillance study, and they had lung abscesses. Virulent *R. equi* was isolated from lesions of the 6 dead foals. All the isolates had 15- to 17- kDa antigens and 85 kb type-I virulence plasmids. These results indicated that virulent *R. equi*, which contained 85 kb type-I plasmid, is widespread in Thoroughbred foals in the Marmara Region and ELISA is useful for the early diagnosis of *R. equi* infection in foals.

Key Words: Foal, *Rhodococcus equi*, ELISA, virulence, Turkey

* Bu araştırma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje no: 1255/050599

Giriş

Rhodococcus equi enfeksiyonu, 1-6 aylık taylarda kronik, suppuratif bronkopneumoni ve enteritisle karakterizedir (1,2,3). Bir ile üç aylık taylarda daha şiddetli seyreden hastalığın dünyadaki mortalite oranının % 80'e kadar ulaştığı bildirilmiştir (4,5). Belirli çiftliklerde endemik olan hastalık bazı çiftliklerde sporadiktir ve bir çok çiftlikte de bilinmemektedir (4,6). Hastalık çoğu olguda gizlice ilerler, tanı ve tedavideki gecikmeler morbidite oranını artırır (7).

R. equi'nin virulent ve avirulent olmak üzere iki suşu belirlenmiştir. 15- ile 17-kDa'lık antijenlere sahip olan virulent *R. equi* suşlarında 85 ya da 90 kb'lık büyük bir plazmid bulunduğu saptanmıştır (8,9). *R. equi*'nin atlar ve çevresinde yaygın olduğu (1,10) ancak taylardaki doğal enfeksiyonun sadece virulent *R. equi* suşları tarafından oluşturulduğu (5,11,12) ve hastalığın endemik seyrettiği çiftliklerin virulent *R. equi* ile daha fazla kontamine olduğu belirlenmiştir (6,13). Araştırmalar, avirulent *R. equi*'nin atların dışkılarında ve yaşadıkları çevrede yaygın olmasına karşın, virulent *R. equi*'nin problemli çiftliklerdeki tayların dışkılarından ve padoklardaki topraktan sıklıkla izole edildiğini ve infekte tayların, dışkılarıyla çok fazla miktarda virulent *R. equi*'yi saçmaları nedeniyle, en önemli enfeksiyon kaynağı olduğunu ortaya çıkarmıştır (5,6). *R. equi* ile kontamine çiftliklerde yaşayan taylar padoğa çıkarıldıklarında trakheaları toprağın solunumu sırasında devamlı olarak virulent ve avirulent *R. equi*'ye maruz kalır (6) ancak taylardaki doğal enfeksiyonun sadece virulent suşlar tarafından oluşturulduğu kanıtlanmıştır (5,11,12).

Tayların *R. equi* enfeksiyonu suppuratif bronkopneumoni ile karakterize olmasına karşın, hastalığın erken dönemlerinde sadece solunum oranında ve vücut ısısında hafif artış gözlenir. Ancak bu klinik belirtiler çoğunlukla önemsenmediği ya da gözden kaçtığı için hastalığın gizlice ilerlemesine neden olur. Bu durum erken tanıyı güçleştirir ve kesin tanı ancak ölümden sonra lezyonlardan etkenin izolasyonu ile konur (14,15). Hastalığın ilerlediği durumlarda iştah azalması, hafif uyuşukluk, burun deliklerinin hızla açılıp kapanması ile karakterize solunum artışı, hırıltılı solunum ve öksürük dikkati çeker (14,16). *R. equi* pneumonisi şekillenen taylarda intestinal form da gözlenebilir. Bazı taylarda ise artrit, osteomyelit ve da uveitis şekillenir (14,17).

