

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAVUKLARDA MYCOPLASMA GALLISEPTICUM VE  
MYCOPLASMA SYNOVIAE’NİN TANISINDA PZR  
KULLANIMI**

DOKTORA TEZİ

Erkut GÜRBÜZ

**Danışman**

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

**KONYA- 2008**

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ .....	8
2. LİTERATÜR BİLGİ .....	11
3. MATERYAL VE METOT.....	31
4. BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	52
6. ÖZET .....	58
7. SUMMARY .....	60
8. KAYNAKLAR .....	61
9. ÖZGEÇMİŞ .....	71
10. TEŞEKKÜR .....	72
11. EKLER .....	73

<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>8</b>
<b>2. LİTERATÜR BİLGİ</b> .....	<b>11</b>
2.1. Kanatlılarda Solunum Sistemi .....	11
2.1.1. Kanatlılarda solunum sisteminin anatomik ve fizyolojik yapısı .....	11
2.1.2. Kanatlılarda solunum sisteminin savunma mekanizması .....	11
2.1.3. Kanatlılarda solunum sisteminde bağışıklık ve bağışıklığın baskılanması .....	12
2.2. Mikoplazma etkenlerinin genel özellikleri .....	13
2.2.1. Karakterizasyon .....	13
2.2.2. Sınıflandırma .....	14
2.3. <i>M. gallisepticum</i> 'un Özellikleri .....	14
2.3.1. <i>M. gallisepticum</i> 'un etiyolojisi .....	14
2.3.2. <i>M. gallisepticum</i> 'un Patobiyoloji ve Epizootiyolojisi .....	15
2.3.2.1. İnsidensi ve yayılımı .....	15
2.3.2.2. Bulaşma .....	16
2.3.2.3. İnkübasyon periyodu .....	17
2.3.2.4. Klinik bulgular .....	17
2.3.2.5. Morbidite ve mortalite .....	17
2.3.2.6. Patoloji .....	18
2.3.2.7. Enfeksiyonun patogenezi .....	18
2.3.2.8. Bağışıklık .....	18
2.3.3. <i>M. gallisepticum</i> Teşhisi .....	19
2.3.3.1. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu .....	19
2.3.3.2. Etkenin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile teşhisi .....	20
2.3.3.3. Seroloji .....	21
2.3.4. <i>M. gallisepticum</i> 'dan korunma .....	22
2.3.4.1. Kümes deznfeksiyonu ve biyogüvenlik .....	22
2.3.4.2. Aşılama .....	22
2.3.5. Tedavi .....	23
2.4. <i>M. synoviae</i> 'nin Özellikleri .....	24
2.4.1. <i>M. synoviae</i> 'nin etiyolojisi .....	24
2.4.2. <i>M. synoviae</i> 'nin patobiyolojisi ve epizootiyolojisi .....	25
2.4.2.1. Bulaşma .....	25
2.4.2.2. İnkübasyon periyodu .....	25
2.4.2.3. Klinik bulgular .....	25
2.4.2.4. Morbidite ve mortalite .....	26
2.4.2.5. Patoloji .....	26
2.4.2.6. Enfeksiyonun patogenezi .....	26
2.4.2.7. Bağışıklık .....	26
2.4.3. <i>M. synoviae</i> 'nin teşhisi .....	26
2.4.3.1. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu .....	26
2.4.3.2. Seroloji .....	27
2.4.3.3. <i>M. synoviae</i> 'nin moleküler metotlar ile teşhisi .....	27
2.4.3.4. Ayırt edici teşhis .....	28
2.4.4. <i>M. synoviae</i> 'dan korunma tedbirleri .....	28
2.4.4.1. Aşılama .....	28
2.4.5. Tedavi .....	28
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	28
2.5.1. PZR'nin mikoplazmoziste kullanımı .....	29

<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>31</b>
3.1 MATERYAL .....	31
3.1.1. Organ ve sıvap örnekleri.....	31
3.1.2. <i>M. gallisepticum</i> ve <i>M. synoviae</i> suşları .....	31
3.1.3. Besiyerleri.....	32
3.1.4. Seroloji.....	32
3.1.4.1. Kan serum örnekleri.....	32
3.1.4.2. Lam aglütinasyon test (LAT) antijeni.....	33
3.1.4.3. Enzim linked immunosorbent assay (ELISA) testi.....	33
3.1.4.3.A. ELISA test kiti .....	33
3.1.4.3.B. ELISA okuyucusu .....	33
3.1.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	33
3.1.5.1. DNA amplifikasyonunda kullanılan malzemeler .....	33
3.1.5.1.A. Thermal cyclers .....	33
3.1.5.1.B. Primerler.....	33
3.1.5.1.B.1. <i>M. gallisepticum</i> spesifik primerleri .....	33
3.1.5.1.B.2. <i>M. synoviae</i> spesifik primerleri .....	33
3.1.5.1.C. Taq polimeraz.....	33
3.1.5.1.D. Deoxynucleotid set.....	34
3.1.5.2. Oluşan DNA'ların görüntülenmesi .....	34
3.1.5.2.A. Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler .....	34
3.1.5.2.B. Film .....	34
3.1.5.2.C. Marker .....	34
3.2. METOT .....	35
3.2.1. Organ ve sıvap örneklerinin toplanması .....	35
3.2.2. İzolasyon çalışmaları .....	35
3.2.2.1. Örneklerin besiyerlerine ekimi .....	35
3.2.2.2. Üreme takibi ve değerlendirilmesi.....	35
3.2.3. İdentifikasyon çalışmaları.....	35
3.2.3.1. Üreyen kolonilerin dinens boyası ile boyanarak incelenmesi.....	35
3.2.3.2. Digitonin duyarlılık testlerinin hazırlanması ve yapılması .....	36
3.2.3.3. Biyokimyasal testlerin hazırlanması ve uygulanması.....	36
3.2.3.3.A. Glikoz fermentasyon testi .....	36
3.2.3.3.B. Arjinin hidroliz testi .....	36
3.2.3.3.C. Tetrazolyum redüksiyon testi.....	36
3.2.3.3.D. Film ve spot oluşumunun değerlendirilmesi.....	37
3.2.3.4. Üreme inhibisyon testlerinin uygulanması .....	37
3.2.4. Serolojik testlerin uygulanması .....	37
3.2.4.1. Serolojik testlerde kullanılacak serumların hazırlanması .....	37
3.2.4.2. Çabuk lam aglütinasyon testinin yapılışı .....	37
3.2.4.3. Serum titrelerinin ELISA ile belirlenmesi .....	37
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	38
3.2.5.1. DNA ekstraksiyonu.....	38
3.2.5.2. Tekli ve multipleks PZR ile DNA amplifikasyonu .....	38
3.2.5.3. Amplifiye edilen örneklerin agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi...38	
3.2.6. Testlerin sensitivite ve spesifitesinin hesaplanması.....	38
3.2.7. İstatistik analizler .....	39
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>40</b>
4.1. Kültür Bulguları .....	40

4.2. Biyokimyasal Bulgular .....	41
4.3. Serolojik Bulgular .....	41
4.4. PZR Bulguları .....	47
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>52</b>
<b>6. ÖZET .....</b>	<b>58</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>60</b>
<b>8. KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>71</b>
<b>10. TEŞEKKÜR .....</b>	<b>72</b>
<b>11. EKLER .....</b>	<b>73</b>

## TABLÖLAR

<b>Tablo 2.1. Kanatlı Mikoplazma Türlerinin Özellikleri .....</b>	<b>16</b>
<b>Tablo 3.1. Örnek alınan tavukların yaşları, kümeslere göre dağılımı ve klinik bulguları.....</b>	<b>31</b>
<b>Tablo 3.2 Testlerin sensitivite ve spesifitesinin hesaplanması .....</b>	<b>39</b>
<b>Tablo 4.1 Örneklerin kültür sonuçları.....</b>	<b>40</b>
<b>Tablo 4.2. Kümes bazında kültür ve PZR sonuçları .....</b>	<b>41</b>
<b>Tablo 4.3. Kültür pozitif örneklerin biyokimyasal bulguları. ....</b>	<b>42</b>
<b>Tablo 4.4. Serolojik test (LAT ve ELISA) sonuçları .....</b>	<b>43</b>
<b>Tablo 4.5 Sıvap örnekleri alınan tavukların LAT ve ELISA bulguları.....</b>	<b>43</b>
<b>Tablo 4.6 Sıvap örnekleri alınan tavuklara ait kültür, LAT ve ELISA testi bulguları .....</b>	<b>44</b>
<b>Tablo 4.7. MG LAT testinin sensitivite ve spesifitesi.....</b>	<b>45</b>
<b>Tablo 4.8. MS LAT testinin sensitivite ve spesifitesi .....</b>	<b>46</b>
<b>Tablo 4.9. MG ELISA testinin sensitivite ve spesifitesi.....</b>	<b>46</b>
<b>Tablo 4.10. MS ELISA testinin sensitivite ve spesifitesi.....</b>	<b>46</b>
<b>Tablo 4.11. Örneklere ait kültür ve PZR sonuçları. ....</b>	<b>48</b>
<b>Tablo 4.12. MG PZR testinin sensitivite ve spesifitesi.....</b>	<b>50</b>
<b>Tablo 4.13. MS PZR testinin sensitivite ve spesifitesi.....</b>	<b>50</b>

## KISALTMALAR

AGP:	Agar Jel Presipitasyon
AKC:	Nekropsi yapılan tavukların akciğerlerinden alınan sıvıplar
AI:	<i>Avian influenza</i>
APFA:	Agar Plate Floresan Test
APV:	<i>Avian pneumovirus</i>
CT:	Canlı tavukların trakealarından alınan sıvıplar
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
ES:	Nekropsi yapılan tavukların eklem sıvılarından alınan sıvıplar
FAT:	Floresan Antikor Tekniği
FMS:	%12 domuz serumu içeren Frey's medyum
HI:	Hemaglutinasyon İnhibisyon
HK:	Nekropsi yapılan tavukların hava keselerinden alınan sıvıplar
IB:	<i>Infectious Bronchitis</i>
ILT:	<i>Infectious laryngotracheitis</i>
KOB:	Koloni oluşturan birim
KEF:	Kanatlı embriyo fibroblast
LAT:	(abuk) Lam Aglutinasyon Testi
MG:	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MI:	<i>Mycoplasma iowae</i>
MM:	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS:	<i>Mycoplasma synoviae</i>
ND:	<i>NewCastle Hastalığı</i>
ng:	Nanogram (1/1.000.000 gram)
ÖT:	Nekropsi yapılan tavukların trakea ve infraorbital sinuslarda alınan sıvıplar
PBS:	Fosfat Buffer Saline
pg:	Pikogram (1/1000 nanogram)
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPF:	Spesifik Patojen Ari
UTGP:	Ulusal Tavukçuluk Geliştirme Programı
UV:	Ultraviyole ışık

## 1. GİRİŞ

Mikoplazmozis genellikle piliç, tavuk ve hindilerde solunum sisteminde yerleşen ve ağır ekonomik kayıplara yol açan bir hastalıktır. Hastalık solunum sisteminde kronik bozukluklara neden olduğundan “*kronik solunum yolu hastalığı*” (*Chronic Respiratory Disease*) CRD olarak ta tanımlanmaktadır (Charlton ve ark 1996). Kümes hayvanlarında patojen etkiye sahip olan suşlar gram negatif, hareketsiz, kapsülsüz ve diğer mikoplazma türleri gibi hücre duvarları bulunmayan, mikroskopik olarak kokoid ve pleomorfik bir görünüme sahip olan *Mycoplasma gallisepticum* (MG) , *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) ve *M. iowae* (MI)’ dir (Kleven 2003).

Kanatlılarda mikoplazmozis etkeni olarak çoğunlukla *M. gallisepticum* ile karşılaşılır. *M. gallisepticum* genelde *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* ve *Haemophilus paragallinarum* ile miks enfeksiyon oluşturmasının yanı sıra İnfeksiyöz bronchitis (IB) ve Newcastle hastalığı (ND) ile de beraber seyrebilmektedir. Dış ortamlarda birkaç günden fazla yaşama şansı olmayan *M. gallisepticum* tavuklarda herhangi bir hastalık yapmadan bulunabilmektedir. Ancak enfeksiyonların birlikte seyrettiği hallerde ya da kümes şartlarının kötülüğü, yem kalitesinin düşüklüğü, idari yetersizlikler, ani hava değişimleri, IB veya ND aşımaları, kümeslerde amonyak gaz düzeylerinin aşırı yükselmesi ve ayrıca tozlu hava gibi stres oluşturan hallerde ağır ve kronik enfeksiyonlar oluşturabilmektedir (Charlton ve ark 1996).

Bulaşmanın hastalıklı hayvanların solunumları sırasında hava yolu ile yem, su ve yaşam ortamlarının kontaminasyonu sonucu olmaktadır. Enfeksiyon etkenleri, kuşlar, kontamine ayakkabılar, giyisiler ve kümes ekipmanları ile bulaşabilir. Enfekte tavukların yumurtalarıyla civcivlere transovaryan yolla geçen hastalık, civcivler arasında hızlı bir lateral yayılım gösterir (Charlton ve ark 1996). Enfeksiyon, enfekte hayvanlarda antikor belirlenemeyen ve 12- 21 gün arasında seyreden birinci dönem ya da latent dönem, enfekte hayvanların %5-10’unda hastalığın klinik olarak gözlemlendiği 1- 21 gün arasında seyrebilen 2. dönem, sürünün %90-95’inde antikor titrelerinin yükseldiği 7- 32 gün süregelen 3. dönem ve sürünün tamamında antikorların saptandığı 4. dönem olmak üzere 4 ayrı döneme ayrılmaktadır (McMartin 1987).

Kuluçka süresi 6- 21 gün arasında değişen hastalığın çıkışını birçok faktör etkilemektedir (Kleven 2003).

Klinik bulgular genelde yavaş oluşur ve şiddeti değişmekle beraber haftalar hatta aylar sürebilir. Öksürük, burun akıntısı, burun ve gözden gelen akıntı ve trakeal tıkanma bulguları ile yumurtlayan tavuklarda yem tüketiminde ve yumurta randımanında düşüş, broylerlerde yem tüketimi ve yemden yararlanmada azalma, çevre faktörlerine bağlı yüksek mortalite gözlenir. Trakeada, burun boşluğunda, sinüslerde ve bronşlarda fark edilir düzeyde kataral bir yangı, hava keselerinde kalınlaşma, hava kesesi yangısı, fibrinöz perihepatit ve yaygın perikardit görülebilir. Bu bulgular patognomonik olmayıp *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* ve diğer tür spesifik bakterilere bağlı septisemilerde ve klamidiozide de görülebilir. Hindilerde ise infraorbital sinüsler şişer (Charlton ve ark 1996).

Mikoplazmoziste enfeksiyondan 7-10 gün gibi kısa bir süre sonra oluşan etkene özgü antikoları tespit etmek için hızlı, ucuz ve sensitiv olmasından dolayı en çok tercih edilen serolojik tarama testi lam aglütinasyon testidir (LAT). Lam aglütinasyon testi genelde büyüme döneminde sürünün %10'nu temsil edecek örnek, yumurtlama döneminde ise her sürüden 30 adet serum örneği alınarak MG, MS ve MM için üretilmiş boyalı antijenlerle yapılır (Kleven 1998). Lam aglütinasyon testinin en büyük dezavantajı yanlış pozitifliktir ve testin uygulandığı sürülerde gerçek pozitiflik ya da negatifliği tespit etmek için hemaglütinasyon inhibisyon (HI) ve ELISA testleri kullanılır veya serumların 1:10 dilusyonu ile LAT tekrarlanır. Ticari ELISA test kitlerinin kalitesinin iyi olmasına rağmen bazen yanlış pozitif sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (Kempf ve ark 1998).

Mikoplazmoziste kesin teşhis için kültür "altın standart" tır. Örneklerde yeteri kadar mikroorganizma olmama ihtimali, izolasyonun zaman almasından dolayı oldukça sensitiv ve spesifik PZR tesleri teşhiste kullanılmaktadır (Nascimento 1991, Silveria 1996, Wang 1997, Salisch ve ark 1998).

Mikoplazmozisten korunmada biyogüvenlik prosedürlerinin yanı sıra MG ve MS'nın değişik suşlarından (MGF, MGts-11, MG6/85, MS89079/7NS) elde edilen aşuların kullanılabilirdiği, fakat hastalık teşhisinde konvansiyonel serolojik veya izolasyon metodlarının aşı suşunu saha suşundan ayırmada yetersiz kaldığı ve PZR ile ayırımının yapılabileceği bildirilmektedir (Nascimento 1993)

Tedavide enfekte sürülerde sürüyü stres koşullarından uzak tutarak, bakım besleme şartlarını iyileştirerek, kümes içi toz ve amonyak seviyesini azaltarak, tylosin ve tetrasiklin gibi antibiyotikler kullanılmaktadır (Charlton ve ark 1996).

Ülkemizde CRD enfeksiyonunun varlığı serolojik testlerle ortaya konmuş ve verim kayıplarına sebep olan bir hastalık olduğu bildirilmiştir (Özkal 1956, Atılgan 1964, Atılgan ve Yeşilada 1967, Esendal 1991, Ülgen 1991). Güler (1992) Veteriner Kontrol Araştırma Enstitülerinde tanısı konan hastalıklar arasında yaklaşık %19'luk bir oranla CRD'nin ilk sırada olduğunu bildirmiş, 33 işletmede yaptığı serolojik incelemelerde LAT testi ile 20 (%60)'sinin HI testi ile ise 6 (%18)'sının pozitif sonuç verdiğini tespit etmiştir.

Kanatlılarda mikoplazmoziste hem ürün kaybından hem de uygulanan tedavilerden dolayı ekonomik kayıplar olmakta, bu ekonomik kayıpların en az düzeye indirmek için hastalığın kesin teşhisinin yapılması gerekmektedir. Hastalık teşhisinde geliştirilen kültür ve seroloji kesin teşhiste yetersiz kalmakta ve ucuz, hassas ve kolay uygulanabilen bir test ile desteklenmesi için geliştirilen PZR testinin kullanılabilirliği yapılan birçok araştırmada (Nascimento 1991, Silveria 1996, Wang 1997, Salisch ve ark 1998) incelenmiştir.

Bu çalışmada, ticari yumurtacı kümeslerde MG ve MS enfeksiyonlarının rutin teşhisinde PZR'ın kullanılabilirliğini araştırmak amaçlanmıştır.

## **2. LİTERATÜR BİLGİ**

### **2.1. Kanatlılarda Solunum Sistemi**

#### **2.1.1. Kanatlılarda solunum sisteminin anatomik ve fizyolojik yapısı**

Kanatlıların solunum sistemleri akciğerler, hava keseleri ile larinks, trakea ve akciğer dışı bronşları kapsayan akciğer dışı kanallardan oluşmaktadır. Bu sistem filtre edilen, ısıtılan ve nemlendirilen havanın akciğerlere ulaştırılması yanı sıra ses oluşumunu da sağlamaktadır (Duncker 1974).

