

Atlarda infertiliteye neden olan *Taylorella equigenitalis*'in bakteriyolojik ve serolojik tanısı*

Jale ERDEĞER¹, Mehmet AKAN¹, Gülay ALTAY², Mürsel DEMİREL³

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara; ² Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mudurnu Meslek Yüksek Okulu, Bolu; ³ Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkezi Komutanlığı, Gemlik, Bursa

Özet: Atların bulaşıcı metritisi olarak bilinen contagious equine metritis (CEM), *Taylorella equigenitalis*'in neden olduğu ve atların döl verimini etkileyen genital bir enfeksiyondür. Bu çalışmada, atlardan *T. equigenitalis* izolasyonu ve hastalığın serolojik testlerle indirekt teşhisi amaçlanmıştır. Bakteriyolojik muayeneler sonunda, kısırağların uterus ve klitoral sinuslarından alınan svab örneklerinden *T. equigenitalis* izole edilememiştir. Yapılan serolojik yoklamalar sonucu, incelenen 136 infertil kısırağtan alınan serum örneklerinin 46'sı (%33.8) rapid plate aglutinasyon (RPA) testi, 44'ü (%32.4) serum aglutinasyon testi (SAT), 31'i (%22.8) antiglobulin testi (AGT), 28'i (%20.5) pasif hemaglutinasyon (PHA) testi ve 18'i (%13.2) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ile pozitif bulunmuştur. Aynı testlerle 114 fertil kısırağa ait örnekler ise sırasıyla 7 (%6.1), 6 (%5.3), 4 (%3.5), 3 (%2.6) ve 1'i (%0.9) pozitif olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada hastalığın Türkiye'deki varlığı serolojik olarak ortaya konuldu. CEM'in teşhisinde, bakteriyolojik muayeneler yetersiz kaldığında serolojik yöntemlerin kullanılabilirliği ve enfeksiyonun saptanmasında yararlı olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: At, CEM, izolasyon, seroloji, *Taylorella equigenitalis*

Bacteriological and serological diagnosis of *Taylorella equigenitalis* in horses

Summary: Contagious equine metritis (CEM) is a genital infection that affects the fertility of horses. The disease is caused by *Taylorella equigenitalis*. The aim of this study was to isolate the causative organism and to diagnose the infection by serological tests as an indirect method. *T. equigenitalis* was not isolated from any of the samples (uterus and clitoral sinuses swab of mares). In rapid plate agglutination (RPA) test, serum agglutination test (SAT), antiglobulin test (AGT), passive hemagglutination (PHA) test and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), 46 (33.8%), 44 (32.4%), 31 (22.8%), 28 (20.5%) and 18 (13.2%) of 136 sera from infertile mares were found to be positive, respectively. Whereas, 7 (6.1%), 6 (5.3%), 4 (3.5%), 3 (2.6%) and 1 (0.9%) of 114 sera from fertile mares were positive in the same tests. The existence of the disease was determined serologically in Turkey. The results indicated that bacteriological investigation alone was not enough for the diagnosis of the infection and it was necessary to use serologic tests to detect this infection.

Key words: CEM, horse, isolation, serology, *Taylorella equigenitalis*

Giriş

Contagious equine metritis (CEM), atların döl verimini etkileyen venereal ve oldukça bulaşıcı enfeksiyöz hastalıklarından birisidir. Hastalık kısırağlarda servisit, vajinitis ve endometritis ile karakterizedir. Enfeksiyon sonunda oluşabilen infertilite ve abortuslar, at yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (10). Hastalık etkeni daha önceki yıllarda contagious equine metritis organism (CEMO) (2) ve *Haemophilus equigenitalis* (25) olarak isimlendirilmesine karşın günümüzde *Taylorella equigenitalis* olarak adlandırılmaktadır (22).

CEM'in laboratuvar teşhisi bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerle yapılmaktadır. *T. equigenitalis*'in izolasyonunda %5-10 at kanı içeren Eugon çukulata agar (ECA) kullanılmaktadır. Bu besi yeri streptomisinli (200 µg/ml) ve streptomisinsiz olarak iki şekilde hazırlanmak-

ta ve ekimler iki seri yapılmaktadır. Etken %5-10 CO₂'li atmosferde 37°C'de 3-5 gün süreyle inkubasyonda tutularak üretilmektedir. İdentifikasyonda oksidaz, katalaz, hemoliz, X ve V faktörlerine ihtiyaç, fosfataz, indol, üreaz, glukoz, sukroz, laktöz, D-ksiloz, mannitol, ornitin dekarboksilaz, arjinin dihidrolaz, nitrat redüksiyonu gibi ayırıcı karakterleri incelenmektedir (9,17). Ayrıca etken, API 10E ve API ZYM test kit sistemleri ile bilinen biyokimyasal testlerle ve porfirin testi ile karakterize edilmiştir (24). İzole edilen *T. equigenitalis* suşlarının identifikasyonunda, spesifik hiperimmün serumlarla yapılan aglutinasyon testi de kullanılmaktadır (26). Son yıllarda hastalık etkeninin direkt tanısında polimeraz zincir reaksiyonundan da yararlanılmaktadır (16).