R. equi enfeksiyonu atlardaki diğer bir çok enfeksiyöz hastalıkların aksine hala aşılama ile kontrol altına alınamamaktadır. Taylarda enfeksiyonun başarılı tedavisinin erken tanıya bağlı olduğu vurgulanmıştır (3,16). *R. equi* enfeksiyonunun tanısında en geçerli yöntem trakheal aspirat sıvısından etkenin izolasyonudur (18,19,20). Ancak bakteriyolojik tanı 2-3 gün sürer. Virulensle ilişkili 15- ile 17-kDa'lık antijenlerin ve virulens plazmidlerinin saptanması için 3-4 güne daha gereksinim duyulur (18). Araştırmacılar, trakheal aspirat kültürü, klinik ve serolojik incelemelerin birlikte yürütülmesinin en iyi sonucu verdiğini vurgulamışlardır (14,18,19,20). Serolojik tanı yöntemleri arasında ELISA'nın yüksek sensitivitesi nedeniyle enfeksiyonun erken tanısını sağlayan en iyi yöntem olduğu belirlenmiştir (16,21,22,23). Takai ve ark. (23), taylarda doğal olarak meydana gelen enfeksiyonun erken tanısı amacıyla geliştirdikleri ELISA'da, farklı *R. equi* suşları ile 8 farklı yöntemle antijen hazırlamışlar ve spesifik antikoları saptamada en iyi sonucu *R. equi* 6939 suşu ile hazırlanan Tween 20 ekstraksiyon antijeninin verdiğini belirlemişler ve ELISA'nın kullanışlı olduğunu saptamışlardır. Daha sonra yapılan araştırmalarla da (16,21,22) hastalığın erken tanısında ELISA'nın sero-diagnostik değere sahip olduğu ve rutin olarak kullanılabilmesi kanıtlanmıştır. Takai ve ark. (24), trakheal aspiratlarda virulent *R. equi*'yi direkt ve daha kısa sürede saptamak amacıyla PCR geliştirmişler ancak izolasyona göre daha az duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Türkiye'de at populasyonunun önemli bir bölümünü oluşturan safkan yarış atları yoğun olarak Marmara Bölgesi'nde yetiştirilmektedir. *R. equi* enfeksiyonu tayların en önemli hastalıklarından biri olmasına karşın, Türkiye'de şimdiye kadar hastalığın erken tanısına yönelik araştırma yapılmamıştır. Sadece üç Arap tayından (25,26) ve iki safkan taydan (27) ölüm sonrası *R. equi* izolasyonu bildirilmiştir.

Bu araştırmada, yarış amacıyla yetiştirilen safkan taylarda son yıllarda *R. equi* enfeksiyonuna bağlı ölüm olgularındaki artış nedeniyle, hastalığın erken tanısı amacıyla enfeksiyondan şüpheli tayların ELISA ile belirlenmesi ve hemen tedaviye başlanarak ölüm oranlarının azaltılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Taylar: Marmara Bölgesindeki haralarda yetiştirilen 30-60 günlük 454 (206 dişi, 248 erkek) tay klinik olarak muayene edildi. Rektal ısı, öksürük, solunum oranları ve karakterleri, diare, artrit ve burun akıntısı olup olmadığı kaydedildi. Tayların yaklaşık % 90'ı İzmit yöresindeki bir pansiyon harada yetiştirilen taylardı. 1999 Mayıs-Haziran döneminde 10, 2000 Şubat-Haziran döneminde 171 ve 2001 Şubat-Haziran döneminde 273 taydan kan alınarak serumları ayrıldı ve bekletilmeden ELISA ile incelendi. Tayların 308'i 30-40, 95'i 41-50 ve 51'i 51-60 günlüktü (Tablo 1). Sero-pozitiflik saptanan taylarda hemen eritromisin+rifampin kombinasyonu ile tedaviye başlandı (28). Tedaviye alınan taylar 3 ay gözlem altında tutuldu.

ELISA

Antijen hazırlanması: Takai ve ark. (23) tarafından bildirilen yöntemle göre Tween 20 ekstraksiyon antijeni hazırlandı. *R. equi* ATCC 6939 suşundan brain-heart infusion agara ekim yapıldı, 38 °C'de 5 gün inkube edildi ve bu süre sonunda bakteriler toplandı. İki gram *R. equi* peleti, % 0,1 Tween 20 içeren 10 ml 0,0125 M sodyum fosfat buffer (pH 7,4) ile süspansiyon edildi ve 37 °C'lik su banyosunda 90 dakika inkube edildi. Sonra da + 4 °C'de 30 dakika süreyle 20.000 g'de santrifüje edildi. Üst sıvı alınarak, karbonat-bikarbonat buffer (pH 9,6) ile 1 µg protein/ml olacak şekilde ayarlandı ve antijen olarak kullanıldı.

Test: Higuchi ve ark. (16) tarafından bildirilen yöntemle göre uygulandı. Antijen, serum ve konjugat dilüsyonları "checkerboard titrasyon" ile saptandı. Her serum örneği için iki antijenli, iki antijensiz çukur kullanıldı. Antijensiz çukurlara % 0,1 Tween 20 içeren 0,0125 M sodyum fosfat buffer ilave edildi. Her pleytte kontrol amacıyla antijen yapılandırılan iki çukura serum yerine %1 bovine serum albumin (BSA) içeren PBS (pH 7,2) ilave edildi. Pleytler her aşama arasında 200 µl % 0, 02 Tween 20 içeren PBS solüsyonu ile 4 kez yıkandı.