Akciğerler içinde tek parçadan oluşan primer bronşlar, üç ana bölümden oluşan sekonder bronşlar ve hava ile kan arasında O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> değişiminin gerçekleştiği üçüncül (parabronşlar) bronşlardan oluşmaktadır. Parabronşlarda O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> değişiminin gerçekleştiği yüzeylerin %80'ni kapsayan kısım paleobronşlar ve geri kalan yüzeyini oluşturan kısımlar neopulmonik parabronşlar olarak isimlendirilmektedir. Çeşitli sekonder bronşlardan köken alan ve primer bronşlara doğru seyreden kanatlıların hava keseleri kranial ve kaudal olmak üzere iki ana kısımdan oluşur ve çoğu kanatlı türünde 9 adet bulunur. Hava keselerinin kanla beslenmesi zayıf olduğundan kana oksijen sağlanmasında önemli değildirlir (Fedde 1994).

#### **2.1.2. Kanatlılarda solunum sisteminin savunma mekanizması**

Solunum sistemi bazal membranları aerodinamik filtrasyon, mukosiliar transport, akciğerlerde devreye giren tuzaklar ve fagositoz gibi bağışıklık sisteminin devreye girmedikleri sistemlerle korunur. Solunum sistemine alınan hava içindeki büyük partiküller (3.7-7 mikron) burun boşluğunda ve trakeanın ön tarafında filtre edilerek tutulurken bu filtrasyondan kurtulan 0.09–1.1 mikron çapındaki birçok virus, bakteri, mantar sporları ve toz zerrecikleri solunum sisteminin derinliklerine doğru yayılır ve hastalıklara neden olurlar (Ficken 1994). Filtrasyondan kurtulan ve akciğerlere ulaşan partiküller mukosiliar transportla akciğerlerin bazal membranlarına iletilir ve buradaki makrofajlar tarafından parçalanırlar. Bu parçalanmadan kurtulan partiküller bazal membranları geçerek bölge hücrelerine girer ya da kan ve lenf dolaşımına ulaşırlar (Stearns 1987).

Filtrasyondan kurtulan ve akciğerlere ulaşan büyük partiküllerin yok edilmesinde görev alan mukosiliaların, siliostazis, siliaların kaybı ve ölümü gibi nedenlerle aktivitelerini kaybetmeleri halinde büyük partiküllerin akciğerlerdeki sayılarının yükseldiği görülmüş ve amonyak gazının siliostazis'e ve siliaların kaybına ve respiratorik virusların (örn. Newcastle virüsü, Yucapia virüs, Influenza virüsü ve Adenovirüs) siliaların kaybına ve fazla

miktarda tozun solunmasın da mukus sekresyonunun artışıyla yabancı parçacıkların solunum sistemindeki membranlara yapışmasına yol açtığı bildirilmiştir (Green 1977)

Savunmada yer alan diğer bir unsur ise fagozitoz ile başlayan, fagositik hücrenin ölümü ve hücrenin mukosiliar transport ile ortamdaki uzaklaştırılması ve komplement fikzasyon aracılığıyla lizisi ile sonuçlanan bakteriyel temizlik olarak adlandırılan bakterilerin solunum sisteminden uzaklaştırılmasıdır. Trakeada mukosiliar transport ile fiziksel uzaklaştırma en önemli savunma mekanizması iken, akciğerlerde bakteriyel temizlik özellikle silialı epitelin bulunmadığı alanlarda daha önemli yer tutar. Bakteriyel temizlik mekanizmasında görev alan yüzeysel koruyucu maddelerin, esansiyel yağ asitlerinden yetersiz beslenen kanatlılarda azalması sonucu mikrobik olmayan solunum yolu hastalığı gelişebilir (Ficken 1994).

Solunum havası ile alınan tozların makrofajlarda fazla depolandıkları zaman makrofajların mikroorganizmaları fagosite etme şansları azalır. Newcastle (ND) virusu ve amonyak gazı fagositik aktivitede azalmaya yol açarken, Avian Influenza (AI) virusu tamamıyla durdurur (Stearns 1987).

Normal şartlar altında hücreler bakteriyel kolonizasyona karşı daha dayanıklı iken viral bir etkenle enfekte hücreler kolonizasyona karşı daha duyarlı hale gelirler. Kolonizasyon yeteneğine sahip bir bakteri ise o bölgeye kolonize olduktan sonra bazal membranı geçerek dolaşıma ulaşır ve bakteriyemiye sebep olur (Ackermann ve ark 1991).

### **2.1.3. Kanatlılarda solunum sisteminde bağışıklık ve bağışıklığın baskılanması**

Kanatlı hayvanların gelişimi sırasında bursa Fabricius'tan köken alan B hücreleri ve timustan köken alan T hücreleri olgunlaştıktan sonra primer organlardan dalak, gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve ürogenital sistemden oluşan sekonder lenfoid organlara göç ederler. Bir enfeksiyon varlığında eğer lokal bağışıklık yeterli olmazsa sekonder organlar aracılığıyla sistemik bir immün yanıt başlar (Sharma 1994).

Patojen etkenlerin solunum sistemine ulaşması halinde bölgede bulunan lenfoid dokulardan lokal antikor sentezi ve salınımı başlar. Üst solunum yolunun sekonder lenfoid organı olan Harder bezi lokal spesifik antikor üretimi yapabilmesine karşın (Davelaar 1982), MG'ye karşı antikor oluşturmadığı ileri sürülmüştür (Karaca ve ark 1989).

Solunum sisteminin sekonder lenfoid organlarında sentezlenen antikorlar tükürük, gözyaşı, burun akıntısı, trakea ve akciğer lavajı ile elde edilen sıvılarda saptanmıştır. Genelde solunum sisteminde varlığı belirlenen antikorlar IgG ve IgM'ler olmasına karşın

mukozal bağışıklıkta sorumlu IgA'ların üretildiği belirlenmiş ve kanda görülen antikor tiplerinin solunum sistemiyle uyumlu olduğu gözlenmiştir (Sharma 1994).

## **2.2. Mikoplazma etkenlerinin genel özellikleri**

Sadece bir plazma membranı ile çevrelenmiş hücre duvarı olmayan küçük prokaryotik hücreler olan mikoplazmalar kızarmış yumurtaya benzeyen bir koloni morfolojisine sahiptirler ve hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotiklere dirençlidirler (Kleven 2003). *Mycoplasmataceae* familyasının genel özelliklerini taşıyan bu etkenler hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdürler. Gram negatif olmalarına rağmen anilin boyaları ile güç boyanırlar. Giemsa, Macchiavello ve Castaneda gibi boyama yöntemleri ile boyanabilen bu mikroorganizmalar hücre duvarı olmadığından pleomorfik özelliğe sahiptirler ve diğer bakterilerden farklı olarak peptidoglikan polimerinden yoksundurlar. Bunun yerine “unit membran” diye adlandırılan lipidlerden (*fosfolipidler, glikolipidler, lipoglikanlar, steroller*), karbonhidratlardan ve proteinlerden oluşan bir katmanla çevrilmişlerdir. Unit membrandaki karbonhidratlar, komplemanı fikse etmede ve nötralizan antikorların saptanmasında rol oynarken, proteinler, metabolik inhibisyon ve presepitasyonda rol alan antikorların sentezini uyarırlar. *M. gallisepticum*'da bu katmanın üzerinde plazma membranından orijin alan yarım ay şeklinde kabarcıklar bulunur. Bu çıkıntılar epitel hücrelerine ve eritrositlerdeki glikoforin reseptörleri yardımıyla da eritrositlere tutunmasını sağladıklarından hemaglutinasyon özelliğine sahiptir (İzgür 1997). Genelde konakçıya özgü olan mikoplazmaların bazıları sadece bir tür hayvanda hastalık oluşturabilirken bir kısmında farklı hayvan türlerinde hastalık yapabilirler. Mikoplazmalar insanlarda, hayvanlarda ve böceklerde bulunabilirler. Genelde mukoza yüzeyinde bulunan mikoplazmaların birçoğu invaziv değilken, *M. gallisepticum* gibi bazı türler hücrelere penetre olabilmektedir (Kleven 2003).

### **2.2.1. Karakterizasyon**

Kanatlılardan izole edilen mikoplazma türlerinin çoğu %10-15 at serumu eklenmiş yüksek protein içeren besi yerlerine gereksinim duyarlar, maya yan ürünlerinin ilavesi üremelerini hızlandırır. Besi yerlerine nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) ilavesi *M. synoviae* üremesi için zorunludur. Mikoplazmalar genelde yavaş üreyen, 37-38°C'lik ısıya gereksinim duyan, besi yerine katıldıklarında diğer mikroorganizmaların üremesini durduran talyum asetat ve penisiline karşı daha dirençli bakterilerdir. Katı besi yerlerinde patojen olmayan suşlardan *M. gallinarum* ve *M. gallinaceum* 1. günde ürerlerken, patojen

suşlar 37°C’de 3-10 gün arasında, küçük (0,1-1,0 mm çapında), yuvarlak, köşesiz ve orta kısımlarında yoğunlaşma gösteren koloni morfolojisi ile çoğalabilirler. Glikozu son ürün olarak asite fermente eden ya da edemeyen olmak üzere iki gruba ayrılan mikoplazmalar genelde fosfotaz ve arjinin dekarboksilaz aktivitelerine sahiptirler ve birçok tür enerji kaynağı olarak glikozun fermentasyonu yerine bir aminoasit olan arjinini kullanırken, *M.iowae* ve birkaç tür hem glikozu fermente edebilir hem de arjininin hidrolizini gerçekleştirebilirler. *M. gallisepticum*, *M. synoviae* ve *M. meleagridis*’in tavuk ve hindi eritrositlerini hemaglütime edebildiklerinden, hemaglütinin antijenleri bu türlerin serolojik tanısında kullanılmaktadır. Floresan antikor tekniği (FAT) mikoplazma izolatlarının tanısında kullanılan en yaygın yöntem olmasına karşın, üreme inhibisyon ve immünodifüzyon gibi testlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kleven 2003). Ancak son yıllarda bu yöntemlere PZR da katılmıştır (Lauerman ve ark 1993).

### **2.2.2. Sınıflandırma**

Mikoplazmalar; 100’den fazla türü olan, 600 – 1350 kb genome sahip, üreme için kolesterole ihtiyaç duyan bir kısmı insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilen ve 37°C’de optimum üreme gösteren, *Mycoplasmataceae* familyasına bağlı Genus I de yer alan mikroorganizmalardır. Aynı familyanın Genus II’sinde *Ureaplazmalar* yer alırken, Genus III te ise üremeleri için besi yerlerinde kolesterol gereksinimi duymayan *Acholeplasma*’ lar bulunur (Kleven 2003). Tablo 2.1 de mikoplazma türleri ve özellikleri sunulmuştur (Kleven 1998).

### **2.3. *M. gallisepticum*’un Özellikleri**

#### **2.3.1. *M. gallisepticum*’un etiyolojisi**

Zayıf gram negatif özellikte olan ve anilin boyaları ile güç boyanan MG ışık mikroskopunda kokoid bir yapı gösterir ve yaklaşık 0,25- 0,5 mikron büyüklüğündedirler. Mikoplazma türlerini diğer bakteri türlerinden ayırt eden en önemli özelliklerinden biri üremesi için besi yerine katılması gereken kolesterole duyduğu gereksinimdir (Arda 1982, Tully 1983).

*M. gallisepticum*, glikoz ve maltozu gaz oluşturmada fermente edebilirken, laktoz, ksiloz, arabinoz, sorbitolu fermente edemez. Fozfataz aktivitesi negatiftir ve arjinini hidrolize edemez. *2,3,5 triphenyl tetrazolium*’u ve *neotetrazolium*’u indirgediği bildirilmiştir (Razin 1984). Ülgen (1991) *M. gallisepticum*’u diğer mikoplazmalardan ayırıcı teşhisini yapabilmek için özellikle glikoz fermentasyon, tetrazolium reduksiyon,

arjinin hidrolizi ve film-spot oluşumu testlerinin uygulanması gerektiğini bildirmiştir. Branton ve ark (1997b) binde altmış üç oranında amonyum kloridli su tüketen tavukların sinus boşluklarından MG izolasyonunun çok zor olduğunu, izolasyon yapabilmek için örnek sayısını iki katına çıkarılmasını ve örneklerin trakeadan alınmasını önermişlerdir.

*M. gallisepticum*, MM ve MI gibi patojenik kanatlı mikoplazma etkenlerinin yüzey proteinlerinin ve hemaglutininlerinin antijenik yapıda ve dolayısıyla immün yanıtta farklılık oluşturabileceği bildirilmiştir (Bencina 2002).

Tavuk ve hindilerde, MG izolatları arasında saha suşlarına göre daha zor izole edilen patojenitesi, bulaşabilme gücü ve immunijenitesi daha düşük olan varyant ve klasik suşların varlığı bildirilmiştir (Razin ve ark 1998).

### **2.3.2. *M. gallisepticum* 'un Patobiyoloji ve Epizootiyolojisi**

#### **2.3.2.1. İnsidensi ve yayılımı**

Tüm dünyada ticari tavukçuluğun yapıldığı bölgelerde yetiştiricilerin karşısına çıkan ekonomik önemi olan MG enfeksiyonlarında (Kleven 1996), Amerika Birleşik Devletlerinde son 40 yılda uygulanan Ulusal Tavukçuluk Geliştirme Programı (UTGP) sayesinde ticari sürülerde gözle görülür bir azalma tespit edilmiştir. Fakat halen ticari et tipi işletmelerde ve farklı yaş grubu bulunan yumurtacı işletmelerde hastalığın endemik olarak seyrettiği ve bunun da en önemli sebeplerinden birinin arka bahçe tavukçuluğu olarak tanımlanan küçük aile işletmelerinin yaptığı kontrolsüz tavukçuluk olduğu bildirilmiştir (AAAP/AVMA, 2001).

Ülkemizde CRD enfeksiyonunun varlığı ilk kez Özkal tarafından 1956 yılında bildirilmiştir (Atılgan 1964). Atılgan ve ark (1967), inceledikleri 415 tavuk serumunun 130'unda (%31.3) pozitiflik saptamışlardır. Esenal (1991) Ankara çevresinde incelenen 900 tavuk serumunun LAT ile 182 (%20.22), HI testi ile 128 (%14.22), agar jel presipitasyon (AGP) testi ile 51 (%5.67), ELISA testi ile de 543 (%60.35) pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir. Bursa ve çevresinde incelenen 137 tavuğa ait örneklerden 15 (%11)'inde *M. gallisepticum* izole edilmiş, incelenen 499 kan serumundan, lam aglutinasyon testi ile 242 (%49)'si, hemaglutinasyon inhibisyon testi ile 263 (%53)'ünde pozitiflik saptanmıştır (Ülgen 1991).

### 2.3.2.2 Bulaşma

Kanatlılarda mikoplazma direk temas, enfekte materyal, damlacık, toz, kontamine ekipman, yem, su, kuşlar, rodent ve gübreler ile horizontal, damızlık anaçların yumurtalarından civcivlere transovaryan bulaşmakta ve sürü içinde çok hızlı bir yayılım göstermektedir (Marois ve ark 2002).

**Tablo 2.1. Kanatlı Mikoplazma Türlerinin Özellikleri (Kleven 1998)**

Tür	Konakçı	Glikoz fermentasyonu	Argjinin hidrolizi
<i>A. laidlawiia</i>	Çeşitli	+	-
<i>M. anatis</i>	Ördek	+	-
<i>M. anseris</i>	Kaz	-	+
<i>M. buteonis</i>	Şahin	+	-
<i>M. cloacale</i>	Hindi, Kaz	-	+
<i>M. columbinasale</i>	Güvercin	-	+
<i>M. columbinum</i>	Güvercin	-	+
<i>M. columborale</i>	Güvercin	+	-
<i>M. corogypsi</i>	Siyah akbaba	+	-
<i>M. falconis</i>	Şahin	-	+
<i>M. gallinarum</i>	Tavuk	-	+
<i>M. gallinaceum</i>	Tavuk	+	-
<i>M. gallisepticum</i>	Tavuk, hindi, diğ.	+	-
<i>M. gallopavonis</i>	Hindi	+	-
<i>M. glycyphilum</i>	Tavuk	+	-
<i>M. gypis</i>	Akbaba	-	+
<i>M. imitans</i>	Ördek, kaz, papağan	+	-
<i>M. iners</i>	Tavuk	-	+
<i>M. iowae</i>	Hindi	+	+
<i>M. lipofaciens</i>	Tavuk	+	+
<i>M. meleagridis</i>	Hindi	-	+
<i>M. pullorum</i>	Tavuk	+	-
<i>M. sturni</i>	Avrupa sığırcığı	+	-
<i>M. synoviae</i>	Tavuk, hindi	+	-
<i>U. galloraleb</i>	Tavuk	-	-

Sürünün tamamının MG ile pozitif hale gelmesi hastalık belirtilerinin görünmesinden bir ya da iki hafta sonra olur. *M. gallisepticum* enfeksiyonunun klinik

bulguları ve süresi değişmekle beraber soğuk aylarda hastalık daha uzun sürmekte ve genç tavuklar daha fazla etkilenmektedir (Bokhari 2007). Branton ve ark (1999) tüy dökümü yapılmış tavukların MG enfeksiyonuna daha duyarlı olduklarını bildirmişlerdir.

### **2.3.2.3. İnkübasyon periyodu**

Deneysel enfeksiyonlarda hastalığın kuluçka süresi 6-21 gün arasında tespit edilmesine karşın, saha koşullarında MG'un inkubasyon süresinin değişkenlik gösterdiği ve deneysel enfeksiyonlara göre daha uzun olduğu bildirilmiştir (Bokhari 2007).

### **2.3.2.4. Klinik bulgular**

Branton ve ark (1997b) MG ile doğal enfeksiyonda en karakteristik bulguların trakeal tıkanma, burun akıntısı ve öksürük olduğunu bildirmişlerdir.

*M. gallisepticum* enfeksiyonlarında ilk bulgu olarak gözlenen burun akıntısını, gözlerin köpüklü akıntısı takip eder, broylerlerde canlı ağırlık kaybı ve yem tüketiminde azalma, yumurtacı tavuklarda yem tüketiminde azalma ve yumurta veriminde düşüş, hindilerde infraorbital sinüslerin, burun boşluğunun, trakeanın ve bronşların şişmesi, hava keselerinde kalınlaşma, opasite artışı ve peynirimsi bir eksudat gözlenebilen diğer bulgulardır (Bokhari 2007).

Hussni ve ark (1987) yetiştirme döneminde MG'ye bağlı yumurta üretim kaybının %20 olduğunu bildirmişlerdir.