Donahue ve ark. (3) Amerika Birleşik Devletleri'nde, Timoney ve Powel (27) İrlanda'da, Frank ve ark.

* Bu araştırma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (Proje No.VHAG-1235) tarafından desteklenmiştir.

(7) İngiltere'de, Kamada ve ark. (11) Japonya'da, Eckstein ve ark. (4) Federal Almanya'da, Klug ve ark. (13) yine aynı ülkede, Lorin ve ark. (14) Avusturya'da kısırak ve aygırlardan *T. equigenitalis* izolasyonlarını bildirmişlerdir.

Kısırak ve aygırların genital salgıları bakterilerle kontamine edilmiştir ve CEMO da besi yerlerinde güçlükle üreyen bir bakteridir. Etken streptomisinsiz besi yerlerinde nadiren izole edilmekte ancak, streptomisine duyarlı olanlar ise antibiyotikli besi yerlerinde yanlış negatif sonuçlar vermektedir. Bu nedenle, yanlış negatif kültür sonuçları için CEMO antikorlarının serolojik testlerle saptanması önerilmektedir (23). *T. equigenitalis* ile intrauterin immunizasyon, sistemik IgG ve lokal olarak uterus ve vaginal sekresyonlardaki IgA ve IgM yanıtını artırmaktadır (28). Kısıraklar infeksiyon veya immunizasyondan 12-15 gün sonra seropozitiflik göstermektedir (14).

CEM hastalığının teşhisinde çeşitli serolojik testlerden yararlanılmış, bu testlerden CFT'nin kronik infeksiyonların, SAT/AGT'nin ise akut infeksiyonların saptanmasında kullanılabileceği, ancak CFT'nin kronik infeksiyonların belirlenmesinde uygun bir test olsa da tüm CEM vakalarını saptayamadığı ileri sürülmüştür (2,8). Von ve ark. (29) patojen olan Vienna suşu ile pony kısıraklarında deneysel infeksiyon oluşturmuş, SAT ile en yüksek titreler (1/40-1/80) infeksiyondan sonra 15. ve 29. günlerde saptanmıştır. PHA ve ELISA tekniklerinin bilinen serolojik testlere göre en çabuk ve duyarlı testler olduğu, SAT, CFT, AGD testlerinde negatif olan serumlarda antikor titrelerinin PHA testi ile belirlenebildiği bildirilmiştir (2). Benson ve ark. (1), SAT'de 1/20 ve daha düşük dilüsyonda pozitif reaksiyonu CEM negatif; 1/80 ve daha yüksek dilüsyonda pozitif reaksiyonu CEM pozitif ve ayrıca, AGT titresi SAT ile aynı bulunmuşsa CEM negatif, AGT titresi SAT'den 1 veya 2 dilüsyon daha yüksek bulunmuşsa CEM pozitif olarak kabul etmişlerdir. Sahu (18), intrauterin olarak infekte ettiği kısırakların serumlarında *T. equigenitalis*'e karşı aglutinasyon (plate, tüp, antioglobulin) ve ELISA testleri ile düşük antikor titreleri bulmuş, PHA testi ile ise yüksek antikor titreleri elde etmiştir. Eguchi ve ark. (5), klinik olarak sağlıklı 156 kısırağın ve *T. equigenitalis* ile infekte 50 kısırağın kan serumlarını PHA testi ile incelemişler, sağlıklı kısırakların antikor titrelerini $\geq 1/32$, CEMO ile infekte olanların ise $\leq 1/32$ (1/64-1/4096) bulmuşlardır. Fernie ve ark. (6) da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. PHA testi kısa bir inkübasyona ihtiyaç göstermesi ve diğer serolojik metotlara göre daha çabuk olması, ayrıca CEM'nin serolojik teşhisinde testin duyarlı bulunması; hastalığın erken ve geç dönemlerinde antikorları saptayabilmesi nedeniyle araştırmacılar tarafından önerilmektedir. Kronik metritisli, taşıyıcı kısıraklar bu metotla sap-