Antijenli çukurlara karbonat-bikarbonat buffer ile 1/100 oranında sulandırılmış antijenden 100 µl ilave edildi ve + 4 °C'de 16 saat ≥ inkube edildi. Non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla, tüm çukurlara 100 µl %1 BSA içeren PBS ilave edilerek 37 °C'de 60 dakika inkube edildi. Serumlar 56 °C'de 30 dakika inaktive edildi ve % 1 BSA içeren PBS ile 1/100 oranında sulandırılarak çukurlara 100 µl ilave edildi. 37 °C'de 60 dakika inkube edildi. Tavşan anti-at IgG peroksidaz konjugat (SIGMA A-6917), % 1 BSA içeren PBS ile 1/3000 oranında sulandırıldı ve her çukura 100 µl ilave edildi. 25 °C'de 30 dakika inkube edildi. Tüm çukurlara 100 µl O-phenylenediamine substrat (SIGMA P-1526) solüsyonu (5 ml 0,2 M Na₂HPO₄ + 5 ml 0,1 M C₆H₈O₇ / H₂O + 0,004 g O-phenylenediamine dihydrochlorid + 2 µl % 35 HCL) ilave edilerek 25 °C'de 20 dakika inkube edildi. Reaksiyonu durdurmak için tüm çukurlara 100 µl 3N H₂SO₄ ilave edildi.

Pleytler ELISA okuyucusunda 492 nm dalga boyunda okundu. Her serum örneği için; antijenli+serumsuz çukurların OD değeri, antijenli+serumlu çukurların OD değerinden çıkartıldı. OD değeri 0,3 ve üzerinde olan serumlar pozitif olarak değerlendirildi (23).

Nekropsi ve Bakteriyoloji: Araştırma süresince ELISA ile kan serumu incelenen taylardan ölenlerin ve iki farklı harada solunum bozukluğu belirtileri gösterdikten sonra ölen, *R. equi* infeksiyonundan şüpheli iki tayın nekropsileri yapılarak postmortem makroskopik değişiklikler incelendi.

Ölü tayların lezyonlu organlarından % 10 at kanlı agarlara ekim yapılarak aerobik koşullarda 48 saat inkube edildi. Kültürler morfolojik olarak incelendikten sonra, izolatların identifikasyonu rutin bakteriyolojik yöntemlere göre yapıldı (2). İdentifikasyon testleri için referans suş olarak *R. equi* ATCC 6939 suşu kullanıldı.

Tablo 1. ELISA ile incelenen tayların yaş gruplarına ve yıllara göre sayısı.

Yıl	Yaş (gün)			Toplam tay sayısı
	30-40	41-50	51-60	
1999	9	1	-	10
2000	143	14	14	171
2001	156	80	37	273
Toplam tay sayısı	308	95	51	454

İzolatlar virulensle ilişkili 15- ile 17- kDa antijenlerin varlığı yönünden koloni blot analizi ile test edildi (29,30) ve sonra virulens plazmid DNA'nın varlığı yönünden agaroz jel elektroforez ile analiz edildi (9,31).

Koloni blot analizi: 15- ile 17-kDa antijenlerin saptanması için izolatların brain heart infusion agara subkültürleri yapıldı ve 38 °C'de 24 saat inkube edildi. Kültürlerin üzerine nitrosellüloz membran şeridi (0,45 mm) yerleştirildi ve tamamen ıslanmaya kadar bir kaç dakika bekletildi. Membran alındı, havada kurutuldu, 105 °C'de 1 dakika süreyle otoklavlandı. Tüm tampon çözeltiler, antikorlar ve konjugat dilüsyonları Takai ve ark. (30) tarafından bildirildiği gibi hazırlandı.

Agaroz jel elektroforez: İzolatlardan alkaline lysis yöntemi modifiye edilerek plazmid DNA izole edildi. Plazmid preparasyon örnekleri, yaklaşık olarak 5 V/cm'de 2 saat süreyle % 0.7 agaroz jelde *R. equi* ATCC 33701 (85 kb-tip-I), L1 (90 kb-tip-I), 96E35 (85 kb-tip-II), 222 (87 kb-tip-I) ve 96B6 (87 kb-tip-II) plazmidleriyle birlikte separe edildi.