### **2.3.2.5. Morbidite ve mortalite**

Saha enfeksiyonlarda; morbidite ve mortalite, çevresel ve iklim şartlarına ve sekonder enfeksiyonların tipine bağlı olmakla beraber hafif ve az ölümden, şiddetli ve yüksek ölüm oranlarına kadar değişebilir. Broilerlerde ve hindilerde çevresel şartlar ve idare koşulları iyi değil, stres ve sekonder enfeksiyonlar devreye girmişse ölüm oranları yüksek olur. Yumurtacı tavuklarda ölüm oranları düşük olmasına rağmen birçok hayvanın güçsüz olduğu saptanabilir (Bokhari 2007).

*M. gallisepticum* enfeksiyonunun bir tavuk sürüsünde genelde tüm tavukları etkilemesine rağmen süresinin ve şiddetinin değişkenlik gösterdiği, ND, IB, APV ve E.coli ile miks enfeksiyonlarda hastalık tablosunun çok daha ağır olduğu ve mortalite oranlarının yumurtlayan tavuklarda önemsenmeyecek kadar az iken broylerlerde %0-30 arasında değiştiği bildirilmiştir (Mohammed 1987).

### 2.3.2.6. Patoloji

Branton ve ark (1997a) *M. gallisepticum*'un F suşu ile enfekte edilen tavukların dalak, karaciğer, böbrek ve kemik iliğinin histopatolojik incelemelerinde tüm enfekte tavukların dalak ve kemik iliklerinde lenfosit infiltrasyonlarına rastladıklarını bildirmişlerdir.

*M. gallisepticum* ile deneysel enfekte edilen tavuklarda yapılan histokimyasal incelemelerde trakeada genellikle viral hastalıklarda ortaya çıkan CD8+ T hücreleri tespit edilmiş ve bu hücrelerin enfeksiyonun erken safhalarında ortaya çıktığı, *M. gallisepticum*'un patogenezinde ve hatta mukozada foliküler lezyonların oluşumunda rolü olduğu ileri sürülmüştür (Gaunson 2000).

### 2.3.2.7. Enfeksiyonun patogenezi

Kleven (2003) *M. gallisepticum*'un duyarlı konakçıya ilk olarak üst solunum yolu ve konjunktivadan girdiğini ve solunum sistemindeki mukozal membranlara yüzey proteinleri ve polipeptidleri ile yapışarak enfeksiyonun ilk aşamasını başlattığını bildirilmiştir.

*M. gallisepticum*'un fagositik özelliği olmayan hücrelerin içine girebilmesi ile konakçı direncinde ve antibiyotiklerin etkisinden korunarak kronik enfeksiyonlara ve içlerine girdikleri hücreler ile mukozal bariyerleri geçerek sistemik enfeksiyonlara sebep olduğu bildirilmiştir (Winner 2000).

### 2.3.2.8. Bağışıklık

Mikoplazma enfeksiyonlarında bağışıklık ilk olarak komplement aktivasyonu ile başlar ve makrofajların etkeni yok etmesi ve etkene spesifik antikorların sentezi ile son bulur (Gaunson ve ark 2000). Solunum sistemindeki mukozal membranlara yapışan proteinler ve polipeptidlere karşı gelişen antikorlar tavukların enfeksiyona karşı geliştirdikleri direncin ana faktörlerindedir (Ellakany ve ark 1998). Solunum sisteminden sentezlenen ve salınan antikorların MG'a direnç gelişiminde önemli rol oynadığı ve aynı zamanda bu antikorların MG'nin trakeal epitellere yapışmasını önleyerek antikora bağımlı sellüler bağışıklıkta aracılı önemli bir görev yaptığı bildirilmiştir (Kleven 2003).

*M. gallisepticum* enfeksiyonlarında hem hücresel hem de humoral bağışıklığın önemli olduğu burspektomi ve timektomi çalışmaları ile gösterilmiştir (Gaunson ve ark 2000)

### 2.3.3. *M. gallisepticum* Teşhisi

#### 2.3.3.1. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu

Mikoplazmaların saha materyallerinden izolasyonun güç olduğu ve izolasyon için alınacak örneklerin enfeksiyonun erken dönemlerinde mikroorganizmanın miktarı azalmadan, konakçı dokusu tarafından elimine edilmeden ve mikroorganizma ekstrasellüler ortamdan intrasellüler ortama geçmeden alınmasının izolasyon şansını arttıracığı, dokularda bulunan ilaçların, antiserumların, ölümden sonra salgılanan kimi maddelerinin, ekim amacıyla alınan doku ve eksudatın miktarının, seçiminin, alınıp şeklinin (sıvı, inokulum, homojenat, kazıma ve yıkama gibi) ve transferinin, kullanılan vasatın şeklinin (katı, yarı katı, sıvı), içeriğinin MG izolasyonunu etkileyen faktörler olduğu bildirilmiştir (Kleven 1998, Kleven 2003).

İzolasyon için; organ veya dokulardan alınan sıvılar, eksudatlar veya seyreltilmiş organ homejanatları kullanılabilir. Kültürler aynı zamanda infraorbital sinuslardan eklem boşluklarından, yumurta veya embriyolardan da yapılabilmektedir. Klinik bulguların ve lezyonların varlığı örnek seçimini etkilemektedir. İzolasyon için broth ve agar kullanılabilen fakat identifikasyondan önce agar üzerinde mikoplazma kolonilerini elde etmek gerektiği bildirilmiştir (OIE Manuals 2006). Besi yerinde üreme yönünden mikoplazma türlerini diğer bakteri türlerinden ayırt eden en önemli unsur üreme için kolesterole ihtiyaç duymalarıdır. Tüm vasatlar temel olarak %10-15 at serumu veya serum fraksiyonları ile zenginleştirilmiş bir protein infüzyon vasatına maya faktörleri, glikoz, arginin, ve bakteriyel inhibitörlerin katılmasıyla hazırlanır (Güler 1992, Tully 1983).

Hazırlanan sıvı besi yerine konan örnekler 37°C de %10 CO<sup>2</sup>'li ortamda inkübasyona bırakılır ve üreme indikatörü olarak vasata ilave edilen fenol red ile renk değişimi yönünden izlenir. Glikozu kullanan mikoplazmalar için sarı ya da portakal sarısı, arjinini kullananlar için ise pembe renk oluşur. *M. gallisepticum* glikozu asit oluşturarak ferment eder ve sarı veya portakal sarısı renk oluşturur. Üreme tespit edilen tüplerden alınan bir damla sıvı, katı besi yerine damlatılarak bir cam baget ile besi yerinin yüzeyine yayılır. Koloni gelişimi günlük olarak izlenir ve genelde 3 gün içinde üreme gözlenir. Yetmiş iki saat sonra üreme görülmeyen sıvı ve katı besi yerlerinden üreme olana kadar 3 kez kör pasajlar yapılır, 3. pasajda da üreme görülmeyen örnekler negatif olarak değerlendirilir. Üreme olan katı besi yerlerindeki kolonilerin mikoplazma kolonisi olduğunu tespit etmek için dinens boyası ile boyama yapılır ve mikoplazma kolonisi

olduğu tespit edilen kolonilere digitonin duyarlılık testi yapılarak *Acholeplasma*’ lardan ayırımı yapılır (Jordan 1983, Tully 1983, Güler 1992, Kleven 1998).

Mikoplazma olduğu kesinleşen kolonilerin identifikasyonu için ilk olarak sıvı besi yerinde gösterdikleri renk değişimine göre glikozu fermente edenler veya arjinini hidrolize edenler olarak ayrılırlar. Glikozu asit oluşturarak fermente eden MG bu özelliği ile bazı mikoplazmalardan (*M. gallinarum*, *M. meleagridis v.b.*) ayrılırken MS ile aynı özelliği gösterir. *M. gallisepticum* olduğu düşünülen kolonilerin tetrazolium reduksiyon testi pozitif, film ve spot oluşturma testi negatif olarak tespit edildikten sonra etkenin kesin identifikasyonu için floresan antikor tekniği (FAT), immunperoksidaz veya üreme inhibisyon testi kullanılarak diğer mikoplazmalardan monospesifik antikor bazında, PZR ile genetik düzeyde ayırımı yapılır (Güler 1992, Kleven 1996, Kleven 1998, Kleven 2003).

Mikoplazma enfeksiyonlarında kültürün çok işçilik gerektirmesi, kültür sırasında kontaminasyon olma ve alınan örneklerde yeteri kadar canlı mikroorganizma olmama ihtimali, kesin negatif sonuçlar için 30 günlük bir sürenin gerekliliğine rağmen, kesin teşhis için altın standart olarak belirtilmiştir (Salisch ve ark 1998)

### **2.3.3.2. Etkenin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile teşhisi**

Tavuklarda *M. gallisepticum* enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan serolojik testler ve /veya etkenin izolasyonu ve identifikasyonun yanı sıra yüksek hassasiyette ve özgünlüğe sahip PZR testlerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir (Nascimento 1991, Silveria 1996, Wang 1997).

Kempf ve ark (1993), SPF tavukların *M. gallisepticum* ile enfeksiyonu sonrasında; kültür ile 73 sıvı numunesinden 49 pozitif, PZR ile 72 numunenin 70 inde pozitif sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bağcıgil (2002), CRD tanısında izolasyon çalışmalarının uzun sürdüğünü ve çok işçilik gerektirdiğini, yalnızca serolojik testin yetersiz olduğunu ve enfeksiyonun saptanmasında PZR tekniğinin günümüzde çabuk ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmiştir.

Marois ve ark (2002); deneysel yolla enfekte edilen kanatlı kümeslerinin ekipman, duvar, tavan ve çevrelerinden alınan örneklerinde kültür ve PZR ile mikoplazma varlığını tespit etmişler ve PZR’nın kültüre göre daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

### 2.3.3.3. Seroloji

Hemaglutinasyon (HA) mikroorganizma hücre süspansiyonunun veya mikroorganizma proteinlerinin eritrositleri çöktürmesi olarak tanımlanırken, hemadsorbsiyon (HAD) ise mikroorganizma kolonilerinin eritrositlere bağlanmasını ifade etmektedir. Kanatlılar için patojen olan mikoplazma etkenlerinin serolojik testlerin temelini oluşturan hemaglutinasyon (HA) ve/veya heamadsorbsiyon (HAD) özelliklerine sahip olduğu bildirilmiştir (Bencina 2002).

Deneysel enfeksiyon sonucunda yapılan lam aglutinasyon testlerinde; inokulasyonu takip eden 1. haftada pozitif seruma rastlanmazken, 2. ve 3. haftalarda enfekte edilen tüm tavuklarda pozitif reaksiyonlar görülmüştür (Gaunson 2000).

Avakian ve ark (1988) MG negatif olduğu bilinen tavukları; MG bakterin, MS bakterin, koriza bakterin, kolera bakterin, inaktif gumboro aşısı, yağ adjuvantlı KEF (*kanatlı embriyo fibroblast*), yağ adjuvantlı FMS (%12 domuz serumu içeren Frey's medyum), yağ adjuvantlı *S. aureus*, ve yağ adjuvantlı tuzlu su ile aşıladıktan sonra ELISA, LAT ve HI testleri ile MG yönünden incelediklerini ve sonuçta kontrol edilen toplam 90 serumdan LAT testinde 12 (%13.3)'sinin, 2 farklı ELISA test kitinde sırasıyla 26 (%28.9) ve 49 (%54.4)'unun ve HI testinde de 9 (%10)'unun pozitif sonuç verdiğini ve LAT testinin spesifite ve sensitivitesinin ELISA tesinden daha iyi çıktığını bildirmiştir.

Kemp ve ark (1998) damızlık tavuklarda yapılan deneysel enfeksiyonlardan 10 gün sonra LAT ve ELISA testi ile pozitif sonuçlar alınabildiğini, kan alma işleminin zor olduğu damızlık hayvanların MG kontrollerinde yumurta sarısından antikor tespitinin alternatif olarak kullanılabileceğini fakat testin enfeksiyondan sonra en erken 15-16 gün sonra pozitif sonuçları tespit edebileceğini bildirmişlerdir.

*M. gallisepticum* ile doğal enfekte bir sürüde 5 gün süre ile 10 mg / kg canlı ağırlık dozunda enrofloksasin tedavisinden 4 hafta sonra LAT pozitif sonuç alınırken HI titrelerinde % 40 düşüş görülmüştür (Stanley 2001).

*M. gallisepticum* enfeksiyonlarının teşhisinde antikorların kullanıldığı diğer bir test; solunum sistemi yıkantısında MG spesifik antikorların immunblot yöntemi ile tespitidir. Deneysel yolla enfekte edilen tavuklarda yapılan çalışmalarda; inokulasyonu takip eden ilk haftalarda IgA'lar ve düşük miktarlarda IgM'ler tespit edilirken, IgG'ler 3 haftadan sonra tespit edilmiştir (Ellakany ve ark 1998).

Ellakany ve ark (1997) MG hastalığının, mikoplazmaların yüzey antijenlerine ve lipoproteinlerine karşı gelişen antilipoprotein özelliğindeki monoklonal antikörlerin kullanıldığı immunblot testi ile enfeksiyon sonrası birinci haftada tespi edilebildiğini bildirmiştir.

Morsy ve ark (1991) *Mycoplasma gallisepticum* PG31 için monoklonal antikörler geliştirmişler ve bunların enfeksiyonun teşhisinde antijen ELISA testi ile kullanılabileceğini bildirmişler, May ve ark (1997) ise antijen ELISA testinde identifikasyon için alınan örneklerin ilk önce zenginleştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

#### **2.3.4. *M. gallisepticum*'dan korunma**

Mikoplazma enfeksiyonlarından korunmada ilk adım olarak karantina sistemi oluşturulması, çiftlik giriş çıkışları ve iş akışı yeniden düzenlenmesi, genç hayvanların yaşlı hayvanlardan ayrı tutulması ve yaş farkı bulunan sürüler arasında kontaminasyona sebep olacak hareketlerin engellenmesi gerektiği bildirilmiştir (Bokhari 2007).

##### **2.3.4.1. Kümes dezenfeksiyonu ve biyogüvenlik**

MG den arî bir sürü elde etmek amacıyla civciv alımlarında MG den arî sürü ve kuluçkahanelerden civciv alınması ve civcivleri MG bulaşması olmayan insanlar ve civciv araçları ile teslim edilmesinin sağlanması, eğer bir önceki sürüde MG varsa tüm ekipman, yem ve hayvanlar kümeslerden çıkarılması, gübre ve altlığın kümeden uzaklaştırılması, tüm iç mekan ve duvarların fenolik veya kresilik asit dezenfektanları ile dezenfekte edilmesi, %0.1'lik glutraldehid solüsyonları ile 10 m<sup>2</sup> alana 40 litre olmak üzere sprey yapılması, hepsi içeri - hepsi dışarı kuralına uyulması ve kümeslerin birbirinden mümkün olduğu kadar uzak yapılması gerektiği bildirilmiştir (Bokhari 2007).

##### **2.3.4.2. Aşılama**

Tavukçulukta mikoplazma mücadelesinde kullanılan önemli stratejilerden biri olan aşılama genellikle yumurta veriminin düşüşünü engellemek için yumurtacı sürülerde uygulanmaktadır (Nascimento ve ark 1993, Branton ve ark 1999).

*M. gallisepticum*'un F suşundan hazırlanmış aşının 1988 de Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı'nın izni ile değişik yaş gruplarını içeren yumurtacı sürülerde yoğun bir şekilde kullanımı sonucunda aşılı sürülerde, her tavuk için 7 adet daha fazla yumurta üretimi sağlanmasına rağmen broylerlerin ve broyler damızlıklarının kontrolsüz bir şekilde enfekte olma riskinin arttırdığı, F suşunun tamamen apatojenik olmadığı ve MG

den arı hindi ve tavuk çiftliklerine bulaşabildiği ve bulaşma sonucunda hastalığın aşı suşu mu yoksa diğer patojen suşlar mı olup olmadığının serolojik ve izolasyon identifikasyon testleri ile anlaşamadığı bildirilmiştir (Nascimento ve ark 1993, Branton ve ark 1997b, Branton ve ark 1997c)

Noormohammadi ve ark (2002) aşılama da kullanılan canlı atenüe ts-11 suşundan elde edilen aşının birçok ülkede MG kontrolünde kullanıldığını bildirmişlerdir. Biro ve ark (2005) ts-11 aşısı ile aşılanan sürülerde aşı reaksiyonu oluşmadığını ve aşı grubun MG ile çelinç edilmesi sonucunda MG enfeksiyonunun klinik bulgularını göstermediğini ve ELISA testi ile az oranda LAT testi ile zayıf ve/veya hiç pozitif sonuç alamadıklarını gözlemlemişler ve ts-11 ile aşıları sürülerin ts-11 pMGA ve S6 pMGA antijenleri ile kaplı ELISA test ve LAT karşılaştırmalarında, ts-11 pMGA ELISA testinin S6 pMGA ELISA'dan ve LAT testinden daha hassas olduğunu da tespit etmişlerdir.

Yukarıda bildirilen aşılar dışında kullanılan diğer bir aşı da MG 6/85 aşısıdır. Branton ve ark (2002), MG R suşu ile çelinç yapılan MG 6/85 aşıları sürülerde çelinç yapılan etkenin yumurta büyüklüğü, yumurta verimi ve yumurta kanalı fonksiyonlarını etkilemediğini bildirmişlerdir.

### **2.3.5. Tedavi**

Mikoplazmozis tedavisinde 14 gün süreyle 10 mg/ kg canlı ağırlık dozunda kullanılan enrofloksasinin MG'ü tedavi etmede etkili bulunduğu, tedaviye başlandığı günden 7 gün sonra MG için türe özgü DNA tespit edilemediği, MG izolasyonu yapılamadığı ve HI antikor seviyelerinin tedavi öncesi değerlerden daha düşük olduğu saptanmıştır (Ortiz ve ark 1995, Stanley 2001).

Tüm mikoplazma türlerinde olduğu gibi aşılanmanın yetersiz kaldığı MG enfeksiyonlarının ekonomik kayıplarını en aza indirmek amacıyla biyogüvenlik uygulamaları ile beraber kemoterapi de kullanıldığı, makrolidler, tetrasiklinler ve florokinolonlar gibi birçok antimikrobiyel ajanın kanatlı mikoplazmaları üzerine *in vitro* etkinliğe sahip olmasına rağmen bu antibiyotiklere karşı direnç geliştiği bildirilmiştir (Gautier-Bouchardon ve ark 2002).

Özellikle etlik piliç sürülerinde antibiyotiklerin mikoplazma etkenleri üzerinde azalan etkisinin antibiyotiklere karşı gelişen dirence bağlı olduğu ve direncin gelişiminde de etkisiz dozda ve sürede etkinlik az olan antibiyotiklerin kullanımının etkili olduğu bildirilmektedir (Zanella ve ark 1998).