tanabilmektedir. Sahu ve ark. (21), *T. equigenitalis*'e karşı oluşan antikorları ELISA, RPA, AG, CF, PHA ve AGD testleri ile incelemişler, CF testini kronik infeksiyonlarda kullanmanın düşük titre ve antikomplementer aktivite nedeniyle uygun olmadığını öne sürmüşlerdir. Akut ve kronik CEM infeksiyonlarının RPA testi ile ELISA ve PHA birlikte kullanıldığında büyük oranda saptanabildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, infertil ve fertil kısırakların genital kanından *T. equigenitalis* izolasyonu ve bu kısıraklara ait kan serumlarında bu etkene karşı oluşmuş antikorların RPT, SAT, AGT, PHA ve ELISA ile araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Fertil kısıraklardan 114 ve infertil kısıraklardan 136 adet olmak üzere toplam 250 kısırağın uterus ve klitoral sinuslarından örnekler alındı. Vi-pak transport swab sistem ile Amies transport medium'a alınan gerek uterus gerekse klitoral örnekler, +4°C'de laboratuvara ulaştırıldı. Aynı hayvanların kan serumları alınarak testler yapılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Besi yerleri: *T. equigenitalis*'in izolasyonu için %10 defibrine at kanı ile hazırlanmış çukulata Eugon agar (Difco) kullanıldı. Bu besi yeri streptomisinli (200 µl/ml) ve streptomisinsiz olarak iki seri hazırlandı. Aglutinasyon test antijeninin hazırlanmasında kullanılan *T. equigenitalis* standart suşu, Columbia agar (Oxoid)'da üretildi. Sıvı besi yeri olarak da brain heart infusion broth (Merck) kullanıldı.

***T. equigenitalis* standart suşu:** Hiperimmun serum ve serolojik testler için antijen hazırlanmasında Hannover Veteriner Yüksekokulu'ndan sağlanan *T. equigenitalis* B2176 suşu kullanıldı.

Deneme hayvanı: *T. equigenitalis*'e karşı antiserum hazırlamak amacıyla kullanılan kısırak özel bir işletmeden sağlandı.

Rabbit anti-horse globulin: Antiglobulin testinde tavşandan elde edilmiş anti-horse whole serum (Sigma) 1:150 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Konjugat: ELISA'da tavşandan elde edilmiş ve peroksidaz enzimi ile işaretlenmiş anti-horse IgG (whole molecule) peroxidase konjugatı (Sigma) kullanıldı ve testten önce bilinen antijen ile titresi belirlendi.

Substrat: ELISA'da antijen titrasyonu, konjugat titrasyonu ve testte 40 mg/100 ml fosfat sitrat buffer (pH 5.0) oranında sulandırılan orto-fenilendiamin (orto-phenylenediamine, Sigma)+40 µl %30 hidrojen peroksit (H₂O₂, Merck) substrat olarak kullanıldı.

Tannik asit solüsyonu: PHA testinde eritrositlerin tannik asit ile muamele edilmesinde kullanılan solüsyon

1:20.000 oranında PBS (pH 7.2) ile hazırlandı (1:1000=10 mg tannik asit+10 ml PBS).

Metot

İzolasyon ve identifikasyon çalışmaları: Laboratuvara gelen svabların her birinden streptomisinli ve streptomisinsiz Eugon çukolata agarlara ekim yapıldı. Ekim yapılan besi yerleri nemli, %5-10 CO₂'li atmosferde (gas pak system, Oxoid), 37°C'de 3-7 gün süreyle inkubasyonda tutuldu. İnkubasyon sonrasında üreyen koloniler *T. equigenitalis* yönünden incelendi. Şüpheli kolonilerden Gram boyama yapılarak Gram negatif pleomorfik kokobasil şeklinde görülen, oksidaz ve katalazı pozitif olanlar BHI buyyonda üretilerek ayırıcı karakterleri yönünden incelendi (9,17).

Antijenlerin hazırlanması: İmmunizasyon, RPA ve SAT antijenleri, Sahu (18)'nin bildirdiği yöntemle göre hazırlandı. ELISA antijeni Sahu ve ark. (20)'nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Soluble antijenin kullanılmadan önce Lowry metoduna göre protein konsantrasyonu saptandı (15) ve konsantrasyonu 3 µl protein/ml olacak şekilde ayarlandı. PHA test antijeni, ELISA'da kullanılan soluble protein antijeni ile aynı yöntemle hazırlandı ve konsantrasyonu PBS (pH 6.4) ile 40-60 protein µg/ml olacak şekilde ayarlandı.