Bulgular

ELISA bulguları

Kan serumu incelenen 454 taydan 209 (% 46)'u sero-pozitif, 245 (% 54)'i sero-negatif olarak saptandı. 30-40

günlük 308 tayın 131 (% 43)'i, 41-50 günlük 95 tayın 38 (% 40)'i ve 51-60 günlük 51 tayın 40 (% 78)'inde 0,3 ve üzerinde OD değeri belirlendi. En yüksek OD değeri 1,2 olarak 40 günlük bir tayın kan serumunda saptandı. Tayların cinsiyeti göz önüne alındığında, dişi tayların % 43'ü ve erkek tayların % 48'i sero-pozitif.

Sero-pozitif tayların 126 (% 60)'sında klinik belirtiler gözlemlendi. 106 (% 83,33) tayda öksürük, hırıltılı ve hızlı solunumu içeren solunum bozukluğu, 7 (% 5, 55) tayda sindirim bozukluğu, 12 (% 9,52) tayda solunum ve sindirim bozuklukları, 1 (% 0,8) tayda solunum bozukluğu ve eklem yangısı, 1 (% 0,8) tayda sindirim bozukluğu ve eklem yangısı belirlendi. 30-40 günlük sero-pozitif tayların % 54'ünde, 41-50 günlük tayların % 60'ında ve 51-60 günlük tayların %77'sinde klinik belirti saptandı. En yüksek OD değerinin (OD=1,2) saptandığı tayda solunum bozukluğu ile birlikte eklem yangısı vardı. Eritromisin+rifampin kombinasyonu ile tedaviye alınan tayların tedavi süreleri, klinik belirti gösteren taylarda alınan yanıtı göre değişirken, klinik belirti gözlenmeyen taylarda 20 gün devam etti.

Klinik belirti gösteren 126 sero-pozitif taydan 122 (% 97)'si düzeldi ancak 4 tay tedaviye rağmen öldü. Taylardan ikisi Nisan, biri Mayıs diğeri Temmuz ayında öldü. Bu tayların tümü erkekti ve sırasıyla 51, 60, 82 ve 116 günlük yaşlardaydı. Ölen taylara ait serumların OD değerlerinin 0,3'ün üzerinde olduğu gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Ölü tayların ELISA OD değerleri, ölüm öncesi gözlenen klinik belirtiler, ölüm yaşları ve ölüm olgularının ortaya çıktığı ay/yıl.

ELISA ile incelenen taylar				
Kan serumunun alındığı yaş (gün)	ELISA ile saptanan OD değeri	Klinik belirti	Öldüğü yaş (gün)	Öldüğü ay/yıl
40	0,5	Solunum bozukluğu	51	Nisan / 2001
32	0,5	Solunum bozukluğu	60	Nisan / 2001
45	0,4	Solunum bozukluğu	82	Mayıs / 1999
39	0,3	Sindirim bozukluğu ve eklem yangısı	116	Temmuz / 2000
ELISA ile incelenmeyen taylar				
İncelenmedi	-	Solunum bozukluğu	70	Mayıs / 2000
İncelenmedi	-	Solunum bozukluğu	75	Temmuz / 2000

Nekropsi bulguları

Kan serumu incelenen ve ölen 4 taydan klinik olarak solunum bozukluğu belirtisi gösteren 3'ünün sadece akciğerlerinde değişik sayıda yoğun eksudat içeren 1-4 cm çapında kalın çeperli yaygın piyogranulomatöz abseler gözlemlendi. Klinik olarak sindirim bozukluğu ve eklem yangısı gözlenen tayda, aynı özelliklere sahip çok sayıda abdominal abseler dikkati çekti.

Araştırma sırasında kan serumu incelenmeyen ve iki farklı harada ölen *R. equi* infeksiyonundan şüpheli iki taydan biri 70, diğeri 75 günlüktü ve sırasıyla Mayıs ve Temmuz aylarında öldüler (Tablo 2). Her iki tayın nekropsilerinde de sadece akciğerlerde piyogranulomatöz abseler gözlemlendi.

Bakteriyolojik bulgular

Aerobik koşullarda 48 saat inkubasyondan sonra, kanlı agarlarda saf kültür halinde hemoliz oluşturmayan, beyaz, mukoid ve transparent koloniler gözlemlendi. Kültürlerden yapılan mikroskopik incelemede Gram pozitif pleomorfik çomaklar görüldü. İdentifikasyon testleri sonucunda tüm isolatlar ATCC 6939 suşu ile aynı özelliklere sahipti ve *R. equi* olarak tanımlandı.