Barbour ve ark (1998) ve Zanella ve ark (1998), *In vivo* şartlarda birçok antibiyotiğin mikoplazma etkinliği aynı olmasına rağmen, enrofloksasinin *E.coli* ile kompleks mikoplazma enfeksiyonlarında *E.coli* üzerinde de gösterdiği gram negatif etkisi ile başarı sağlayan en avantajlı antibiyotik olduğunu ve birinci gün MG yönünden seropozitif sonuç alınan iki grup civcivden bir gruba 7 gün süreyle 10 mg / kg canlı ağırlık dozunda enrofloksasin uygulaması sonucunda grubun 45 gün sonunda MG yönünden seronegatif hale geldiğini ve maternal antikörlerin negatif hale gelmesinin sebebinin enrofloksasinin solunum yolunda MG'nun kolonizasyonunu azaltarak daha az immün reaksiyona sebep olması sonucunda olduğunu bildirmişlerdir.

Charleston ve ark (1998) , tilmikosinin 3 gün süre ile 50 mg/ lt içme suyu oranında kullanımının IB gibi mikoplazma enfeksiyonlarını daha şiddetli hale getiren virüsler ile enfeksiyonda dahi broylerlerde hava kesesi reaksiyonlarının şiddetini azaltıcı etki gösterdiği ve günlük canlı ağırlık artışını koruduğunu bildirmişlerdir

#### **2.4. *M. synoviae*'nin Özellikleri**

Hem tavuklar hem de hindiler için patojen bir mikroorganizma olan *M. synoviae*, genelde üst solunum yolu hastalığı olarak ortaya çıkarken, infeksiyöz synovitis'ten sorumlu olabildiği gibi hava keselerinde ve eklemlerde oluşturduğu yangı sonucu karkas kalitesinde bozukluklar, büyüme, çıkım randımanı, yumurta randımanında görülen düşüşler yönünden ekonomik zararlara sebep olabilmektedir (Marois ve ark 2000). *M.synoviae*'nin IB ve ND ile beraber seyrettiği zamanlarda veya MS enfeksiyonu bulunan bir sürüye sprey ND ve IB aşılarının uygulanması ile hava keselerinde yangıya sebep olabildiği bildirilmiştir (Kleven 2003).

##### **2.4.1. *M. synoviae*'nin etiyolojisi**

Daha önceleri S suşu olarak adlandırılan *M. synoviae* mikoplazma etkenleri arasında nikotinamid adenin dinükleotid'e ihtiyaç duyması ile diğer mikoplazmalardan ayrılır (Kleven 2003). Çok nazlı üreyen MS'nin üreyebilmesi için besi yerinde seruma ihtiyaç vardır ve tercihen domuz serumunun kullanılması daha iy sonuç verir. Üremesini 3-5 gün içinde tamamlayan MS'nin 1-3 mm çapından daha küçük kolonileri katı besi yerinde yükselmiş yuvarlak ve ızgara görünümüne benzeyen bir görüntü oluşturur, giemsa boyamada ise 0.2 mikron büyüklüğünde kokoidler şeklinde görülür (Arda 1982, Lauermann ve ark 1993, Lockaby ve ark 1999). Oda sıcaklığında tüylerde 3 gün, burun boşluğunda ise 12

saat canlılığını koruyabilen *M. synoviae* 6,8 ve altındaki pH'lara ve 39°C ve üzerindeki ısılarına ise duyarlıdır (Kleven 2003).

#### **2.4.2. *M. synoviae*'nin patobiyolojisi ve epizootiyolojisi**

##### **2.4.2.1. Bulaşma**

Hem vertikal hem de horizontal bulaşmanın olduğu MS enfeksiyonlarında hava, toz, sinekler, kamyonlar, çiftçiler, ziyaretçiler, gübre, su ve yem olarak sıralanabilen canlı ve cansız vektörlerin bulaşmada etkili olduğu, MS'nın pamuk bir materyal üzerinde 8 saat ila 2 gün arasında, lastik üzerinde 8 saatten az, talaşta 4 saat, ağaç malzemedede 8- 12 saat, tüylerde ise 2-3 gün canlı kalabildiği tespit edilmiş, tavuklar kümese alınmadan önce çevreden alınan numunelerden MS analizinin yapılmasının iyi bir uygulama olduğu bildirilmiştir (Marois ve ark 2000, Stanley ve ark 2001).

##### **2.4.2.2. İnkübasyon periyodu**

Temas yolu ile MS etkenin alınması sonucunda inkubasyon periyodunun genelde 11-21 gün olmasına rağmen hastalığın 6 günlük yaştaki civcivlerde bile görülmesi yumurta ile hastalık etkenini alan sürülerde hastalığın inkubasyon periyodunun ne kadar kısa olduğunu göstermektedir. Antikorlar henüz klinik tablo belirgin olmadan tespit edilebilirken hastalık etkenin intratrakeal yolla verilmesinden 4 gün sonra trakea ve sinusların etkeni saçmaya başladıkları, aerosol bulaştırmadan 17- 21 gün sonra ise hava keseleri lezyonlarının tespit edilebildiği gözlemlenmiştir (Kleven 1972).

##### **2.4.2.3. Klinik bulgular**

Tavuk ve hindilerde solgun bir ibik, laminitis ve büyümede gerileme ile başlayan MS enfeksiyonunda hastalık ilerledikçe tüylerin karıştığı, eklemlerde ve tabanlarda şişkinliklerin oluştuğu ve hafif yeşil bir dışkının görüldüğü tavuklarda 4-6 gün içinde hırıltılar başlarken, kış aylarında hava keselerinde yangı görülür. MS ile deneysel yolla enfekte edilen bir yumurtacı sürüde yumurta veriminin enfeksiyonu takip eden ilk haftada düştüğü, ikinci haftada düşüşün %18'i bulduğu ve 4 hafta içinde ise yumurta veriminin hastalıktan önceki seviyesine geldiği, doğal enfekte tavuklarda ise yumurta verim ve kalitesinde bir değişiklik görülmediği saptanmıştır (Branton ve ark 1999). Hussni ve ark (1987) yetiştirme döneminde MS'ya bağlı bir kaybın olmadığını bildirmekte iken Mallinson (1985) MS'ya bağlı yumurta üretim kaybının %3.3 olduğunu bildirmiştir.

#### **2.4.2.4. Morbidite ve mortalite**

Enfekte sürülerde ortalama morbidite oranı %5-15 olmasında rağmen %75'e kadar çıkabilmekte, solunum sistemi ile ilgili olaylarda ise asemptomatik olmasına karşın oran %90-100'ü bulabilmektedir. Mortalite genelde %1 den daha azken miks enfeksiyonlarda %10'a kadar çıkabildiği bildirilmiştir (Mohammed 1987) .

#### **2.4.2.5. Patoloji**

*M. synoviae*'nın bazı izolatları ile enfekte olmuş ve sonrasında ND ve IB ile aşılansmış sürülerde ve MS-IB miks enfeksiyonlarında özellikle hava keseleri yangısıyla seyreden şiddetli solunum sistemi problemlerinin görüldüğü tespit edilmiştir (Khehra ve ark 1998).

Hastalığın erken dönemlerinde tüm synovial membranlarda rengi krem renginden griye kadar değişebilen visköz bir eksudatın bulunduğu ve hastalık ilerledikçe bu eksudatın kazeöz bir hal aldığı bildirilmiştir (Kleven 2003).

#### **2.4.2.6. Enfeksiyonun patogenezi**

*M. synoviae*'nın birçok virulent izolatının patogenizinin üst solunum yolunda kolonizasyon ve solunum yolu epitellerine yapışma ile başlayarak sistemik invazyonlarda lezyon oluşturma olarak belirlenmiştir. *M. synoviae*'ya ait 6 izolat incelendiğinde en virulent suş olarak tespit edilen K1968 suşunun göze damlatma inokulasyonundan sonra sistematik olarak yayıldığı ve lezyon oluşturduğu tespit edilmiştir (Lockaby ve ark 1999).

#### **2.4.2.7. Bağışıklık**

*M. synoviae* enfeksiyonlarında da hem hücresel hem de humoral bağışıklık rol oynarken, MS'ya solunum yolu ile maruz kalan tavukların ayak tabanı lezyonlarına dirençli hale geldikleri, intranasal yolla ısıya duyarlı MSts-44 suşu ile immunize edilen tavukların ise hava kesesi yangılarından 21 hafta süre ile korunduğu gözlenmiştir (Scott ve ark 1994).

### **2.4.3 *M. synoviae*'nın teşhisi**

#### **2.4.3.1. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu**

*M. synoviae* izolasyonu için organ veya dokulardan alınan sıvaplar, eksudatlar veya seyreltilmiş organ homejanatları, nikotinamid adenin dinukleotide (NAD) içeren PPLO sıvı besi yerlerinde 37-38°C, %10 CO<sub>2</sub>'li ortamlarda inkubasyona bırakılır. *M. gallisepticum*

izolasyonun da olduğu gibi ilk önce sıvı daha sonra katı besi yerinde günlük gözlemler ve 3 kör pasajdan sonra üreme tespit edilen koloniler, glikoz ve maltozu gaz oluşturmada fermente ederken, fozfataz testi negatif, tetrazolyum'u indirgeme özellikleri çok sınırlıdır. İzolasyonu ve biyokimyasal testleri tamamlanan izolatlar, FAT, immunperoksidaz ve üreme inhibisyon testleri ile identifiye edilirler (Lauermann ve ark 1993, Kleven 2003).

#### **2.4.3.2. Seroloji**

Hastalığın hızlı teşhisinde MG enfeksiyonlarında olduğu gibi LAT ve ELISA testleri kullanılmakta, MS ile enfekte sürülerden alınan serumların bazen *M. gallisepticum* pleyt antijenlerini aglutine ederek sonuçların yanlış yorumlanmasına sebep olmaktadır. *M. synoviae* antikollarının tespiti amacıyla birçok ELISA testi geliştirilmiş, bunlardan biri olan ve tüm mikoplazma hücrelerinin sonikasyonu sonucunda oluşan osmotik lizis ürünü veya Triton X- 100 de çözünen membran proteinlerinden oluşan ham membran proteinlerinin antijen olarak kullanıldığı ELISA testi MS teşhisinde hassas bir test olarak kullanılabileceği saptanmıştır. SDS-PAGE kullanarak *M. synoviae* F10-2AS'dan iç membran antijeni (p53, p41 ve p22) saflaştırması yapılarak hazırlanan dot-ELISA testinde p41 ile yapılan testler *M. synoviae* antikollarını tespitinde hemagglütinasyon testinden daha hassas olmasına karşın p53 ve p22 ile yapılan testlerin hassas olmadığı bildirilmiştir (Noormohammadi ve ark 1999).

#### **2.4.3.3. *M. synoviae*'nın moleküler metotlar ile teşhisi**

Lauermann ve ark (1993) MS'ya özgü primerler ile yaptıkları PZR testinde, kültür ve serolojik testlere göre PZR testinin sensitivitesini %82, spesifitesini ise %100 bulmuşlardır.

Salisch ve ark (1998) kültür ve PZR karşılaştırmalarında MS teşhisinde PZR testinin de kültür kadar spesifik ve sensitive bir test olduğunu ve MG-MS enfeksiyonlarının aynı anda bulunduğu sürülerde başarı ile kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Marois ve ark (2002) MS ile denysel yolla enfekte edilen sürülerin yem, su, altlık, kümes ekipmanlarından aldıkları örnekleri kültür metodu ile karşılaştırdıklarında kültür ile tespit edilen MS pozitif sonuçlardan daha fazla MS'ya özgü DNA tespit etmişlerdir.

#### **2.4.3.4. Ayırt edici teşhis**

Klinik bulguların önemli olduğu ayırt edici teşhiste sinovitis ve arthritis'e neden olan bakteriler elimine edilmeli, serolojik testlerle viral tenosinovitisten ayrımı yapılmalı ve solunum sistemi bulguları varlığında MG ve diğer solunum sistemi hastalıkları (ND, IB, APV) elimine edilmelidir. Buna rağmen MS antikorlarına herhangi bir klinik belirti olmadan da rastlanmaktadır (Khehra ve ark 1998).

#### **2.4.4. *M. synoviae*'dan korunma tedbirleri**

##### **2.4.4.1. Aşılama**

Nonomura ve ark (1982) MS'nin 1-3SN suşunu *N-nitro-N-methyl-N-nitrosoguanidine* ile muamele ederek 12 ısıya duyarlı (ts) suş arasından MSts-44 suşunun immunojenik ve apatojenik olduğunu tespit etmişlerdir. Morrow ve ark (1998) ise Avusturya saha izolatlarından seçilen 89079/7NS suşunun *N-nitro-N-methyl-N-nitrosoguanidine* ile kimyasal mutasyona uğratılması sonucu 4 klon elde edildiğini, klonlar ile yapılan çalışmalarda klon D ve klon H ileride yapılacak aşı çalışmaları için aday olarak seçildiğini, Noormohammadi ve ark (2007) ise elde edilen H klonlarından üretilen canlı, atenue ve ısıya duyarlı MS-H aşısının hindilerde güvenle kullanılabileceğini ve MS'nin saha suşunun sebep olduğu lezyonlardan koruyabileceğini bildirmişlerdir.

#### **2.4.5. Tedavi**

*M. synoviae* ve MG ile doğal enfekte damızlık bir sürüde 10 mg/kg dozunda 14 gün süre ile yapılan enrofloksasin tedavisinin bitiminden 1, 3, 10, 14 ve 20 hafta sonra PZR ile MG yönünden negatif sonuçlar alınırken MS yönünden pozitif sonuçlar tespit edilmiş, enrofloksasin tedavisinin MG enfeksiyonunda olduğu gibi başarılı olmadığı fikrine varılmıştır (Stanley 2001).

Fiorentin ve ark (2003) PZR ile MS pozitif olduğu tespit edilen bir broyler damızlık sürüyü MS yönünden kontamine olmamış bir kümese yerleştirdiklerini ve *E.coli*'ye bağlı peritonitis tedavisi için 3 kere florokinolon kullandıktan sonra 2 hafta süre ile yemden 600 ppm oksitetrasiklin hidroklorid kullanarak bu süre zarfında PZR ile MS'i tespit edemeyecek düzeye düşürdüklerini bildirmişlerdir.

#### **2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

İlk olarak 1983 yılında DNA'nın çoğaltılması amacıyla kullanılan PZR, spesifik oligonükleotid primerleri, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, deoksinükleotid

trifosfatları kullanarak mekanik bir ısı yardımı ile küçük miktarlardaki nükleik asitleri tespit edilebilir miktarlara çoğaltan bir moleküler testtir (Lauer mann ve ark 1993) ve PZR da tıpkı moleküler kopyalanma gibi daha önceleri imkânsız olan birçok deneme ile geliştirilmiştir (Donald 2007).

### **2.5.1. PZR'nin mikoplazmoziste kullanımı**

Slavik ve ark (1993) intranasal yolla MG ve MS ile enfekte edilen SPF tavuklarda yapılan PZR testlerinin kültür ile paralellik gösterdiğini ve MG için kullanılan PZR testinin MS ile enfekte sürülerde negatif sonuç verdiğini bildirmiştir.

Salisch ve ark (1998) PZR tekniğinin kültür kadar hassas ve duyarlı olduğunu doğrulamışlar MG ve MS için hazırlanmış polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı DNA probe test kitlerinin MG ve MS teşhisinde hali hazırda kullanılan metotlara ve özellikle eş zamanlı enfeksiyonlarda değerli katkılarının olduğunu bildirilmişlerdir.

Wang ve ark (1997) dört patojen mikoplazma suşunu (MM, MG, MI, MS) 35 siklutan oluşan tek bir PZR reaksiyonu ile jel elektroforezis de MM için 850 bp, MG için 732 bp, MI için 299 bp ve MS için de 207 bp de oluşan bantları görüntülemiş ve kullandıkları metodun MG için 1 pg, MS için 1 pg, MM için 100 pg ve MI için de 100 pg hassasiyette türe özgü DNA tespit edebildiğini ve 1 pg türe özgü DNA'nın 1.000-10.000 KOB/ ml mikroorganizmayı ifade etmekte olduğunu bildirmişlerdir. .

Pang ve ark (2002) tarafından geliştirilen ve optimize edilen multipleks PZR testinde aynı anda altı setten oluşan ve IB, AI, ILT, ND, MG, MS için spesifik oligonükleotid primerler kullanılmış, 35 siklutan sonra testin IB, AI, MG ve IL için 10 pg, ND ve MS için 100 pg hassasiyette türe özgü DNA tespit edebildiklerini tespit etmişlerdir.

Marois ve ark (2002) biyogüvenlik prosedürlerinin yeterince uygulanıp uygulanmadığının tespiti veya kümese yeni bir sürü alınmadan önce mikoplazma açısından gerekli kontrollerin yapılabilmesi için PZR ile MG ve genel mikoplazma taramalarının olumlu sonuçlar sağladığını bildirmişlerdir.

Kempf ve ark (1994) deneysel yolla MG ile enfekte edilen ve daha sonra enrofloksasin tedavisi uygulanmış tavuklardan 8 farklı tarihte alınan trakeal sıvıları kültür ve PZR ile incelediklerini ve ilk örneklemelerde PZR testinin kültüre göre daha fazla pozitif verdiğini, kültür yönünden son pozitif sonuçların enfeksiyondan 26 gün sonra alınabildiğini fakat PZR testinin canlı mikroorganizmaya ihtiyaç duymamasından ve daha hassas olmasından dolayı 54. güne kadar PZR ile pozitif sonuç alındığını bildirmişlerdir.

Çarlı ve Eyigör (2003), *light cyclor* sistemi kullandıkları real-time PZR testi ile *M. gallisepticum* ile enfekte sürülerin hızlı teşhisinde veya izlenmesinde hassas ve duyarlı bir test olduğunu bildirmişler, Mekkes ve ark (2005) ise real-time PZR testini standart PZR testine ve kültür'e göre 10- 1000 kat daha fazla hassas bulduklarını ve MG klinik örneklerde hem kalitatif hem de kantitatif teşhiste başarı ile kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Raviv ve ark (2007) real-time PZR ile MG F, ts-11, 6/85, K5831, K5054 ve R suşlarının birbirlerinden ayırımını kantitatif olarak yapabildiklerini ve bu sonuçların hem aşılardan koruma düzeylerinin belirlenmesinde hem de saha da aşı ve saha suşunun ayırımında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kojima ve ark (1997) canlı kanatlı aşılardan mikoplazma kontaminasyonlarından arî olduğunu tespit etmek amacıyla PZR testi kullandıklarını, test sonucunda mikoplazma'ya ait 9 türün 34 izolatını kullanılan primerler ile tespit edebildiklerini ve PZR testinin aşılardan kontrollerinde kullanılabilecek etkili bir test olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan araştırmalar sonucunda PZR testinin MG ve MS ile enfekte sürülerin laboratuvar teşhisinde yüksek spesifite ve sensitivite ile kullanılabileceği bildirilmiştir (Nascimento 1991, Silveria 1996, Wang ve ark 1997). Ayrıca Bağcıgil (2002) izolasyon çalışmalarının uzun sürdüğünü ve birçok nedene bağlı olarak yetersiz kaldığını, tek bir serolojik testin yetersiz olduğunu ve enfeksiyonun saptanmasında PZR'ın günümüzde çabuk ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmiştir.