Hiperimmün serum hazırlanması: Hazırlanan immünizasyon antijeni kısırağa intravenöz olarak verildi. İkinci enjeksiyon ilkinden 13 gün sonra yapıldı. Kısıraktan 10 gün sonra kan alınarak serum çıkartıldı ve tüp aglutinasyon testi ile titresini saptanarak testlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı (18).

Çabuk lam aglutinasyon (RPA) testi: Sahu ve ark. (21)'nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı.

Serum aglutinasyon testi (SAT): SAT Benson ve ark.(1)'nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Sonuçta, 1/10 titrede reaksiyon belirlenen serum örnekleri pozitif olarak değerlendirildi.

Antiglobulin (AG) testi: Test Sahu (18)'nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Test serumlarının değerlendirilmesi, SAT testinden bir veya iki titre yüksek sulandırmaça pozitif reaksiyona göre yapıldı.

Pasif hemaaglutinasyon (PHA) testi: Test Sahu (19)'nin bildirdiği yöntemle göre mikrotiter prosedürü ile yapıldı. Plate'ler oda ısısında (25°C) inkube edilerek, sonuçlar 2 saat içinde okundu. Antikor titreleri ≤1/32 olduğunda negatif, ≥ 1/64 pozitif olarak değerlendirildi.

ELISA: Testte konjugatın ve antijenin optimal dilüsyonunu belirlemede satranç tahtası titrasyon yönteminden yararlanıldı. Antijen absorpsiyonu için katı faz olarak düz tabanlı polystyrene microtiter plate'ler (Greiner) kullanıldı. Antijen (3 µg protein/ml) 0.5 M karbonat buffer'da (pH 9.6) sulandırılarak her göze 50 µl konuldu. Plate'ler +4°C'de bir gece inkube edildi. PBS+tween

20+BSA ile yıkandı ve elde kurutuldu. Tüm gözlere 50 µl 1:10 BSA konularak 30 dakika 37°C'de bekletildi ve plate'ler yıkandı. Serumlar PBS+tween 20+BSA'da 1/10 sulandırıldı ve her göze 50 µl eklendi. Plate'ler 37°C'de 1 saat bekletildi ve yıkandı. Titresi saptanan peroksidaz işaretili tavşan anti-at konjugatının 50 µl'si gözlere ilave edildi ve 37°C'de 1 saat inkube edildi. Yıkama işleminden sonra, 100 µl substrat her göze damlatıldı. Plate'ler oda ısısında 10 dakika bekletildi ve gözlere 50 µl 1.25 M H₂SO₄ eklenerek reaksiyon durduruldu. Optik dansite (OD) değerleri mikro ELISA okuyucusu (Metertech Σ960) ile 405 nm'de saptandı. Her örnek iki kez test edildi ve dublike örneklerin ortalama absorpsansları sonuç olarak değerlendirildi. Absorpsans değerlerini pozitif veya negatif olarak değerlendirebilmek için her plate'de 8 pozitif ve 8 negatif kontrol serumu bulunduruldu. OD değeri o plate'deki negatif ortalamasının en az 3 standart sapma üstünde olan örnekler pozitif kabul edildi.

Bulgular

İzolasyon ve identifikasyon bulguları

Fertil ve infertil 250 kısırağa ait uterus ve klitoral sinuslardan alınan svablardan yapılan bakteriyolojik muayeneler sonucu *T. equigenitalis* izole edilemedi.

Hiperimmün serum titresini

Serolojik testlerde pozitif kontrol olarak kullanılan hiperimmün serumun titresini SAT ile 1/1280 olarak saptandı.

Serolojik test sonuçları

İncelenen infertil ve fertil hayvanlara ait serumların serolojik test sonuçları Tablo 1 ve Tablo 2'de özetlenmiştir. İnfertil kısıraklara ait 136 serumun 48'i (%35.3) değişik testlerde pozitif bulundu. Bu serum örneklerinin sadece 2'si PHA ve 2'si RPA testinde pozitif bulunurken diğer 44 adet serum birden fazla testte pozitif sonuç verdi. Fertil kısıraklara ait 114 serumun değişik testler dikkate alınarak yapılan değerlendirmesinde, 8 (%0.7) örnek pozitif bulundu. Pozitif saptanan serum örneklerinin 6'sı birden fazla testte pozitif sonuç verirken, bir serum örneği sadece PHA testinde (1/64), biri de RPA testinde pozitif sonuç verdi. ELISA testinde pozitif saptanan serum örneği diğer testlerle de pozitif olarak saptandı.