Koloni blot analizi sonucunda, 6 taydan elde edilen isolatların tümünde 15- ile 17- kDa'lık antijenler saptandı ve jel elektroforez sonucunda 6 izolatin da 85 kb tip-I virulens plazmidine sahip oldukları belirlendi.

Tartışma

Tayların *Rhodococcus equi* infeksiyonu at yetiştiriciliği yapılan ülkelerde sorun olmaya devam etmektedir. Hastalığın sinsice ilerlemesi nedeniyle erken tanıda güçlüklerle karşılaşılması üzerine Japonya başta olmak üzere gelişmiş ülkelerin çoğunda bu konuda yoğun araştırmalara devam edilmektedir. Ülkemizde yetiştirilen taylarda solunum bozukluğu sonrası ölüm olgularında artış olması ve bu olguların bir çoğunun, taylar öldükten sonra yapılan postmortem ve bakteriyolojik incelemelerde, *R. equi* nedeniyle şekillendiğinin belirlenmesi üzerine hastalığın erken tanısının yapılarak kontrol altına alınma zorunluluğu ortaya çıkmıştır.

Türkiye'de taylardan ilk *R. equi* izolasyonu, Çetin ve Kahraman (25) tarafından ölü bir Arap tayından yapılmıştır. Aynı yıl Karadaş ve ark. (26) da iki ölü Arap tayından *R. equi* izole edildiğini bildirmişlerdir. Ancak her iki olguda da etkenin virulens plazmidini belirlenmemiştir.

İlk virulent *R. equi* izolasyonu ve hastalığın epidemiyolojisine yönelik araştırma Özgür ve ark. (27) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar farklı haralardaki iki tayın akciğerlerinden izole ettikleri *R. equi* suşlarının plazmid ve protein profillerini incelemişler ve bir izolatin 85 kb tip-I virulens plazmidine sahip olduğunu, diğeri ise avirulent olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmada ayrıca Türkiye'de tay popülasyonunun en yoğun olduğu bir haradaki padoklardan toplanan toprak örnekleri *R. equi* yönünden incelenmiş, 85 kb tip-I ve 87 kb tip-I plazmid içeren virulent *R. equi* suşları izole edilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara göre haranın virulent *R. equi* ile kontamine olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmada kan serumu incelenen tayların yaklaşık olarak % 90'ı, Özgür ve ark. (27) tarafından virulent *R. equi* ile kontamine olduğu belirlenen harada yetiştirilen taylardı.

Higuchi ve ark. (16), Japonya'da çeşitli klinik belirtiler gösteren 752 hasta tayın kan serumlarını *R. equi* ATCC 6939 suşunun Tween 20 ile ekstrakte edilmiş antijenine karşı serum IgG antikorlarının saptanması için ELISA ile incelemişler ve 138 serumda 0,3 ya da daha yüksek OD değerleri saptamışlardır. Araştırmada 138 sero-pozitif taydan 112 (% 81)'inde solunum, 15 (% 11)'inde sindirim, 7 (% 5)'inde artrit ve 4 (% 3)'ünde karışık klinik belirti gözlemlendiği, tipik klinik belirtilerin 35-65 günlük taylarda ortaya çıktığı ve % 64'ünün 31-60 günlük yaşlarda olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar ELISA ile sero-pozitif olarak saptadıkları 138 taydan ölen 12'sinin nekropsilerinde gözlenen pulmonar ya da abdominal abselerin tümünden *R. equi* izole etmişlerdir. ELISA'nın sensitivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir araştırmada (21), *R. equi* infeksiyonundan şüpheli 31 taydan trakheal aspirat kültürü yapılmış ve aynı zamanda kan serumları alınarak ELISA ile incelenmiştir. 31 tayın 21'inden virulent *R. equi* izole edilirken, 21 kültür pozitif tayın 20 (%95)'ininin 0,3 ya da daha yüksek OD değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Higuchi ve ark. (22), hastalığın erken tanısı amacıyla üç tip (endemik, sporadik ve *R. equi* infeksiyonunun hiç görülmediği) çiftlikte iki yıl süresince yürüttükleri geniş kapsamlı bir araştırmada, 30 ve 45 günlük tayların fiziksel ve serolojik muayenelerinin özellikle hastalığın endemik seyrettiği çiftliklerde erken tanı için çok yararlı olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca solunum bozukluğu belirtisi gösteren 32 tayın 14'ünden trakheal aspirat kültürü yapmışlar ve 9 taydan *R. equi* izole etmişler, bu 9 taydan 7'sininin 0,3 ve üzerinde ELISA OD değerine sahip olduğunu saptamışlardır.