Kempf (1998) ise bir günlük civcivlerde, civcivlerin hepsinin tam anlamıyla hastalıkla enfekte olamayacağı ve transovaryan bulaşmadan dolayı anaçları MG ve MS yönünden pozitif olan sürülerin civcivlerinin teşhisi için serolojik testlerin kullanılması gerektiğini, PZR'ın klinik enfeksiyonların hızlı teşhisinde anamnez, klinik bulgular, serolojik sonuçlar ve en son olarak ta kültür ile desteklenerek kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Feberwee ve ark (2005)'da deneysel enfeksiyon oluşturularak kültür, iki farklı PZR kiti, LAT testi, HI testi ve sekiz farklı ELISA test kitinin performanslarını değerlendirmişler ve yaptıkları sensitivite ve spesifite testleri sonucunda teşhiste sadece tek bir test metodu üzerinde durulmamasını önermişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 MATERYAL

##### 3.1.1. Organ ve sıvap örnekleri

Serolojik olarak daha önce pozitif bulunmuş 15 sürüden rastgele örnekleme yöntemiyle seçilen 73 adet tavuğun trakea, akciğer, hava keselerinden ve eklem sıvılarından toplam 365 sıvap alınmış ve örnek alınan tavukların yaşları, kümelere göre dağılımı ve klinik bulguları Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

##### 3.1.2. *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* suşları

Pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nden (İstanbul) *M. gallisepticum* S6 ve *M. synoviae* WVU 1853 suşları temin edildi.

**Tablo 3.1. Örnek alınan tavukların yaşları, kümelere göre dağılımı ve klinik bulguları**

Kümes No	Yaş (Hafta)	Klinik Bulguları	Canlı		Ölü			
			Serum	Trakea	Trakea	Akciğer	Hava Kesesi	Eklem Sıvısı
1	75	Var	20	5	5	5	5	5
2	37	Yok	20	5	5	5	5	5
3	55	Yok	20	3	3	3	3	3
4	24	Var	20	5	5	5	5	5
5	25	Yok	20	5	5	5	5	5
6	34	Yok	20	5	5	5	5	5
7	29	Yok	20	5	5	5	5	5
8	44	Yok	20	5	5	5	5	5
9	44	Yok	20	5	5	5	5	5
10	44	Yok	20	5	5	5	5	5
11	52	Yok	20	5	5	5	5	5
12	48	Var	20	5	5	5	5	5
13	33	Yok	20	5	5	5	5	5
14	33	Yok	20	5	5	5	5	5
15	29	Yok	20	5	5	5	5	5
Toplam			300	73	73	73	73	73

### 3.1.3. Besiyerleri

Çalışmada sıvı ve katı PPLO besi yerleri kullanıldı (Güler 1992).

#### Sıvı PPLO Besi Yeri;

PPLO Broth Base (kristal viyolesiz) (Difco)	:	14,7 g
Glucose (%10)	:	10 ml
Arginin (%10)	:	10 ml
Taze Yeast extract (25)	:	100 ml
Thallus acetat (%5)	:	10 ml
Penicilin G (200.000 IU / ml)	:	5 ml
Phenol Red (%0.1)	:	20 ml
At Serumu	:	150 ml
Distile Su	:	650 ml
pH: 7,6 – 7,8		

#### Katı PPLO Besi Yeri;

PPLO Broth Base (kristal viyolesiz) (Difco)	:	14,7 g
Purifiye Agar	:	10 g
Glucose (%10)	:	10 ml
Arginin (%10)	:	100 ml
Taze Yeast extract (25)	:	100 ml
Thallus acetat (%5)	:	10 ml
Penicilin G (200.000 IU / ml)	:	5 ml
At Serumu	:	150 ml
Distile Su	:	650 ml

### 3.1.4. Seroloji

#### 3.1.4.1. Kan serum örnekleri

Kan örnekleri tavukların *vena ulnaris*'lerinden eppendorf tüplerine alındı ve kazanılan serumlar tekrar eppendorf tüplerine alınarak kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı. Toplam 300 serum örneği içinden sıvıların alındığı tavuklara ait 73 serum bireysel serolojik testlerinin yapılması için ayrı bir eppendorf tüpüne bölündü.

### **3.1.4.2. Lam aglütinasyon test (LAT) antijeni**

LAT testinde MG ve MS boyalı mikoplazma test antijenleri kullanıldı. (Intervet Boxmeer Hollanda)

### **3.1.4.3. Enzim linked immunosorbent assay (ELISA) testi**

#### **3.1.4.3.A. ELISA test kiti**

ELISA testlerinde MG ve MS ELISA test kitleri kullanıldı (Biocheck, Hollanda) .

#### **3.1.4.3.B. ELISA okuyucusu**

ELISA pleytlerinin optik dansitesinin belirlenmesi için Anthos II Labtec Instruments A 5022, Salzburg ve MWGt Lambda Scan 200 Bio-Tek Inst. Inc USA kullanıldı.

### **3.1.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)**

#### **3.1.5.1. DNA amplifikasyonunda kullanılan malzemeler**

##### **3.1.5.1.A. Thermal cycler**

Eppendorf Master Cycler Gradient, Eppendorf AG Hamburg(Germany) kullanıldı.

##### **3.1.5.1.B. Primerler**

Çalışmada kullanılan primerler Integrated DNA Technologies'de (USA) sentezlettirildi.

##### **3.1.5.1.B.1. *M. gallisepticum* spesifik primerleri**

MG 1 5` - GGATCCCATCTCGACCAGGAGAAAA – 3` (forward)

MG 2 5` - CTTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA – 3` (reverse) (Wang ve ark 1997).

##### **3.1.5.1.B.2. *M. synoviae* spesifik primerleri**

MS 1 5` - GAAGCAAATAGTGATATCA – 3`(forward)

MS 2 5` - GTCGTCTCGAAGTTAACAA – 3` (reverse) (Wang ve ark 1997)

##### **3.1.5.1.C. Taq polimeraz**

Taq DNA polimeraz (Promega) kullanıldı.

### 3.1.5.1.D. Deoxynucleotid set

dNTP'ler (Promega) 25 µl oranında saf su ile sulandırılarak kullanıldı.

### 3.1.5.2. Oluşan DNA'ların görüntülenmesi

#### 3.1.5.2.A. Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler

##### 1) Tris asetat (TBE) tamponu (10x)

Tris base 60,50 g

Borik asit 30,85 g

Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 3,72 g

H<sub>2</sub>O(Distile Su) 1 L'ye ilave edildi, eritildi, çözüldü ve kullanıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı.

##### 2) Agaroz Gel (%1.5) (w/v)

Agaroz 3 g (w/v)

TBE 200 ml

##### 3) Etidyum bromür stok solüsyonu (10 mg/ml)

Etidyum bromür 20 mg

Distile su 1,98 ml

Karanlıkta muhafaza edildi ve stok solüsyonu agaroz jele 0,5 µg/ml oranında katıldı.

##### 4) Yükleme tamponu

6X Loading Dye solution (MBI Fermentas, R0411)

### 3.1.5.2.B. Film

Bantların görüntülenebilmesi için Sony F 717 Cybershot dijital fotoğraf makinesi ve Professional Coaterless B&W Instant Pack Film Filter (sarı renkli, USA) ile kombine edilerek kullanıldı.

### 3.1.5.1.C. Marker

100 bp-1 kbp DNA Ladder (Promega) kullanıldı.

## **3.2. METOT**

### **3.2.1. Organ ve sıvap örneklerinin toplanması**

Şüpheli sürülerden rastgele örnekleme yöntemiyle seçilen tavuklar S.Ü Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Hastalıkları nekropsi salonuna getirildi. Canlı hayvanların larinks kısmına alttan hafifçe bastırarak ağız içinin daha görünür bir şekil alması sağlanıp steril bir sıvap ile larinkse girilerek ve trakeaya bastırarak trakeal sıvap alındıktan sonra tavuklara trakeanın olabildiğince alt kısmından kesilerek ötanazi uygulandı. Trakea süratle tamamen açılarak yine steril bir sıvap yardımı ile burun boşluğundan başlayarak trakeanın daha derin kısımlarından sıvap ile kazınarak trakea ve burun boşluğu epitellerinin ve mukozal sıvının sıvaplara yapışması sağlanarak ölü hayvanlara ait trakeal sıvap numuneleri alındı. Göğüs kafesi açıldıktan sonra ilk olarak hava keselerinden daha sonra ise akciğerlerden sıvap örnekleri ve son olarak bacak eklemi açılarak eklem sıvısından sıvap örnekleri alındı.

### **3.2.2. İzolasyon çalışmaları**

#### **3.2.2.1. Örneklerin besiyerlerine ekimi**

Örnekler bir bek alevi yakınında bir tüp içerisindeki 5 ml sıvı PPLO besi yerine kondu Sıvı besi yerleri 37°C de %5-10 CO<sup>2</sup>'li ortamda inkübasyona bırakıldı ve hergün renk değişimi bakımından kontrol edildi (Güler 1992).

#### **3.2.2.2. Üreme takibi ve değerlendirilmesi**

Renk değişimi (glikozu kullananlar için sarı ya da portakal sarısı, arjinini kullananlar için pembe) görülen tüplerden bir damla katı besi yerine damlatılarak bir cam baget ile besi yerinin yüzeyine yayıldı. Koloni gelişimi günlük izlendi ve 72 saat sonra üreme görülmeyen sıvı ve katı besi yerlerinden kör pasajlar yapıldı. Bu şekilde 3 kez pasaj yapıldıktan sonra üreme görülmeyen materyaller negatif olarak değerlendirildi (Jordan 1983).

### **3.2.3. İdentifikasyon çalışmaları**

#### **3.2.3.1. Üreyen kolonilerin dinens boyası ile boyanarak incelenmesi**

Küçük bir kare parçası şeklinde kesilerek koloniler üste gelecek şekilde lam üzerine yerleştirilen kolonileri içeren agar parçasının etrafı parafin ile kaplanarak yüzeyi 1- 4 damla Dinens kullanma solusyonu ile kaplandı. Boyanmış agar bloğunun üzerine bir lamel yerleştirildi ve parafin ile lamelin teması sağlandı. Mikoplazma kolonileri maviye

boyanırken çoğu bakteriyel ve fungal koloniler ve mikoplazma kolonilerine benzeyen hava kabarcıkları renksiz olarak görüldü (Kleven 1998).

### **3.2.3.2. Digitonin duyarlılık testlerinin hazırlanması ve yapılması**

*Digitonin duyarlılık test besiyeri:* %1.5'lik digitonin stok solusyonu hazırlamak için 75 mg digitonin ve 5 ml %95 etanol kapaklı bir şişeye konup kaynayan suda hafifçe sallanarak digitoninin erimesi sağlandı. Yaklaşık 6 mm çapında hazırlanan filtre kâğıdından hazırlanan disklere emdirilen digitonin katı besi yerine yerleştirildi. 48 saatlik test kültürünün 1/100 dilüsyonundan (yaklaşık  $10^5$  KOB / ml) 0,2 ml katı besi yerinin yüzeyine yayıldı ve yüzey kuruyuncaya kadar bekletildi. Steril pens ile digitonin emdirilmiş disk pleytin ortasına yerleştirilerek hafifçe bastırıldı. 37°C de nemli %5- 10 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilerek 24 saatten sonra kontrol edilen disklerin etrafında oluşan halkanın genişliği ölçüldü. 5 mm ve daha geniş halkalar pozitif olarak değerlendirildi (Tully 1983).

### **3.2.3.3. Biyokimyasal testlerin hazırlanması ve uygulanması**

#### **3.2.3.3.A. Glikoz fermentasyon testi**

*Glikoz fermentasyon test besiyeri:* Glikoz fermentasyonunu saptamak için izolasyon amacıyla hazırlanan sıvı besi yeri kullanıldı. Besi yeri renginin sarı veya portakal sarısı rengine dönüşmesi glikozu fermente edebildiğini gösterdi (Kleven 1998).

#### **3.2.3.3.B. Arjinin hidroliz testi**

*Arjinin hidroliz test besiyeri:* Glikoz ilave edilmemiş sıvı besi yerine %1 oranında Arjinin ilave edilerek besiyerinin pH'sı 7,3'e ayarlandıktan sonra 5'er ml ağzı kapaklı tüplere dağıtıldı. Sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra +4 °C de saklandı. Besi yeri renginin pembe renge dönüşmesi arjinini fermente edebildiğini gösterdi (Kleven 1998).

#### **3.2.3.3.C. Tetrazolyum redüksiyon testi**

*Tetrazolyum redüksiyon test besiyeri:* Steril disitile su içerisinde %1 lik 2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorid solusyonu hazırlanarak 0,45 µm membran filitre ile sterilize edildikten sonra glikoz ilave edilmemiş katı besi yerine son konsantrasyonu % 2 olacak şekilde ilave edildi. Tamamen karıştırıldıktan sonra petri kutularına dağıtıldı. Besi yeri renginin kırmızıya dönüşmesi o testin pozitif olduğunu gösterdi (Kleven 1998).

### **3.2.3.3.D. Film ve spot oluşumunun değerlendirilmesi**

*Film ve Spot oluşumu test besiyeri:* Mikoplazmaların lipolitik aktivitelerini gösteren bu test için %20 oranında serum katılmış katı besi yeri kullanıldı. Besi yerinin yüzeyinde görülen film kolesterol ve fosfolipidlerden oluşur. Katı besi yeri içinde ve koloniler etrafında küçük siyah benekler halinde görülen spot mikroorganizmanın lipolitik aktivitesi sonucu oluşan yağ asitlerinin kalsiyum ve magnezyum tuzlarıdır (Kleven 1998).

### **3.2.3.4. Üreme inhibisyon testlerinin uygulanması**

*Üreme inhibisyon test besiyeri:* 0,025 ml miktarında ticari bir firmadan (LATFAS Charles River MG Hiperimmun Serum, Charles River MS hiperimmun serum) satın alınan hiperimmun serumlar kâğıt disklerle emdirilerek katı besi yerine yerleştirildi. İzolatların 1/10<sup>2</sup> lik dilüsyonları hazırlandı. Bu dilüsyonlardan alınan 0,2 ml lik örnekler agar yüzeyine yayıldıktan sonra hiperimmun serum emdirilmiş diskler yerleştirildi. İnkubasyona bırakılan petripler hergün disk etrafında oluşacak halka çapı yönünden kontrol edildi. 2 mm ve daha geniş çapta halka oluşturan numuneler pozitif olarak değerlendirildi (Kleven 2003).

### **3.2.4. Serolojik testlerin uygulanması**

#### **3.2.4.1. Serolojik testlerde kullanılacak serumların hazırlanması**

Serum örnekleri inaktivasyon için Erdağ ve ark (1988) önerdiği şekilde 56 ° C de 30 dk tutuldu.

#### **3.2.4.2. Çabuk lam aglütinasyon testinin yapılışı**

İnaktive edilen serum örneğinden ve test antijeninden birer damla temiz beyaz bir fayans üzerinde karıştırıldı. Dairesel hareketler yaptırılarak 2 dk içerisinde oluşan reaksiyonlar izlendi. Pozitif örneklerde 30 sn içinde aglütinasyon görülmeye başlandı (Erdağ ve ark 1988).

#### **3.2.4.3. Serum titrelerinin ELISA ile belirlenmesi**

ELISA testi inaktive edilen serum örnekleri ile üretici firmanın belirttiği prosedüre göre yapıldı Kullanılan test kitinde;

Titre Aralığı Referans Kontrolleri : R6 (1000- 2500)

Mean Titre Referans Kontrolleri : R6=837

Pozitif Cutoff S/P > = 0,50

Değerleri kabul edildi.

### **3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)**

#### **3.2.5.1. DNA ekstraksiyonu**

Örneklerin laboratuvara naklinde PBS kullanıldı (Silveria ve ark 1996). DNA ekstraksiyonu için sıvı besi yerinden veya sıvaplardan alınan 1 ml numune 14,000 x g de 5-10 dk santifuj edildikten sonra PBS ile yıkanarak tekrar 25-50 µl PBS ile sulandırıldı. 120 ° C de 10 dk kaynatılan numuneler +4 ° C de de 10 dk tutuldu (Moscoso ve ark 2002).

#### **3.2.5.2. Tekli ve multipleks PZR ile DNA amplifikasyonu**

Toplam 100 µl PZR karışımı; 500 mM KCL, 100 mM Tris – HCL (ph 8.3), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, her biri 200 µM olan dNTP (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) her biri 1 µl olacak şekilde primerler (334 ng/µl), 2,5 U Taq DNA polimeraz ve 10 µl template DNA içermektedir.

Hem tekli hem de multipleks PZR’da amplifikasyon için Thermal Cycler belirtilen şekilde programlandı: 94°C de 5 dk ön denatürasyon basmağı başlatıldı. Daha sonra 35 kez 94°C 1 dk denatürasyon, 50°C 1 dk soğutma ve 72°C 2 dk polimerizasyon aşaması yapıldı. Son olarak 1 kez 72 ° C de 10 dk son ektensiyon aşaması ile amplifikasyon tamamlandı (Wang ve ark 1997, Moscoso ve ark 2002)

#### **3.2.5.3. Amplifiye edilen örneklerin agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi**

Amplifiye edilen DNA’ların spesifik bantlarının tespiti için jel elektroforezis kullanıldı. Boyalı yükleme solusyonu (6X Loading Dye Solution MBI Fermentas, R0411) ile karıştırılan 12 µl PZR ürünü daha önceden ethidium bromide ile boyanan %1.5 agaroz jel üzerinde açılan çukurlara mikropipetler yardımıyla yerleştirildi. Pozitif, negatif kontroller ve Promega Ladder da ilgili çukurlara eklendikten sonra yatay elektroforezde Tris Asetat ile 80V 230 mA de iki buçuk saat süre ile yürütüldü. Süre sonunda karanlık odada UV ışığı altında (illuminatör) görüntülenerek Professional Coaterless B&W Instant Pack Film Filtre (sarı renkli USA) yardımı ile Sony F 717 Cybershot dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanarak görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı.

### **3.2.6. Testlerin sensitivite ve spesifitesinin hesaplanması**

Tablo 3.2’de gösterilen formülde a harfi yerine hem gerçek hastalığın var olduğu hem de analizi yapılan testin pozitif olduğu durumdaki örneklerin sayısı, b harfi yerine gerçek hastalığın olmadığı fakat testin pozitif olduğu örnek sayısı, c harfi yerine gerçek

hastalığın olduğu fakat testin negatif olduğu örnek sayısı ve son olarak d harfi yerine hem gerçek hastalığın olmadığı hem de analizi yapılan testin negatif olduğu durumdaki örneklerin sayısı yazılarak belirtilen formüller doğrultusunda spesifite ve sensitivite hesaplamaları yapıldı.