Çabuk lam aglutinasyon testinde, infertil 136 kısırağa ait serumun 46'sı (%33.8), fertil 114 kısırak serumunun ise 7'si (%6.1), SAT ile 136 infertil kısırağın 44'ü (%32.4), 114 fertil kısırağın 6'sı (%5.3), AGT ile 136 infertil kısırağın 31'i (%22.8), fertil 114 kısırağın ise 4'ü (%3.5) pozitif bulundu. PHA testinde ise infertil kısıraklara ait serumların 28'i (%20.5) ve fertil kısıraklara ait

Tablo 1. İnfertil kısıraklara ait serum örneklerinin serolojik test sonuçları.
Table 1. Serological test results of serum samples obtained from infertile mares.

Test	Pozitif serum sayısı (%) (n :136)	Negatif serum sayısı (%) (n :136)
RPA	46 (33.8)	90 (66.2)
SAT	44 (32.4)	92 (67.6)
AGT	31 (22.8)	105 (77.2)
PHA	28 (20.5)	108 (79.5)
ELISA	18 (13.2)	118 (86.8)

Tablo 2. Fertil kısıraklara ait serum örneklerinin serolojik test sonuçları.
Table 2. Serological test results of serum samples obtained from fertile mares.

Test	Pozitif serum sayısı (%) (n :114)	Negatif serum sayısı (%) (n :114)
RPA	7 (6.1)	107 (93.9)
SAT	6 (5.3)	108 (94.7)
AGT	4 (3.5)	110 (96.5)
PHA	3 (2.6)	111 (97.4)
ELISA	1 (0.9)	113 (99.1)

Tablo 3. İnfertil ve fertil kısırak serumlarının PHA test titreleri ve sayıları.
Table 3. PHA test titres and numbers of infertile and fertile mare sera.

Serum (n: 250)	PHA test titreleri							
	< 1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
İnfertil kısırak (n: 136)	69	28	11	16	1	5	5	1
Fertil kısırak (n: 114)	73	30	8	3				

serumların 3'ü (%2.6) pozitif olarak belirlendi (Tablo 1 ve 2). Kısırak serumlarının PHA titre ve sayıları Tablo 3'de verilmiştir.

ELISA standardizasyonunda satranç tahtası yöntemi ile yapılan değerlendirmede, optimal konjugat dilüsyonu 1/5000 olarak saptandı. *T.equiigenitalis* sonike antijeninin protein içeriği dikkate alınarak en iyi 1/100 sulandırma pozitif ve negatif farkını verdiği gözlemlendi. Antijenin teste kullanılan optimal protein miktarı 3 µg/ml olarak belirlendi.

Serum örneklerinin ELISA ile incelenmesi sonrasında, infertil 136 kısırağın 18'i (%13.2), 114 fertil kısırağın ise 1'i (%0.9) pozitif olarak bulundu (Tablo 1 ve 2).

Tartışma ve Sonuç

T.equiigenitalis'in neden olduğu CEM, kısıraklarda servisitit, vaginitit ve endometritit ile karakterize olup abortuslar ve infertilite ile sonuçlanmaktadır. Bu çalışmada, infertil ve fertil kısırakların genital kanalından *T.equiigenitalis* izolasyonu ve bu kısıraklara ait kan serumlarında etkene karşı oluşmuş antikorların serolojik testlerle indirekt teşhisi amaçlandı.

Çalışmada, infertil kısıraklardan alınan materyallerden *T.equiigenitalis* izole edilemedi. Konu ile ilgili olarak