Bu araştırmada da *R. equi* ATCC 6939 suşundan hazırlanan Tween 20 ekstraksiyon antijeni kullanıldı ve kan serumu incelenen 30-60 günlük 454 taydan 209 (% 46)'unda 0,3 ya da daha yüksek OD değerleri saptandı. 209 tayın 126 (% 60)'sında klinik belirtiler gözlenirken, en fazla ortaya çıkan klinik belirti % 83'lük oranla solunum bozukluğuuydu. Araştırma süresince kan serumu ELISA ile incelenen taylardan 4'ü öldü ve bu tayların postmortem muayenelerinden sonra yapılan bakteriyolojik kültür sonucunda virulent *R. equi* izole edildi. *R. equi* izole edilen 4 tayın ELISA kayıtları incelendiğinde, 0,3 ve üzerinde OD değerlerine sahip olduğu gözlemlendi.

Bu araştırmada sero-pozitif tayların % 40'ında herhangi bir klinik belirti gözlenmedi. Ardans ve ark. (32), 216 tayın 77 (% 35)'sinin trakheal aspiratlarından *R. equi* izole edilmesine karşılık bunların hiçbirinin klinik belirtilere sahip olmadığını bildirmişlerdir. Higuchi ve ark. (22) ise klinik belirti göstermeyen ancak ELISA ile sero-pozitif olduğu belirlenen 7 taydan 6'sının trakheal aspiratlarından virulent *R. equi* izole etmişler ve bu bulgunun solunum bozukluğu belirtisi göstermeyen tayların serolojik olarak incelenmesinin önemini desteklediğini vurgulamışlardır. Bu araştırmada ELISA ile incelenen ve ölen 4 tay klinik belirti gösteren taylardı ve sero-pozitif oldukları belirlendi. Her ne kadar sero-pozitif taylardan trakheal aspirat kültürü yapılmadıysa da, ELISA ile sero-pozitif olduğu saptandıktan sonra tedaviye alınan 126 taydan sadece 4'ünün *R. equi* enfeksiyonu nedeniyle ölmesi, ELISA'nın erken tanıdaki başarısını ortaya çıkarmıştır. Sero-negatif taylar arasında *R. equi* enfeksiyonundan ölen tay olmamıştır. Araştırma sırasında iki farklı çiftlikte yetiştirilen 2 taydan daha, virulent *R. equi* izole edilmiş, ancak bu tayların serolojik olarak incelenmedikleri belirlenmiştir. Erken tanıyla birlikte sero-pozitif taylara uygulanan eritromisin+rifampin kombinasyonunun da diğer araştırmalarda (28,33) olduğu gibi etkili bir tedavi sağladığı bir kez daha açığa çıkmıştır.

Barton ve Hughes (1), *R. equi* enfeksiyonu olgularının çoğunun 2-6 aylık yaşlar arasında görüldüğünü bildirmişlerdir. Zink ve ark. (17), tayların çoğunda ilk klinik belirtilerin 2 aylıkken başladığını, öldüklerinde ortalama 11 haftalık olduklarını bildirmişlerdir. Takai ve

ark. (5) ise klinik semptomların 40 günlük, ölümlerin 60 günlük yaşta pik seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmada 30-40 günlük tayların % 43'ü, 41-50 günlük tayların % 40'ı ve 51-60 günlük tayların % 78'i sero-pozitif olarak saptandı. En yüksek sero-pozitiflik oranı ve sero-pozitif taylar arasındaki en yüksek klinik belirti gösterme oranı 51-60 günlük yaş grubunda saptandı. Bu durumun, 51-60 günlük tayların padoklarda *R. equi*'ye daha uzun süre maruz kalmaları nedeniyle şekillendiği düşünüldü. Cinsiyete göre sero-pozitiflik oranları yönünden dişi ve erkek taylar arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Araştırma süresince *R. equi* enfeksiyonu nedeniyle öldüğü saptanan toplam 6 tay, 51-116 günlük yaşlar arasındaydı.