### 3.2.7. İstatistik analizler

Araştırmada elde edilen veriler McNemar (ilişkili 2 örnekte ki kare testi) testi kullanılarak değerlendirildi (SPSS 1998).

**Tablo 3.2 Testlerin sensitivite ve spesifitesinin hesaplanması (Erganiş 1993)**

Test Sonuçları	Gerçek Durum Hastalık Pozitif	Gerçek Durum Hastalık Negatif	Toplam
Pozitif	a Doğru pozitif	b Yanlış pozitif	a + b
Negatif	c Yanlış negatif	d Doğru negatif	c + d
Toplam	a + c	b + d	a + b + c + d

$$Test\ sensitivitesi = a / (a+c)$$

$$Test\ spesifitesi = d / (b+d)$$

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kültür Bulguları

İncelen 15 kümese ait örneklerin kültür sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Her tavuktan alınan 5 sıvaptan sadece trakeaya ait örneklerin 3’ünde üreme tespit edildi. Üremeler ikinci pasajlarda besi yerlerinde düğme tarzında koloniler ile tespit edildi (Resim 4). Üreme tespit edilen izolatlardan biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testleri yapıldı. Tablo 4.2’de gösterilen kümes bazında yapılan incelemelerde; incelenen 15 kümeisten 3 tanesi MG yönünden kültür ile pozitif bulundu. *M. synoviae* yönünden yapılan incelemelerde üreme tespit edilmedi. Üreme tespit edilen kümeslerin CRD yönünden klinik bulguları olan kümesler olduğu tespit edildi.

**Tablo 4.1 Örneklerin kültür sonuçları**

Kümes No	Canlı Trakea		Ölü Trakea		Akciğer		Hava Kesesi		Eklem Sıvısı		Toplam	
	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif
	n	n / %	n	n / %	n	n / %	n	n / %	n	n / %	n	n / %
1	5	1/20	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	1/4
2	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
3	3	0 / 0	3	0 / 0	3	0 / 0	3	0 / 0	3	0 / 0	15	0 / 0
4	5	0 / 0	5	1 / 20	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	1/4
5	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
6	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
7	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
8	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
9	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
10	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
11	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
12	5	0 / 0	5	1 / 20	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	1/4
13	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
14	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
15	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	5	0 / 0	25	0 / 0
Toplam	73	1/1,36	73	2/2,73	73	0 / 0	73	0 / 0	73	0 / 0	365	3/0,82

**Tablo 4.2. Kümes bazında kültür ve PZR sonuçları**

	Kümes No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Toplam
Kültür	MG	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PZR	MG	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	7
	MS	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	3

#### 4.2. Biyokimyasal Bulgular

Üreme tespit edilen 3 izolata yapılan digitonin testi ile kolonilerin *Acholeplasma*’lardan ayırımı yapıldı. Mikoplazma olduğu kesinleşen örnekler Tablo 4. 3’te gösterilen biyokimyasal testler sonucunda glikoz fermentasyon pozitif, arjinin hidrolizi negatif, tetrazolium reduksiyon testi ise pozitif bulundu. İzolatların MG–MS ayırımında yapılan üreme inhibisyon testinde izole edilen her üç suş da üredikleri besi yerlerinde MG hiperimmün serum’a karşı 4-6 mm önleme halkası oluşturduğu tespit edildi. İncelenen toplam 73 hayvan ve 365 sıvap numunesinde hayvan bazında (3/73) % 4.11, sıvap örnekleri bazında ise (3/365) % 0.82 oranında üreme tespit edildi. Üreyen izolatların MG olduğu biyokimyasal testlerle doğrulandı.

#### 4.3. Serolojik Bulgular

Toplam 300 serum örneğinden 127 (%42) tanesi LAT ile MG yönünden pozitif bulunurken (Resim 5, 6) ELISA testinde pozitif oran 243 (%80) e yükseldi (Resim 7, 8, 9). *M. synoviae* yönünden LAT ile incelendiğinde 165 (%55)’i pozitif olan serumların, ELISA testi ile 265 (%88)’i pozitif bulundu.

*M. gallisepticum* ve MS yönünden klinik bulguları bulunan 1, 4 ve 12 nolu kümeslerden alınan örneklerde yapılan LAT testlerinde sadece 12 nolu kümeşte %50’yi aşan pozitif sonuç belirlenirken, ELISA testlerinde her üç kümeşte de %50’den fazla sonucun varlığı tespit edildi. Klinik bulgu göstermeyen sürülerde MG yönünden LAT ile yapılan incelemelerde ise 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 14 nolu kümeslerde %50 den az, 7, 11, 15 nolu kümeslerde %50’yi aşan pozitif sonuç belirlenirken, ELISA testlerinde tüm kümeslerde %50’den fazla pozitif sonuç elde edildi. *M. synoviae* yönünden klinik bulgu göstermeyen kümeslerde LAT ile yapılan incelemelerde 6, 9, 11, 13, 14,15 nolu

kümeslerde %50'den az, 1, 3, 5, 7, 8, 10 nolu kümeslerde %50'yi aşan pozitif sonuç elde edildi.

**Tablo 4.3. Kültür pozitif örneklerin biyokimyasal bulguları.**

Biyokimyasal Testler	Örnekler		
	2 Nolu Numune	15 Nolu Numune	56 Nolu Numune
<b>Digitonin</b>	Pozitif	Pozitif	Pozitif
<b>Glikoz Fermentasyonu</b>	Pozitif	Pozitif	Pozitif
<b>Arjinin Hidrolizi</b>	Negatif	Negatif	Negatif
<b>Tetrazolium Redüksiyon</b>	Pozitif	Pozitif	Pozitif
<b>Spot Oluşumu</b>	Negatif	Negatif	Negatif
<b>Film Oluşumu</b>	Negatif	Negatif	Negatif
<b>Üreme İnhibisyon Testi</b>	<b>MG yönünden</b>	Pozitif	Pozitif
	<b>MS yönünden</b>	Negatif	Negatif

Örnek alınan 300 serum örneği içinden ayrılan ve sıvap örneklerinin alındığı tavuklara ait olan toplam 73 serumun MG ve MS yönünden LAT ve ELISA test sonuçları Tablo 4. 4 ve 4. 5'te gösterilmektedir.

Sıvap örneklerinin alındığı 73 tavuğa ait serumlarda LAT ile MG yönünden %29 oranında, ELISA testi ile %84 oranında pozitif sonuç tespit edilirken, LAT ile MS yönünden %38 oranında, ELISA testi ile %95 oranında pozitif bulundu.

Serolojik testlere ait spesifite ve sensitivite testlerinin hesaplanmasında sıvap örneklerinin alındığı 73 tavuğa ait kültür ve serolojik test sonuçları (Tablo 4.6) kullanılarak, LAT testinin MG teşhisindeki sensitivitesi %100, spesifitesi %72.7, MS teşhisinde sensitivitesi %100, spesifitesi %51.7 (Tablo 4.7, 4.8), ELISA testinin MG teşhisindeki sensitivitesi %66.6, spesifitesi %11.9, MS teşhisinde sensitivitesi %0, spesifitesi %5.5 olarak bulundu (Tablo 4.9, 4.10). Lam aglütinasyon testi ve ELISA testi MG ve MS teşhisi yönünden istatistik olarak McNemar testi ile karşılaştırıldığında iki test arasında önemli düzeyde farklılık bulundu ( $P < 0.001$ ).

**Tablo 4.4. Serolojik test (LAT ve ELISA) sonuçları**

Kümes No	Serum Sayısı	MG				MS			
		LAT		ELISA		LAT		ELISA	
		Pozitif n	Pozitif %	Pozitif n	Pozitif %	Pozitif n	Pozitif %	Pozitif n	Pozitif %
1	20	7	35	19	95	10	50	19	95
2	20	18	90	19	95	14	70	19	95
3	20	2	10	13	65	15	75	7	35
4	20	15	75	16	80	18	90	16	80
5	20	7	35	19	95	11	55	16	80
6	20	4	20	15	75	5	25	18	90
7	20	16	80	18	90	18	90	18	90
8	20	5	25	16	80	14	70	19	95
9	20	3	15	16	80	6	30	19	95
10	20	9	45	16	80	19	95	19	95
11	20	10	50	16	80	9	45	19	95
12	20	6	30	12	60	8	40	19	95
13	20	2	10	12	62	6	30	19	95
14	20	4	20	16	80	5	25	19	95
15	20	18	90	19	96	5	25	19	95
<b>Toplam</b>	300	127	42	243	80	165	55	265	88

**Tablo 4.5 Sıvap örnekleri alınan tavukların LAT ve ELISA bulguları**

Testte kullanılan Antijen	Serum Sayısı	LAT						ELISA					
		Pozitif		Şüpheli		Negatif		Pozitif		Şüpheli		Negatif	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
MG	73	21	29	3	4	49	67	61	84	3	4	9	12
MS	73	28	38	15	21	30	41	69	95	0	0	4	5

Tablo 4.6 Sıvap örnekleri alınan tavuklara ait kültür, LAT ve ELISA testi bulguları

Örnek NO	Kültür Sonuçları										Serolojik Test Sonuçları				
	Canlı Trakea		Ölü Trakea		Akciğer		Hava Kesesi		Eklem Sıvısı		LAT		ELISA		
	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-/+	+	+
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+	+
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
56	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	-	+
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-/+	+	+
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

**Tablo 4.7. MG LAT testinin sensitivite ve spesifitesi**

Test Sonuçları	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
<b>MG LAT Pozitif</b>	3	18	21
<b>MG LAT Negatif</b>	0	48	48
<b>Toplam</b>	3	66	69

$$Test\ sensitivitesi = 3/3+0*100= 100$$

$$Test\ spesifitesi = 48 / 66*100= 72.7$$

**Tablo 4.8. MS LAT testinin sensitivite ve spesifitesi**

Test Sonuçları	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
MS LAT Pozitif	0	28	28
MS LAT Negatif	0	30	30
Toplam	0	58	58

$$\text{Test sensitivitesi} = 0 / 0+0*100 = 0$$

$$\text{Test spesifitesi} = 30 / 28+30*100 = 51.7$$

**Tablo 4.9. MG ELISA testinin sensitivite ve spesifitesi**

Test Sonuçları	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
MG ELISA Pozitif	2	59	61
MG ELISA Negatif	1	8	9
Toplam	3	67	70

$$\text{Test sensitivitesi} = 2 / 2+1*100 = 66,6$$

$$\text{Test spesifitesi} = 8 / 59+8*100 = 11.9$$

**Tablo 4.10. MS ELISA testinin sensitivite ve spesifitesi**

Test Sonuçları	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
MS ELISA Pozitif	0	69	69
MS ELISA Negatif	0	4	4
Toplam	0	73	73

$$\text{Test sensitivitesi} = 0 / 0+0*100 = 0$$

$$\text{Test spesifitesi} = 4 / 4+69*100 = 5.5$$

#### 4.4. PZR Bulguları

Çalışmada 73 tavuğa ait toplam 365 sıvap numunesinde bireysel olarak hem MG hem MS yönünden elde edilen bulgular Tablo 4.11.'da verilmektedir. MG1, MG2 ve MS1 ve MS2 primerleri ile yapılan tekli ve multipleks PZR sonucunda toplam 11 adet tavukta (11/73) %15.06 oranında türe özgü DNA tespit edilirken sıvap bazında bu oranın (12/365) %3.29'a gerilediği görüldü.

Multipleks ve tekli PZR ile MG için 365 sıvap numunesinin 9'unda (%2.46) 732 bp'de türe özgü DNA'lar görüntülendi. (Resim 1, Resim 3). *M. synoviae* için örneklerin 3'ünde (%0.82) 207 bp'de türe özgü DNA'lar görüntülendi (Resim 2, Resim 3).

İzolasyon yapılan ve identifikasyon sonucu MG olduğu tespit edilen 2, 15 ve 56 nolu örneklerin PZR testi ile de MG yönünden pozitif sonuç verdiği, sonuçları Tablo 4.2'de gösterilen kümes bazında yapılan incelemelerde ise incelenen 15 kümeden 7'si MG 3'ü ise MS yönünden pozitif bulundu. PZR testinin MG yönünden sensitivitesi %100, spesifitesi %92.8, MS yönünden ise sensitivitesi %0, spesifitesi ise %95.9 olarak saptanmıştır (Tablo 4.12., 4.13.)

Kültür ve PZR testi; MG teşhisi yönünden istatistik olarak McNemar testi ile karşılaştırıldığında iki test arasında önemli düzeyde farklılık bulunurken ( $P < 0.05$ ), MS teşhisi yönünden istatistik olarak fark bulunmamıştır ( $P < 0.05$ ).

**Tablo 4.11. Örneklere ait kültür ve PZR sonuçları.**

Örnek NO	Kültür Sonuçları										PZR Sonuçları									
	Canlı Trakea		Ölü Trakea		Akciğer		Hava Kesesi		Eklem Sıvısı		Canlı Trakea		Ölü Trakea		Akciğer		Hava Kesesi		Eklem Sıvısı	
	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

**Tablo 4.12. MG PZR testinin sensitivite ve spesifitesi**

Test Sonuçları	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
MG PZR Pozitif	3	5	8
MG PZR Negatif	0	65	65
Toplam	3	70	73

$$\text{Test sensitivitesi} = 3 / 3 + 0 * 100 = 100$$

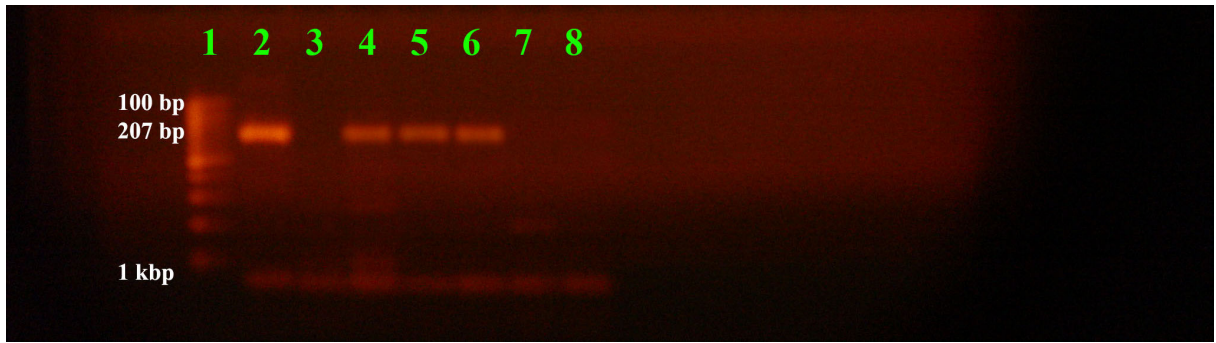
$$\text{Test spesifitesi} = 65 / 65 + 5 * 100 = 92.8$$

**Tablo 4.13. MS PZR testinin sensitivite ve spesifitesi**

Test Sonuçları	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
MS PZR Pozitif	0	3	3
MS PZR Negatif	0	70	70
Toplam	0	73	73

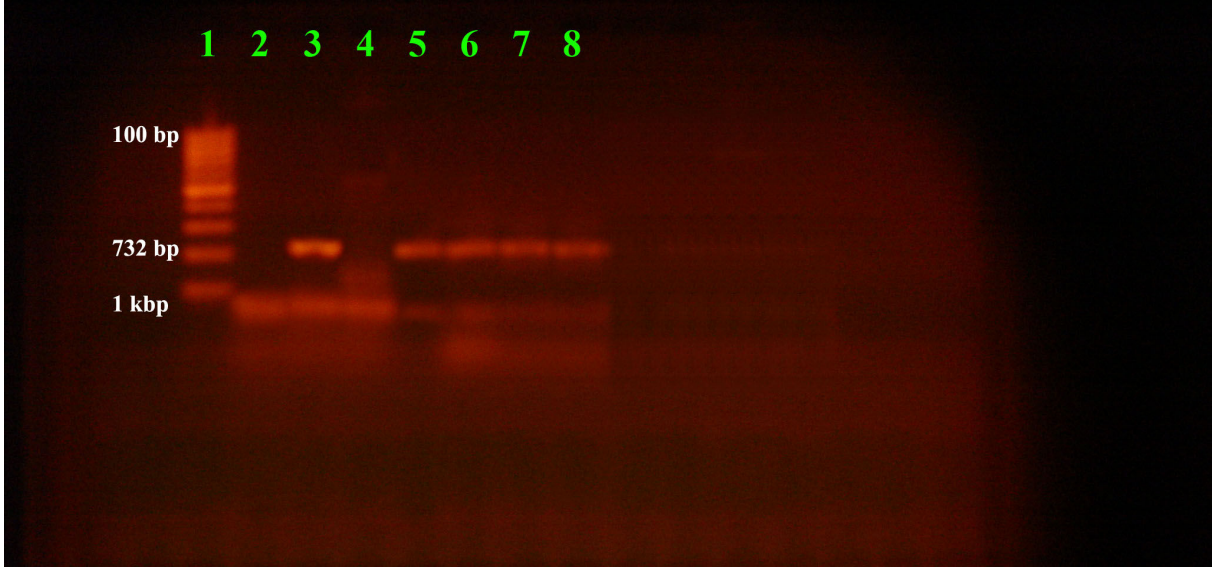
$$\text{Test sensitivitesi} = 0 / 0 + 0 * 100 = 0$$

$$\text{Test spesifitesi} = 70 / 70 + 3 * 100 = 95.9$$



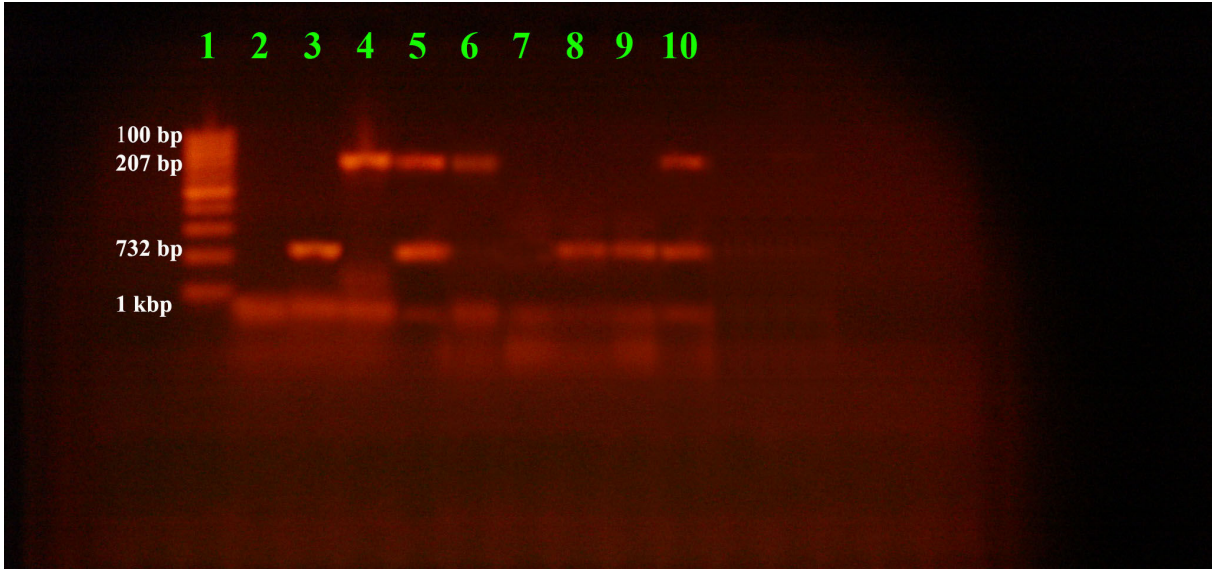
**Resim 1. *M. synoviae* yönünden incelenen numunelerin agoroz jel elektroforezde oluşturduğu bantların görüntüsü.**

1: Marker (100 bp 1kbp), 2: MS WVU 1853 (Pendik Vet. Kont. Araş. Enst İstanbul), 3: Negatif kontrol (Ultra saf su), 4: 6 nolu kümeden alınan 29 numaralı numune, 5: 13 nolu kümeden alınan 63 numaralı numune, 6: 15 nolu kümeden alınan 73 numaralı numune, 7: 1 nolu kümeden alınan 2 numaralı numune, 8: 1 nolu kümeden alınan 4 numaralı numune.