yapılan bazı çalışmalarda, infekte kısıraklardan etken izolasyonunun yapılamaması sonrasında yanlış negatif sonuçlar alınabildiği bildirilmiştir (14,23). Swerczek (14), bu durumu genital bölgenin yoğun kontaminasyonu ile açıklamıştır. Bu olumsuzluğu ortadan kaldırmak için ise izolasyon besiyerinin streptomisinli hazırlanabileceğini de bildirmiştir. Parlevliet ve ark. (23), klinik belirti göstermeyen 107 kısıraktan *T.equiigenitalis* izole edememelerine karşın, PCR ile bu kısırakların 54 (%49)'ünün *T.equiigenitalis* yönünden pozitif olduğunu saptamışlardır. *T.equiigenitalis* izolasyonu ile ilgili diğer çalışmalarda (7,13,16) kısırak ve aygırların genital bölgelerinden değişik oranlarda etken izolasyonu bildirilmiştir. Bu çalışmada *T.equiigenitalis* izole edilememesi, Parlevliet ve ark. (23)'ün sonuçlarına benzerdir. İzolasyon besiyeri olarak iki seri (streptomisinli ve streptomisinsiz) hazırlanan Eugon agar (%10 at kanlı) kullanılmıştır. Bu besiyerinde etkenin üretilmemesi ise, etkenin kültüre edilmesinin zor olması, *in vitro* koşullarda düşük multiplikasyon oranına sahip olması ve kolaylıkla flora bakterileri tarafından üremesinin ihhabe edilmesi ile açıklanabilir.

Hastalığın serolojik tanısında değişik testlerden yararlanılmaktadır. Bu testler arasında CFT kronik in-

feksiyonların, SAT/AGT ise akut infeksiyonların saptanmasında yarar sağlamaktadır. Bu hastalığın teşhisinde en duyarlı testler arasında PHA ve ELISA olduğu bildirilmiştir (2,19). Bu çalışmada materyal alınan infertil kısıraklara ait 136 ve fertil kısıraklara ait 114 serum örneği. RPA, SAT, AGT, PHA testi ve ELISA ile *T.equi genitalis* antikorları yönünden incelendi. İnfertil kısıraklara ait örneklerin 46'sı (%33.8) RPA, 44'ü (%32.4) SAT, 31'i (%22.8) AGT, 28'i (%20.5) PHA ve 18'i (%13.2) ELISA ile pozitif bulundu. Fertil kısıraklara ait örneklerin 7'sinin (%6.1) RPA, 6'sının (%5.3) SAT, 4'ünün (%3.5) AGT, 3'ünün (%2.6) PHA ve 1'inin (%0.9) ELISA ile pozitif olduğu saptandı. İnfertil ve fertil kısıraklarda en yüksek pozitiflik RPA ile saptanırken en düşük pozitiflik ELISA ile belirlendi. SAT ile ilgili yapılan çalışmalarda (12,29) infekte kısırak serumlarında değişik aglutinasyon titreleri elde edilmiştir. Benson ve ark. (1), CEMO ile infekte kısıraklarda genellikle SAT titrelerinin en az 1/80 olduğunu, AGT titrelerinin ise bir veya iki dilüsyon daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Eguchi ve ark. (5), klinik olarak sağlıklı 156 kısırağın ve *T.equi genitalis* ile infekte 50 kısırağın kan serumlarını PHA testi ile incelemişler ve sağlıklı kısırakların antikor titrelerini $\leq 1/32$, CEMO ile infekte olanların ise $\geq 1/32$ bulmuşlardır. Araştırmacılar, PHA testinin kısa bir inkubasyona ihtiyaç gösterdiğini ve diğer serolojik metodlara göre daha çabuk ve duyarlı olduğunu da bildirmişlerdir. Sahu (18), infekte kısıraklarda antikor seviyesinin ELISA ile düşük titrede saptamıştır. Sahu ve ark. (21), akut ve kronik CEM infeksiyonlarının RPA testi ile ELISA ve PHA birlikte kullanıldığında büyük oranda saptanabildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, PHA ve ELISA testlerinin RPA, AGD ve CF testlerine göre daha üstün olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada, fertil ve infertil kısıraklardan alınan materyallerden *T.equi genitalis* izole edilememesine karşın serum örneklerinde *T.equi genitalis* antikorları saptandı. İncelenen yazılı literatürde fertil ve infertil kısıraklardan izolasyon çalışması ile serolojik testlerin birlikte yapıldığı bir araştırmaya rastlanmadı. Konu ilgili serolojik çalışmalar daha çok deneysel infekte hayvanlardan ve klinik olarak metritisli ve *T.equi genitalis* izole edilen atlardan alınan serum örneklerinde *T.equi genitalis* antikorlarının farklı testlerle saptanması üzerine yoğunlaşmıştır. Bu nedenle konu ile ilgili kapsamlı bir çalışma bulunmadığından ayrıntılı bir karşılaştırma yapılamadı. Fakat, serolojik testlerde (özellikle SAT/AGT) elde edilen antikor titrelerinin araştırmacıların çalışmalarında çok farklı titrelerde olması ve bu titrelerdeki (düşük ve/veya yüksek) hayvanlardan etkenin üretilmesi veya deneysel infeksiyon olması serolojik testlerin değerlendirilmesiyle ilgili zorlukları oluş-