Araştırmada 6 ölü taydan, 5'inin nekropsilerinde yalnızca akciğer abseleri gözlenirken, bir tayda abdominal abseler gözlemlendi. Nekropsi bulguları farklı araştırmacılar tarafından bildirilenlerle benzerlik gösterdi (5,16,19,28). Lezyonlu organların tümünden 15- ile 17-kDa'lık antijenler ve 85-kb tip-I plazmid içeren virulent *R. equi* izole edildi. Bu bulgu taylarda doğal enfeksiyonun virulent *R. equi* tarafından oluşturulduğunu bildiren diğer çalışmaları (5,11,12) desteklemektedir. 85 kb tip-I plazmid Fransa, Kanada, Avustralya ve Arjantin izolatlarında da bulunmuştur (5). Bu araştırmada virulent *R. equi* izole edilen 6 taydan 4'ü, Özgür ve ark. (27)'nin çalışmasında 85 kb tip-I plazmid içeren virulent *R. equi* ile kontamine olduğu belirlenen harada yetiştirilen taylardı. Japonya'da ölüm olgularının Mayıs-Ağustos arasında görüldüğü ve Temmuz ayında pik düzeye ulaştığı bildirilmiştir (5). Bu araştırmada Türkiye'deki ölüm olgularının, Nisan-Temmuz arasında ortaya çıktığı görülmüştür.

Bu araştırmanın sonuçları, Özgür ve ark. (27)'nin bildirdiği çalışma ile birlikte ele alındığında, Türkiye'de safkan at popülasyonunun en yoğun olduğu harada enfeksiyonun endemik hale geldiğini ortaya çıkarmıştır. Ülkemizde yarış atı yetiştiriciliği yapılan diğer haraların da virulent *R. equi* yönünden toprak analizlerinin yapılarak baskın plazmid tiplerinin belirlenmesi için daha fazla epidemiyolojik araştırmaya gereksinim vardır ve taylardaki enfeksiyonun erken tanısı amacıyla ELISA'nın rutin olarak uygulanması, yetiştiricilik ve ülke ekonomisi açısından yarar sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Barton, M.D., Hughes, K.L.: *Corynebacterium equi*: A review. Vet. Bull. 1980; 50: 65-80.
2. Prescott, J.F.: *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 1991; 4: 20-34.
3. Takai, S., Sasaki, Y., Tsubaki, S.: *Rhodococcus equi* infection in foals: Current concepts and implication for future research. J. Equine Sci., 1995; 6: 105-119.
4. Elissalde, G.S., Renshaw, H.W., Walberg, J.A.: *Corynebacterium equi*: an interhost review with emphasis on the foal. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1980; 3: 433-445.
5. Takai, S., Higuchi, T., Matsukura, S., Tamada, Y., Nishio, Y., Morishita, T., Fujii, M., Hidaka, D., Furugohri, J., Karasawa, T., Shoda, M., Akita, O., Ogawa, K., Hara, M., Kakuda, T., Sasaki, Y., Tsubaki, S., Hagiwara, S., Senba, H.: Some epidemiological aspects of *Rhodococcus equi* infection in foals in Japan: A review of 108 cases in 1992-1998. J. Equine Sci. 2000; 11: 7-14.
6. Takai, S.: Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. Vet. Microbiol. 1997; 56: 167-176.
7. Takai, S., Takeda, K., Nakano, Y., Karasawa, T., Furugoori, J., Sasaki, Y., Tsubaki, S., Higuchi, T., Anzai, T., Wada, R., Kamada, M.: Emergence of Rifampin-Resistant *Rhodococcus equi* in an Infected Foal. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 1904-1908.
8. Takai, S., Koike, K., Ohbushi, S., Izumi, C., Tsubaki, S.: Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 439-443.
9. Takai, S., Sekizaki, T., Ozawa, T., Sugawara, T., Watanabe, Y., Tsubaki, S.: Association between a large plasmid and 15 to 17 kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. Infect. Immun. 1991; 59: 4056-4060.
10. Takai, S., Narita, K., Ando, K., Tsubaki, S.: Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in soil on a horse-breeding farm. Vet. Microbiol. 1986; 12 :169-177.
11. Haites, R., Muscatello, G., Begg, A., Browning, G.F.: Prevalence of the virulence-associated gene of *Rhodococcus equi* in isolates from infected foals. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 1642-1644.
12. Takai, S., Anzai, T., Sasaki, Y., Tsubaki, S., Kamada, M.: Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from lesions of infected foals. Bull. Equine Res. Inst. 1993; 30: 9-14.
13. Takai, S., Ohbushi, S., Koike, K., Tsubaki, S., Oishi, H., Kamada, M.: Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 2887-2889.