**Resim 2. *M. gallisepticum* yönünden incelenen numunelerin agoroz jel elektroforezde oluşturduğu bantların görüntüsü.**

1: Marker (100 bp 1kbp), 2: Negatif kontrol (Ultra saf su3: ), MG S6 (Pendik Vet. Kont. Araş. Enst İstanbul), 4: 1 nolu kümeden alınan 1 numaralı numune, 5: 1 nolu kümeden alınan 2 numaralı numune, 6: 6 nolu kümeden alınan 25 numaralı numune, 7: 12 nolu kümeden alınan 56 numaralı numune, 8: 2 nolu kümeden alınan 7 numaralı numune.



**Resim 3. *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* yönünden multiplex PZR ile incelenen numunelerin agoroz jel elektroforezde oluşturduğu bantların görüntüsü.**

1: Marker (100 bp 1kbp), 2: Negatif kontrol (Ultra saf su3: ), MG S6 (Pendik Vet. Kont. Araş. Enst İstanbul), 4: MS WVU 1853 (Pendik Vet. Kont. Araş. Enst İstanbul), 5: MG ve MS standart suşlar, 6: 6 nolu kümeden alınan 29 numaralı numune, 7: 14 nolu kümeden alınan 66 numaralı numune, 8: 2 nolu kümeden alınan 7 numaralı numune, 9: 1 nolu kümeden alınan 2 numaralı numune, 10: 1 nolu kümeden alınan 2 numaralı numune ve 6 nolu kümeden alınan 29 numaralı numune.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde ticari yumurtacı tavukçuluk ve broyler üretiminde MG ve MS enfeksiyonları ve bunların kontrolü ekonomik etkileri bakımından önemli olup enfeksiyonların varlığı serolojik olarak tespit edilmekte fakat geliştirilecek veya geliştirilmiş yeni testlerin pratikte kullanılmasının endüstriye büyük yararı olacağı muhakkaktır. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu ile hastalık kesin olarak teşhis edilmekte, ancak izolasyonun zor ve her vakada mümkün olmamasından dolayı pratikte tercih edilmemektedir.

Ülkemizde de birçok gelişmiş ülkede olduğu gibi kanatlı sürülerinin MG ve MS'dan arı olmasına yönelik çalışmalar yapılmakta ve arı olan sürülere Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından 1991 yılında çıkarılan “kuluçkahane ve damızlık işletmelerinin sağlık kontrol” yönetmeliği kapsamında arılık sertifikası verilmekte arı olmayan işletmelerin çalışmalarına izin verilmemektedir. Bu yönetmelik kapsamından sürüler ilk önce LAT ve ELISA testleri ile tarama testleri yapılmakta, eğer pozitif çıkan sürü olursa kültür ve PZR ile kesin teşhise gidilmektedir. (Yönetmelik 1991).

Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nün yıllık hastalık teşhis rakamları incelendiğinde Konya bölgesinde LAT ve ELISA testi ile yapılan ve klinik gözlemlerle de desteklenen teşhisler sonucu hastalığın bölgede endemik olarak seyrettiği gözlenmiştir (Orhan 2006).

Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde bildirilen metotların bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Kültür; çok işçilik gerektirmesi, kültür sırasında kontaminasyon olma ihtimali ve örnekteki etkenin canlılığını korumamış olması gibi sonucu etkileyecek dezavantajları olmasına rağmen teşhis için “altın standart” olarak değerlendirilmektedir. Kültürde pozitif sonuçlar genelde 4–7 gün arasında alınmasına rağmen negatif sonuçlar için 30 günlük bir sürenin geçmesi gerekmektedir (Salisch ve ark 1998).

Güler (1992) Konya Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Tavuk Hastalıkları Teşhis Laboratuvarına CRD şüphesi ile gelen toplam 40 sürüde 126 kanatlının 19 (%15.07)'unda MG izole ettiğini bildirmiştir. Kempf ve ark (1993), SPF tavukların *M. gallisepticum* ile enfeksiyonu sonrasında; kültür ile 73 sıvap numunesinden 49 pozitif sonuç elde ettiklerini bildirmişler, Bağcıgil (2002) ise incelediği 96 sıvap örneğnin kültürleri ile sadece 3 (%3,1) örnekte MG izole edebildiğini ve incelediği örneklere ait tavukların LAT ile %10 oranında pozitif olduğunu belirtmiştir.

Stanley ve ark (2001) deneysel yolla enfekte ettikleri tavuklarda MG yönünden %100'lük bir pozitiflik tespit ettikten sonra uyguladıkları 14 günlük enrofloksasin tedavisinin 7. gününde hiç MG izolasyonu yapamazken tedavi bittikten 1, 3, 10, 14 ve 20 hafta sonra MG izolasyonu yapabildiklerini bildirmiştir. Salisch ve ark (1998) MG şüpheli 10 küme kültür ile sürülerin 8'inde seropozitif sonuç elde ettiklerini, yine bu sürülerden alınan toplam 294 sıvab örneğinden 41 (%13.9) tanesinin MG yönünden pozitif, MS yönünden ise toplam 236 svab örneğinden 122'sinin (%51.7) kültür için pozitif olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada toplam 15 sürüde 73 tavuktan 3 (%4.10)'ünde, Güler 1992, Kempf ve ark 1993 ve Salisch ve ark 1998 bildirdikleri oranlardan daha az MG izolasyonu yapılmış, MS izolasyonu yapılamamıştır. Tespit edilen seropozitif değerlere göre izolasyonun bu kadar az olması sürülerin, hastalığın kronik döneminde olmasından, antibiyotik kullanılmış olabileceğinden, yaşayan mikroorganizma sayısının tespit edilebilir düzeyden az olduğunu veya alınan örneklerde etkenin canlılığını koruyamamış olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bağcıgil (2002)'in bildirdiği düşük seropozitiflik oranları ile eş zamanlı tespit edilen düşük izolasyon oranları ise bu çalışmadaki sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Kiss ve ark (1997) identifikasyonda üreme inhibisyon testinin yüksek titreye sahip monospesifik mikoplazma antiserumuna ihtiyaç duyduğunu bildirmiş ve bu bilgi doğrultusunda bu çalışmada da monospesifik hiperimmun serumlar ticari bir firmadan temin edilmiştir.

Glisson (1983) lam aglütinasyon testinde bulunan pozitif sonuçların nonspesifik reaksiyonlardan da kaynaklanabileceğini, kültür ve HI testi ile doğrulanması gerektiğini bildirmiştir. Avakian ve ark (1988) kanatlı sürülerinde uygulanan MG dışındaki inaktif bakterin ve viral aşuların ELISA ve LAT testlerinde yanlış pozitifliklere neden olabileceğini fakat LAT'ın ELISA testinden daha sensitiv ve spesifik bir test olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da örnek alınan tüm sürülerin büyütme ve yetiştirme dönemlerinde MG ve MS dışında inaktif bakterin ve viral aşularla aşılandıkları bilinmektedir. Elde edilen LAT sonuçlarının ELISA testi ile paralellik göstermesi, LAT testinin ELISA testinden daha spesifik ve sensitiv bulunması, LAT ile pozitif sürülerin PZR ile pozitif bulunması

LAT ile pozitif bulunan sonuçların spesifik reaksiyonlar sonucunda olduğunu desteklemektedir.

Kempf ve ark (1998) anaçların deneysel enfeksiyonlarından 10 gün sonra çıkan bir günlük civcivlerde ELISA ile pozitif bulunan MG maternal antikorlarının sayısının LAT ile pozitif bulunanlardan daha fazla olduğunu ve kullanılan farklı ELISA test kitleri arasında da istatistikî yönden farklılık olmadığını bildirmiştir. Bu araştırmada da Kempf ve ark (1998)'nın bildirdiği sonuçlara paralel olarak MG ELISA testinin MG LAT testine göre daha fazla pozitiflik gösterdiği fakat bu çalışmada da Avakian ve ark (1988)'nin bildirdikleri gibi LAT testi ELISA testinden daha spesifik ve sensitiv bulunmuştur (Tablo 4.6 ve 4.8).

Serolojik testlerin farklı sonuçlar verdiği ve bu farklılıkların önemli olduğu yapılan istatistik analizler ile doğrulanmıştır. Bu farklılıklar sonucunda rutin teşhiste de LAT ve ELISA testlerinin aynı serumlara farklı sonuçlar vererebileceğinin göz ardı edilmemesi ve sürüler ile ilgili kesin kararın verilmesinden önce uygulanan teşhis metodundan farklı bir serolojik metot ile doğrulanması önerilmiştir.

İzole edilen suşların identifikasyonu sub kültür ile başlayıp; biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testi ile devam etmektedir. Tüm bu prosedürler uzun sürdüğü ve işçiliği çok olduğu için birçok araştırmacı PZR'ı kullanmıştır (Hyman 1989, Kempf ve ark 1993, Lauerman ve ark 1993, Çarlı ve Eyigör 2003). Hatta hem bakteriyel hem de viral genlerin tespit edildiği multipleks PZR amplifikasyon teknikleri kullanılmaya başlanmıştır (Pang ve ark 2002).

Nascimento ve ark (1991)'nin yaptıkları çalışmada PZR test ile MG teşhisinde testin 1 ng MG DNA'sını tespit edebildiğini bulmuşlar ve bu miktarın yaklaşık 1.000.000 – 10.000.000 KOB'e denk geldiğini bildirmişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalar da PZR testlerinin hem klinik örneklerinde hem de kültür örneklerinde hassasiyetin 1 ng olduğu ve bu miktarlarda bir mikroorganizmanın ancak hastalığın akut fazında bulunabileceğini bildirmiştir (Hyman 1989, Levison 1989).

Bu araştırmada; MG seropozitif sürülerden alınan örneklerin PZR testi ile sadece %10.95 oranında pozitif olması bu sürü veya hayvanların hastalığın akut evresinde olduğunu diğerlerinde ise kronik bir CRD durumu olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca hem kültür hem de PZR pozitif bulunan 3 örneğin ait olduğu sürülerin MG LAT testlerinin %100'den daha az pozitif olması, serolojik yanıtın tam şekillenmediğini ve örnek alınan

tavukların hastalığın akut fazında olduğunu ve MG üremesi için yeterli miktarda canlı mikroorganizma olması ile izolasyonunun sağlandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada PZR testinde kullanılan primerler; örnek alınan çalışmada (Wang ve ark 1997) bildirilen dizilimlere göre seçilmiştir. Kullanılan MG ve MS spesifik primerler aynı zamanda Nascimento ve ark (1991) ve Lauerman ve ark (1993) tarafından da kullanılmıştır. Aynı sekans dizilimine sahip primerlerin kullanıldığı ve viral solunum sistemi etkenlerinin primerlerinin de olduğu bir çalışmada (Pang ve ark 2002) da MG için 732 bp, MS için 207 bp’de spesifik bant görüntülerinin alındığı bildirilmiştir. Kiss ve ark (1997) 5’AACACCAGAGGCGAAGGCGAGG-3’ forward ve 5’ACGGATTTGCAACTGTTTGTATTGG-3’ reverse diziliminde primerler kullanılarak 530 bp’ de spesifik bant görüntüleri aldıklarını bildirmiştir.

Salisch ve ark (1998) MG şüpheli 10 küme DNA prob tabanlı PZR ile sürülerden alınan toplam 294 sıvab örneğinden 45 (%15.3)’nin MGAV8/31 prob testinde MG pozitif, MS yönünden ise toplam 236 svab örneğinden 116 (%49.1)’sının pozitif çıktığını bildirmiştir. Çarlı ve Eyigör (2003), 68’i canlı, 28’i ise nekropsi yapılan MG pozitif fakat klinik belirti göstermeyen hayvanların trakealarından alınan toplam 96 sıvab numunesini *M. gallisepticum* real-time PZR ile incelediğini bildirmiştir. Nekropsi yapılan tavuklardan alınan 28 svabın 18’i MG yönünden pozitif bulunur iken canlı hayvanlardan alınan 68 numunenin tamamının MG yönünden negatif çıktığını belirtmiştir. Bağcıgil (2002), *M. gallisepticum* DNA Test kiti (Flock Check, IDEXX) ile incelediği 96 sıvab örneğinin 47 (%49)’sinde spesifik DNA tespit ettiğini bildirmiştir.

Bu çalışmada ise gösterildiği üzere MG yönünden seropozitif toplam 15 sürüden alınan 365 sıvab numunesinin 9 (%2.46)’u MG yönünden, 3 (%0.82)’ü MS yönünden pozitif bulunmuştur (Tablo 4.10). Tespit edilen pozitif sonuçların Salisch ve ark (1998)’nin ve Bağcıgil (2002)’in bildirdikleri oranlardan daha az çıkmasının sebebinin sıvab örnekleri alınan sürülerin çoğunun hastalığı subklinik olarak geçirdiği ve alınan sıvaplarda yeterli miktarda DNA olmadığı düşünülmektedir. Hastalığı subklinik geçiren tavukların sıvab numunelerinin MG PZR yönünden negatif sonuç verebildiği rapor edilmiştir (Çarlı ve Eyigör 2003).

PZR ile MG pozitif tespit edilen sıvabların nekropsi yapılan tavukların trakeal sıvablarından olması, Çarlı ve Eyigör (2003)’ün de bildirdiği nekropsi yapılan hayvanların “trakea mukoza yüzeyi kazıntısı metodu” ile paralellik göstermektedir. Ayrıca aynı metod

ile alınan 2 örneğin de kültür yönünden pozitif çıkması örnek alınırken nekropsi yapılan hayvanların trakea ve infraorbital sinuslarından kazınarak alınan sıvapların tercih edilmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Lauerman ve ark (1993) MS PZR testinin spesifite ve sensitivite testlerini yaparken MS PZR sonuçlarının HI, ELISA, kültür sonuçlarının biri veya hepsi ile karşılaştırılarak bulunması gerektiğini bildirmişler, yeterli veri olmaması durumunda da HI, ELISA ve kültür sonuçlarından yalnız birinin de kullanılabileceğini eklemişlerdir. Bu çalışmada gerek MG gerek MS için kullanılan testlerin spesifite ve sensitivite değerlendirilmelerinde kültür sonuçlarının gerçek hastalık durumunu belirlediği kabul edilmiştir. MS için hiçbir üreme olmamasından dolayı MS PZR'in sensitivitesi %0 spesifitesi ise %95.6 olarak tespit edilmiştir. Lauerman ve ark (1993) bildirdikleri yorumu göz önünden bulundurarak MS PZR testinin sensitivite ve spesifite değerlendirilmeleri ELISA test sonuçları ele alınarak tekrar hesaplanmış ve MS PZR'in spesifitesi %100, sensitivitesi ise %95.6 olarak tespit edilmiştir.

Hartup ve ark (1999) PZR analizinin canlı veya cansız kaynakların DNA'larının türe özgü segmetlerinin çoğaltılması esasına dayandığını ve alınan bir örnek PZR pozitif sonuç verir iken kültürün pozitif olmasının; canlı organizmanın ve aktif bir enfeksiyonun olmadığını gösterdiğini bildirmiştir. Bu araştırmada tespit edilen PZR pozitif, kültür negatif olan sürülerin klinik bulguları karşılaştırdığında, kültür negatif olan hayvanların aktif bir enfeksiyonu olmadığı klinik bulgularla doğrulanmıştır (Tablo 3.1.).

*M. gallisepticum* yönünden PZR ve kültür ile yapılan testlerde bulunan sonuçlar arasında fark olduğu yapılan istatistik değerlendirmeler ile tespit edilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu aynı örnekler ile kültürden daha fazla oranda pozitif verdiği, uygulanması kültüre göre daha kolay, hızlı ve ucuz olduğu ve yüksek oranda spesifik ve sensitive olduğu için PZR testinin MG teşhisinde kullanılabilecek bir test olduğu fikrine varılmıştır

*M. synoviae* yönünden yapılan incelemelerde ise PZR ve kültür arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur. Fakat MG teşhisinde olduğu gibi PZR'in kültüre göre olan avantajlarından ve kültür ile hiç pozitif sonuç alınamaz iken PZR ile pozitif sonuç bulunmasından dolayı PZR testinin MS teşhisinde kullanılabilecek bir test olduğu fikrine varılmıştır.

Sonuç olarak;

1. Yumurtacı tavuklarda MG ve MS teŖhisinde hem multipleks hem de tekli PZR'ın izolasyondan üstün olduğu ve pratikte kullanılabilecek bir test olduğu ve PZR için alınacak numunelerin mümkün olduğu kadar erken ve nekropsi yapılan hayvanların trakelarından mukozalar kazınarak alınmasının daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiŖtir.

2. Ayrıca bu tez alıŖmasında Konya bölgesindeki yumurta tavukçuluğu yapan iŖletmelerin CRD teŖhisinde kullanılan serolojik analizlerde rutin olarak yapılmayan MS LAT ve MS ELISA testleri de yapılarak sürülerin serum rneklarının %55'nin MS yönünden pozitif olduğu bulunmuŖtur. Bu sonuçlar doğrultusunda MS'nin da serolojik testlerde kontrol edilmesi gereken bir etken olduğu fikrine varılmıŖtır.