turmaktadır. Bazı araştırmacılar SAT/AGT'de düşük titrede antikor yanıtı oluştuğunu veya oluşan yüksek titredeki antikorun kısa bir süre sonra düştüğünü bildirmesine karşın, bazı araştırmacılar bu testlerde oldukça yüksek titrede antikor yanıtını bildirmişlerdir. Diğer testlerde ise (PHA, ELISA) araştırmacıların bulguları arasında benzerlik bulunmaktadır. Bu çalışmada RPA, PHA ve ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi ile ilgili olarak araştırmacıların bu testleri değerlendirme kriterleri arasında bir uygunluk bulunmaktadır. Fakat, SAT/AGT'de araştırmacıların değişik titreleri pozitif olarak kabul etmeleri nedeniyle bu çalışmada, reaksiyon saptanan serum örnekleri pozitif olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmede, materyal alınan kısıraklarda infeksiyonun ne kadar süredir devam ettiğinin bilinmemesi ve diğer araştırmacıların (12) antikor titrelerinin akut dönemi takiben hızla düştüğü bulgusu önemli oldu.

Bu çalışmada alınan serum örneklerinin fertil kısıraklarda %0.7'si, infertil kısıraklarda ise %35.3'ü serolojik olarak pozitif bulundu. Bu iki grup arasında önemli bir fark bulunması, etken izole edilememesine karşın dikkat çekicidir. Çalışmada, özellikle SAT/AGT'de pozitif kabul edilen bazı serum örneklerinde düşük titrede antikor saptanması, fakat bu örneklerin RPA ve PHA ve ELISA'da pozitif sonuç vermesi, infeksiyonun serolojik olarak saptanmasında SAT/AGT testi yanında diğer testlerden en az bir testin daha kullanılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, özellikle infertil kısıraklarda *T.equi genitalis* izolasyonunun yapılamaması, etkenin izolasyonun güç olması ve *in vitro* koşullarda düşük multiplikasyon oranına sahip olması nedeniyle yanlış negatif sonuçlara bağlanmaktadır. Bu durumu ortadan kaldırmak için serolojik testlerle spesifik antikorların araştırılması ve bu testlerden SAT/AGT testi kullanılacaksa mutlaka diğer testlerle de desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Benson JA, Dawson FLM, Durrant DS, Edwards PT, Powel AG (1977): *Serological response in mares affected by contagious equine metritis* 1977. Vet Rec. 102, 277-280.
2. Brewer RA (1983): *Contagious equine metritis. A review.* Vet Bul. 53, 881-891.
3. Donahue JM, Swerczek TW, Smith BJ (1978): *Laboratory Diagnosis of Contagious Equine Metritis.* American Association Veterinary Laboratory Diagnosticians 21st Annual Proceedings, Lexington.
4. Eckstein K, Merkt H, Kirpal G, Klung E (1983): *Erhebungen über Verbreitung und Bedeutung der uberttragbaren gebarmutterentzündung der Pferde (CEM 77) in Bundesrepublik Deutschland.* Der Praktische Tierarzt, 12, 1096-1104.