14. Giguere, S., Prescott, J.F.: Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. Vet. Microbiol. 1997; 56: 313-334.
15. Smith, B.P., Robinson, R.C.: Studies of an outbreak of *Corynebacterium equi* pneumonia in foals. Equine Vet. J. 1981; 13: 223-228.
16. Higuchi, T., Hashikura, S., Gojo, C., Inui, T., Satoh, S., Yoshida, M., Ishiyama, T., Yamada, H., Takai, S.: Clinical evaluation of the sero-diagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* infection in foals. Equine Vet. J. 1997; 29: 274-278.
17. Zink, M.C., Yager, J.A., Smart, N.L.: *Corynebacterium equi* infections in horses 1958-1984: a review of 131 cases. Can. Vet. J. 1986; 27: 213-217.
18. Anzai, T., Wada, R., Nakanishi, A., Kamada, M., Takai, S., Shindo, Y., Tsubaki, S.: Comparison of tracheal aspiration with other tests for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. Vet. Microbiol. 1997; 56: 335-345.
19. Lavoie, J.P., Fiset, L., Laverty, S.: Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses. Equine Vet. J. 1994; 26: 348-352.
20. Prescott, J.F., Hoffman, A.M.: *Rhodococcus equi*. Update on infectious diseases. Vet. Clin. N. Am. Equine Pract. 1993; 9: 375-384.
21. Higuchi, T., Hashikura, S., Hagiwara, S., Gojo, C., Inui, T., Satoh, S., Yoshida, M., Fuji, M., Hidaka, D., Tsubaki, S., Takai, S.: Isolation of virulent *Rhodococcus equi* from transtracheal aspirates of foals serodiagnosed by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Vet. Med. Sci. 1997; 59: 1097-1101.
22. Higuchi, T., Taharaguchi, S., Hashikura, S., Hagiwara, S., Gojo, C., Satoh, S., Yoshida, M., Takai, S.: Physical and serological examinations of foals at 30 and 45 days of age for early diagnosis of *Rhodococcus equi* infection on endemically infected farms. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998; 212: 976-981.
23. Takai, S., Kawazu, S., Tsubaki, S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium equi* infection in foals. Am. J. Vet. Res. 1985; 46: 2166-2170.
24. Takai, S., Vigo, G., Ikushima, H., Higuchi, T., Hagiwara, S., Hashikura, S., Sasaki, Y., Tsubaki, S., Anzai, T., Kamada, M.: Detection of virulent *Rhodococcus equi* in tracheal aspirate samples by PCR for rapid diagnosis of *R. equi* pneumonia in foals. Vet. Microbiol. 1998; 61: 59-69.
25. Çetin, C., Kahraman, M.: Bir tayda *Rhodococcus equi* enfeksiyonu. Etlik Vet. Mikrob. Derg. 1997; 9: 127-130.
26. Karadaş, E., Gülcü, H.B., Beytut, E., Kahraman, M.M.: İki Arap tayında *Rhodococcus equi (Corynebacterium equi)* enfeksiyonu. F.Ü. Sağlık Bil. Derg. 1997; 11: 321-325.
27. Özgür, Y., İkiz, S., Carioğlu, B., Ilgaz, A., Takai, S.: Two cases of dead foals associated with *Rhodococcus equi* pneumonia in Turkey. J. Equine Sci. 2000; 11: 1-5.
28. Sweeney, C.R., Sweeney, R.W., Divers, T.J.: *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy. Vet. Microbiol. 1987; 14: 329-336.

29. Takai, S., Lie, M., Kobayashi, C., Morishita, T., Nishio, T., Ishida, T., Fijimura, T., Sasaki, Y., Tsubaki, S.: Monoclonal antibody specific to virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 2780-2782.
30. Takai, S., Morishita, T., Nishio, Y., Sasaki, Y., Tsubaki, S., Higuchi, T., Hagiwara, S., Senba, H., Kato, M., Seno, N., Anzai, T., Kamada, M.: Evaluation of a monoclonal antibody-based colony blot test for rapid identification of virulent *Rhodococcus equi*. J. Vet. Med. Sci. 1994; 56: 681-684.
31. Takai, S., Watanabe, Y., Ikeda, T., Ozawa, T., Matsukura, S., Tamada, Y., Tsubaki, S., Sekizaki, T.: Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 1726-1729.
32. Ardans, A.A., Hietala, S.K., Spensley, M.S., Sansome, A.: Studies on naturally occurring and experimental *Rhodococcus equi* (*Corynebacterium equi*) pneumonia in foals. Proc. Am. Assoc. Equine Pract. 1987; 32: 129-144.
33. Hillidge, C. J.: Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. Vet. Microbiol. 1987; 14: 337-342.