5. Eguchi M, Kuniyasu C, Kishima M (1988): *Passive hemagglutination test for detection of antibodies against Taylorella (Haemophilus) equigenitalis in sera of mares*. Vet Microbiol, **18**, 155-161.
6. Fernic AS, Cayzer I, Chalmers SR (1979): *A passive hemagglutination test for the detection of antibodies to the contagious equine metritis organism*. Vet Rec, **104**, 260-262.
7. Frank CJ, Davit JSE, Smith H (1979): *Code of practice for the control of contagious equine metritis and other equine reproductive disease for the 1980 covering season*. Vet Rec, **105**, 395-397.
8. Gummow B, Her S, Brett OL (1987): *A rapid microtitration serum agglutination test for the detection of contagious equine metritis antibodies*. Onderstepoort J Vet Res, **54**, 97-98.
9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994): *Genus Taylorella*. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.
10. Hughes JP (1978): *Contagious equine metritis: A review*. Theriogenol, **11**, 209-216.
11. Kamada M, Akiyama Y, Oda T, Fukuzawa Y (1981): *Contagious equine metritis: Isolation of Haemophilus equigenitalis from horses with endometritis in Japan*. Jpn J Vet Sci, **43**, 565-568.
12. Kikuchi N, Tsunoda N, Kawakami Y, Murase N, Kawata K (1982): *An outbreak of contagious equine metritis in Japan: Isolation of Haemophilus equigenitalis from troughbred mares with genital infection in Hokkaido*. Jpn J Vet Sci, **44**, 107-114.
13. Klug E, Merkt H, Kirpal G, Fluge A (1987): *Mapnahmen zur eindammung einesakuten auftretens der kontagiösen equiner metritis (CEM 77) in Bereich einer Stallischen Deckstelle*. Dtsch Tierarztl Wschr, **97**, 153-208.
14. Lorin D, Prillohofer K, Arbeiter K (1984): *Nacwies der kontagisen equinen metritis (CEM) in Österreich*. Wien Tierarztl Wschr, **81**, 81-85.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): *Protein measurements with folin phenol reagent*. J Biol Chem, **193**, 265-275.
16. Parlevliet JM, Bleumink-Pluym NMC, Houwers DJ, Remmen JLAM, Sluijter FJH, Colenbrander B (1997): *Epidemiologic aspects of Taylorella equigenitalis*. Theriogenology, **47**, 1169-1177.
17. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (1994): *Taylorella equigenitalis*. Clinical Veterinary Microbiology Wolfe Publishing, London.
18. Sahu SP (1981): *Contagious equine metritis: Effect of vaccination on control of the disease*. Am J Vet Res, **42**, 45-48.
19. Sahu SP (1981): *Contagious equine metritis: Evaluation of erythrocytes of various species in the passive hemagglutination test*. Vet Rec, **108**, 235-236.
20. Sahu SP, Hamdy FM, Dardiri AH (1979): *Contagious equine metritis: Development of enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibody to contagious equine metritis organism*. Proc Annu Meet US Anim Health Assoc, **83**, 243-252.
21. Sahu SP, Rommel FA, Fales WH, Hamdy FM, Swerczek TW, Youngquist RS, Bryans JT (1983): *Evaluation of various serotests to detect antibodies in ponies and horses infected with contagious equine metritis bacteria*. Am J Vet Res, **44**, 1405-1409.
22. Sugimoto C, Isayama Y, Sakazaki R, Kuramochi S (1983): *Transfer of Haemophilus equigenitalis Taylor et al. 1978 to the Genus Taylorella gen.nov. as Taylorella equigenitalis camb.nov*. Curr Microbiol, **9**, 155-162.
23. Swerczek TW (1981): *Contagious equine metritis: Test for suspect carriers*. Vet Rec, **108**, 420-421.
24. Tainturier D, Delmas CF, Dabernat HJ (1981): *Bacteriological and serological studies of Haemophilus equigenitalis, agent of contagious equine metritis*. J Clin Microbiol, **14**, 355-360.
25. Taylor JED, Rosenthal RO, Brown DEJ, Lapage SP, Hill LR, Legros RM (1978): *The causative organism of contagious equine metritis 1977: proposal for a new species to be known as Haemophilus equigenitalis*. Equine Vet J, **10**, 136-144. Alınmıştır: Sugimoto C, Isayama Y, Sakazaki R, Kuramochi S (1983): *Transfer of Haemophilus equigenitalis Taylor et al. 1978 to the Genus Taylorella gen.nov. as Taylorella equigenitalis camb.nov*. Curr Microbiol, **9**, 155-162.
26. Ter Laak EA, Wagenaars CMF (1990): *Autoagglutination and the specificity of the indirect fluorescent antibody test applied to the identification of Taylorella equigenitalis*. Res Vet Sci, **49**, 117-119.
27. Timoney PJ, Powel DG (1982): *Isolation of the contagious equine metritis organism from colts and fillies in the United Kingdom and Ireland*. Vet Rec, **111**, 478-482.
28. Von H, Selbitz J, Ericces J, Ullrich E, Liebermann H, Örgel I, Friedrich U (1988): *Bakteriologische und serologische untersuchungen an einer experimentell mit Taylorella equigenitalis Stamm Wien Infizierten Ponytute*. Vet Med, **43**, 351-353.
29. Widders PR, Stokes CR, David SE, Bourne FJ (1986): *Specific antibody in the equine genital tract following local immunisation and challenge infection with contagious equine metritis organism (Taylorella equigenitalis)*. Res Vet Sci, **40**, 54-58.

Geliş tarihi : 1.10.2001 / Kabul tarihi : 15.10.2001

Yazışma adresi:

Doç.Dr.Jale Erdeğer
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
06110 Dışkapı/Ankara