## 6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA- 2008

“Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae*'nin tanısında PZR kullanımı”

Erkut GÜRBÜZ  
Veteriner Hekim

Danışman

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

Konya bölgesinde, yumurtacı tavuk çiftliklerinde *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* varlığı bakteriyolojik olarak izolasyon ve identifikasyon, serolojik olarak Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Lam Aglütinasyon Testi (LAT) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırıldı. Daha önce solunum sistemi problemi geçirmiş ve Konya Veteriner Kontrol Araştırma Enstitü'sünde serolojik olarak CRD enfeksiyonu teşhisi konmuş farklı yaşlarda 15 kümeden 73 tavuğa ait toplam 300 kan örneği toplandı. Ayrıca 73 tavuğun trakealarından, hava keselerinde, akciğerlerinde ve eklem sıvılarından toplam 365 sıvap alındı.

Toplam 15 kümeden alınan 300 serum örneğinin 127'si (%43) MG yönünden LAT ile pozitif, 173'ü (%57) negatif, 165'i (%55) MS yönünden LAT ile pozitif, 235'i (%45) negatif olarak değerlendirildi. Aynı 300 örneğin 243'ü (%80) MG yönünden ELISA ile pozitif, 57'si (%20) negatif olarak, 265'i (%88) MS yönünden ELISA ile pozitif, 35'i (%12) negatif olarak değerlendirildi. Toplam 365 sıvap numunesinin sadece 3'ünde etken izole edilerek yapılan identifikasyon çalışmaları ile etkenin MG olduğu tespit edilmiştir. PZR ile ticari yumurtacı kümeslere ait toplam 365 sıvap örneğinin 9'u (%2.46) MG yönünden pozitif, 3'ü (%0.82) MS yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak; yumurtacı tavuklarda MG ve MS teŖhisinde hem multipleks hem de tekli PZR'ın izolasyondan üstün olduğu ve pratikte kullanılabilir bir test olduğu ve PZR için alınacak numunelerin mümkün olduğu kadar erken ve nekropsi yapılan hayvanların trakelarından mukozalar kazınarak alınmasını daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiŖtir.

## 7. SUMMARY

“The use of PCR for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in chickens”

The occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial layer populations in Konya region was investigated by using bacteriological methods, serological methods and Polymerase Chain Reaction (PCR). A total number of 300 blood samples were collected from 15 flocks 73 hens with different ages which has a history of respiratoric problems confirmed by serological test for CRD in Konya Veterinary Control and Research Institute. 365 swap samples from trachea, air sacs, lungs and synoviae were collected from 73 hens. Out of 300 samples from a total of 15 flocks, 127 (%43) samples were found positive for MG and 173 (%57) samples observed negative by LAT, 165 (%55) samples were found positive for MS and 235 (%45) samples observed negative by LAT as well. Out of the same 300 samples, 243 (%80) samples were found positive for MG and 57 (%20) samples observed negative by ELISA, 265 (%88) samples were found positive for MS and 35 (%12) samples observed negative by ELISA. Out of 365 swap samples from 73 hens, 9 (%2.47) samples were found positive for MG and 3 (%0.82) were found positive for MS by PCR.

As a conclusion; both the single and the multiplex PCR was found superior than the isolation and identification methods and can be applied for the detection of MG and MS in laying hens and to take the swap samples by scraping the trachea mucosa after the necropsy as soon as the clinical signs appear is recommended as well.

## 8. KAYNAKLAR

- AAAP/AVMA Scientific Program (2001)** Respiratory Diseases of Poultry Symposium, July 15 Boston, MA.
- Ackermann MR and Cheville NF (1991)** *Ultrastructural studies of the lung and its air-blood barrier in turkeys (Melagris gallopava) intratracheally inoculated with Escherichia coli.* Veterinary. Pathology. 28:183-191.
- Arda M, Minbay A and Aydın N (1982)** *Kanatlılarda Solunum Yolu Hastalıkları* In “Özel Mikrobiyoloji” Arda M A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayın No:386 576-582 A.Ü Basımevi, Ankara
- Atılgan T (1964)** *Kümes hayvanlarının “PPLO” enfeksiyonları (Süregelen Solunum Sistemi Hastalığı ile Hindilerin Enfeksiyöz Sinuzitis’i,)* Bornova Vet Kont ve Araşt Enst Md Dergisi, 5(9), 51-64.
- Atılgan T, Yeşilada İ (1967)** *Ege Bölgesi İllerinde Süregelen Solunum Yolu Hastalığı Yayılış Durumu,* Bornova Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Md. Dergisi, 8(16), 1-5.
- Avakian AP, Kleven SH and Glisson JR (1988)** *Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial Enzyme-Linked Immunosorbant Assay kits, the serum plate agglutination test, and the hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to Mycoplasma gallisepticum,* Avian Diseases 32:262-272
- Bağcıgil FA (2002)** *Tavuklarda Mycoplasma gallisepticum enfeksiyonunun tanısında bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerin polymerase chain reaction (PCR) ile karşılaştırılması,* İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.
- Barbour EK, Hamadeh S, Talhouk R, Sakr W and Darwish R (1998)** *Evaluation of an enrofloxacin-treatment program against Mycoplasma gallisepticum infection in broylers,* Preventive Veterinary Medicine, 35, 91-99.
- Bencina D (2002)** *Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas,* Avian Pathology, 31, 535-547.

- Bokhari Syed A (2007)** *Mycoplasma gallisepticum*, University of California [www.ag.state.co.us](http://www.ag.state.co.us), 20.04.2007, 15:30.
- Bradbury JM (2005)** *Gordon Memorial Lecture. Poultry mycoplasmas: Sophisticated pathogens in simple guise*. *British Poultry Science*; 46(2):125-36.
- Branton SL, Bearson SM, Bearson B, Lott BD, Maslin WR, Collier SD, Pharr GT, Boykin DL (2002)** *The effects of 6/85 live Mycoplasma gallisepticum vaccine in commercial layer hens over a 43-week laying cycle on egg production, selected egg quality parameters, and egg size distribution when challenged before beginning of lay*, *Avian Diseases*, 46(2), 423-8.
- Branton SL, May JD, Lott BD and Maslin WR (1997a)** *Various blood parameters in commercial hens acutely and chronically infected with Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae*, *Avian Diseases*, 41, 540-547.
- Branton SL, Lott BD, Austin FW and Pharr GT (1997b)** *Effect of drinking water containing ammonium chloride or sodium bicarbonate on Mycoplasma gallisepticum isolation in experimentally infected broiler chickens*, *Avian Diseases*, 41, 930-934.
- Branton SL, Lott BD, May JD, Maslin WR, Boyle CR and Pharr GT (1997c)** *The effects of F strain Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, and the dual infection in commercial layer hens over a 44- week laying cycle when challenged before beginning of lay. Egg production and selected egg quality parameters*, *Avian Diseases*, 41, 832-837.
- Branton SL, Lott BD, May JD, Maslin WR, Pharr GT, Brown JE and Boykin DL (1999)** *The effects of F strain Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, and the dual infection in commercial layer hens over a 44- week laying cycle when challenged before beginning of lay. II. Egg size distribution*, *Avian Diseases*, 43, 326—330.
- Charleston B, Gate JJ, Aitken IA and Reeve-Johnson L (1998)** *Assessment of the efficacy of tilmicosin as a treatment for Mycoplasma gallisepticum infections in chickens*, *Avian Pathology*, 27, 190-195.

- Charlton BR, Bermudez AJ, Boulianne M, Eckroade RJ, Jeffrey JS, Newmann LJ, Sander JE, Wakenell PS (1996)** *Avian Disease Manual* American Association of Avian Pathologists Poultry Pathology Laboratory University of Pennsylvania, Pennsylvania
- Çarlı KT and Eyigör A (2003)** *Real – Time PCR for detection of Mycoplasma gallisepticum in chicken trachea*, Avian diseases, 47(3), 712-717.
- Davelaar FG, Noordzij A and Van der Donk JA (1982)** *A study on the synthesis and secretion of immunoglobulins by the harderian gland of the fowl after eyedrop vaccination against infectious bronchitis at 1-day old*. Avian Pathology; 11:63-79
- Donald MC (2007)** *Polymerase Chain Reaction*, Current Protocols in Molecular Biology Chapter 15, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ.
- Dufour-Gesbert F, Dheilly A, Marois C and Kempf I (2006)** *Epidemiological study on Mycoplasma synoviae infection in layers*, Veterinary Microbiology 114, 148-154
- Duncker HR, (1974)** *Structure of the avian respiratory tract*, Resp. Physiolo., 22 1-19
- Ellakany H, Fabian K and Stipkovits L (1997)** *Immunoblot examination of humoral response of chickens infected with Mycoplasma gallisepticum at various ages*, Comp Immun Microbiol Infect Dis, 20 (4), 319-333.
- Ellakany H, Fabian K, Nemeth I and Stipkovits L (1998)** *Antibody response detected by immunoblot in respiratory tract washings of chickens after infection iwth Mycoplasma gallisepticum*, Avian Pathology, 27, 547-554.
- Erdağ O, Türkaslan J (1988)** *Kanatlı Mycoplasmalarının laboratuvar teşhis yöntemleri*, Pendik Hayv. Hast. Mrk. Araşt. Enst. Der., 19, 85-97.
- Erganiş O (1993)** *Veri toplama ve serolojik testlerin seçimindeki kriterler*, Veteriner Epidemiyoloji (Temel Bilgiler), 1. baskı, Mimoza Yayınları, Konya
- Esendal ÖM (1991)** *Tavuklarda Mycoplasma gallisepticum'a karşı oluşan antikorların çeşitli serolojik yöntemlerle (lam aglutinasyon, hemaglutinasyon-inhibisyon, agar-jel presipitasyon, ELISA) saptanması ve sonuçlarının karşılaştırılması*, Ankara

Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.

**Fedde MR (1994)** *Anatomy and physiology of the avian respiratory system*. AAAP July 10 San Francisco

**Feberwee A, Mekkes DR, de Wit JJ, Hartman EG, Pijpers A (2005)** *Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae infections*, Avian Disease Jun 49(2):260-8

**Ficken MD (1994)** *Avian respiratory defense mechanisms, injury, and repair*. AAAP July 10 San Francisco

**Fiorentin L, Soncini RA, da Costa JL, Mores MA, Trevisol IM, Toda M, Vieira ND (2003)** *Apparent eradication of Mycoplasma synoviae in broiler breeders subjected to intensive antibiotic treatment directed to control Escherichia coli*, Avian Pathology 32(2), 213-6

**Gaunson JE, Philip CJ, Whithear KG and Browning GF (2000)** *Lymphocytic infiltration in the chicken trachea in response to Mycoplasma gallisepticum infection*, Microbiology, 146, 1223-1229.

**Gautier- Bouchardon AV, Reinhardt AK, Kobisch M and Kempf I (2002)** *In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma iowae and Mycoplasma synoviae*, Veterinary Microbiology, 88, 47- 58.

**Güler L (1992)** *Konya bölgesindeki kümes hayvanlarında serolojik yoklamalarla müsbet bulunan CRD vakalarında etken izolasyon çalışmaları*, Konya Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Uzmanlık Tezi, Konya

**Green GM, Jakab GJ, Low RB, Davis GS (1977)** *Defense mechanisms of the respiratory membrane* American Review of Respiratory Disease 115(3):479-514

**Hartup Barry K, Kollias George V (1999)** *Field investigation of Mycoplasma gallisepticum infections in house finch (carpadocus mexicanus) eggs and nestlings*, Avian Diseases, 43, 572-576.

- Hussni O. Muhammed, Tim E. Carpenter, and R. Yamamoto (1987)** *Economic impact of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae in commercial layer flocks*, Avian Diseases, 31, 477-482
- Hyman HC, Levishon S, Yogev D, Razin S (1989)** *DNA probes for Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae: application in experimentally infected chickens*, Veterinary Microbiology, 20, 323-337.
- İzgür M (1997)** *Mikoplazmalar*, Özel Mikrobiyoloji, 4. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Jordan F, Erno H, Cottew GS, Hinz KH and Stipkovits L (1982)** *Characterization and taxonomic description of 5 mycoplasma serovars (serotypes) of avian origin and their elevation to species rank and further evaluation of the taxonomic status of Mycoplasma synoviae*, Int J Syst Bacteriol, 32, 108-115.
- Jordan FTW (1983)** *Recovery and Identification of avian mycoplasmosis* In “Methods in Mycoplasmaology” Ed, Tully JG, Razin S, Vol II Diagnostic Mycoplasmaology, 69-79, Academic Press.
- Karaca K, Lam KM, Bickford AA (1989)** *Role of harderian glands in resistance against Mycoplasma gallisepticum challenge*, Res. Vet Sci. 47(3), 323-326
- Kempf I, Blanchard A, Gesbert F, Guittet M and Bennejean G (1993)** *The Polymerase chain reaction for Mycoplasma gallisepticum detection*, Avian Pathology, 22, 739-750.
- Kempf I, Gesbert F, Guittet M, Bennejean G (1994)** *Mycoplasma gallisepticum infection in drug-treated chickens: comparison of diagnosis methods including polymerase chain reaction*, Zentralabl Veterinarmed B Nov; 41(9):597-602
- Kempf I (1998)** *DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis*, Avian Pathology, 27, 7-14.
- Kempf I, Gesbert F (1998)** *Comparison of serological tests for detection of Mycoplasma gallisepticum antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens*, Veterinary Microbiology, 60, 207-213.

- Khehra RS, Jones RC and Bradbury JM (1998)** *Dual infection of turkey poults with avian pneumovirus and Mycoplasma synoviae*, Avian Pathology, 28, 401-404.
- Kiss I, Matiz K, Kaszanyitzky E, Chavez Y and Johansson KE (1997)** *Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay*, Veterinary Microbiology, 58, 23-40.
- Kleven SH (1998)** *Mycoplasmosis* In “A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens” Ed. by Swayne DE, published by The American Association of Avian Pathologists, Inc., Kennett Square, Pennsylvania.
- Kleven SH (2003)** *Mycoplasmosis* In “Diseases of poultry” Ed. by Saif YM 11 th edition, Iowa State Press Iowa.
- Kleven SH, King DD and Anderson DP (1972)** *Airsacculitis in broilers from Mycoplasma synoviae: effect on airsac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus*, Avian Diseases, 16, 915-924.
- Kleven SH, Levisohn S (1996)** *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology* In “Mycoplasma infections of poultry” Ed. by Tully JG, Volume II-Diagnostic Procedures, Academic Press, Inc.: New York, 283-292.
- Lauerman LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM and Van Santen VL (1993)** *Development and application of a polymerase chain reaction assay for Mycoplasma synoviae*, Avian Diseases, 37, 829—834.
- Lockaby SB, Hoerr FJ, Lauermann LH, Smith BF, Samoylov AM, Toivio-Kinnucan MA and Kleven SH (1999)** *Factors Associated with Virulence of Mycoplasma synoviae*, Avian Diseases, 43, 251-261.
- Levishon S, Hyman H, Perelman D, Razin S (1989)** *The use of a specific DNA probe for detection of Mycoplasma gallisepticum in field outbreaks*, Avian Pathology, 18, 535-541.
- McMartin DA, Khan MI, Farver TB, and Christie G (1987)** *Delination of the lateral spread of Mycoplasma Gallisepticum infection in chickens*. Avian Diseases 31:814-819

- Mallinson ET (1985)**, *MS erodes profit margins*, *Poultry Digest*, 44,204-207
- Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I (2002)** *Polymerase chain reaction for the detection of Mycoplasma gallisepticum in environmental samples*, *Avian Pathology*, 31, 163-168.
- Marois C, Oufour-Gesebert F and Kempf I (2000)** *Detection of Mycoplasma synoviae in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction*, *Veterinary microbiology*, 73, 311-318.
- May JD, Branton SL (1997)** *Identification of Mycoplasma Isolates by ELISA*, *Avian Diseases*, 41, 93-96.
- Mekkes DR, Feberwee A (2005)** *Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of Mycoplasma gallisepticum*, *Avian Pathology* Aug, 34(4): 348-54
- Mohammed HO, Carpenter TE and Yamamoto R (1987)** *Economic impact of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae in commercial layer flocks*, *Avian Diseases*, 31, 477-482.
- Morrow Chris J, Markham Jillian F and Whithear Kevin G (1998)** *Production of Temperature-sensitive Clones of Mycoplasma synoviae for Evaluation as Live Vaccines*, *Avian Diseases*, 42, 667-670.
- Morsy MA, Panangala VS, Gresham MM (1991)** *Identification of Mycoplasma gallisepticum by use of monoclonal antibody in a rapid slide agglutination test*, *Am. J. Vet. Res* 52:1602-1605
- Moscoso H, Thayer SG and Kleven SH (2002)** *Optimization and application of PCR for the detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae*, Department of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, Athens, GA, 30602.
- Nascimento Elmiro R, Yamamoto R, Herrick R, and Tait RT (1991)** *Polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma Gallisepticum*, *Avian Diseases*, 35, 62-69.

- Nascimento Elmiro R, Yamamoto R and Khan mazhar I (1993)** *Mycoplasma Gallisepticum F- Vaccine Strain Specific Polymerase Chain Reaction*, Avian Diseases, 37, 203- 211.
- Nonomura I, Imada Y (1982)** *Temperature-sensitive mutant of Mycoplasma synoviae. I. Production and selection of a nonpathogenic but immunogenic clone*, Avian Diseases Oct-Dec,26(4) :763-75
- Noormohammadi AH, Browning GF, Cowling PJ, O'Rourke D, Whithear KG and Markham PF (2002)** *Detection of antibodies to Mycoplasma gallisepticum Vaccine ts-11 by an Autologous pMGA Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay*, Avian Diseases, 46, 405-411.
- Noormohammadi AH, Hemmatzadeh F, Whithear KG (2007)** *Safety and efficacy of the Mycoplasma synoviae MS-H vaccine in turkeys*, Avian Diseases, 51(2), 550-4.
- Noormohammadi AH, Markham PF, Markham JF, Whithear KG and Browning GF (1999)** *Mycoplasma synoviae surface protein MSPB as a recombinant antigen in an indirect ELISA*, Microbiology, 145, 2087-2094.
- OIE Manuals (2006)** *Avian Mycoplasmosis*, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 25.06.2006 14:35  
[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00104](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00104)
- Orhan Gülşen (2006)** *Kişisel görüşme*, Konya Vet. Kont. ve Araş. Enst. Kanatlı Hastlıkları Laboratuvarı
- Ortiz A, Froyman R and Kleven SH (1995)** *Evaluation of enrofloxacin against egg transmission of Mycoplasma gallisepticum*, Avian Disease 39, 830-836
- Pang Y, Wang H, Girshick T, Xie Z and Khan Mazhar I (2002)** *Development and Application of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for Avian Respiratory Agents*, Avian Diseases, 46, 691-699.
- Raviv Z, Callison SA, Ferguson-Noel N, Kleven SH. (2007)** *Strain differentiating real-time PCR for Mycoplasma gallisepticum live vaccine evaluation studies*, Vet Microbiol Nov 22 [Epub ahead of print]

- Razin S, Freundt EA (1984)** *The mycoplasmas*. Krieg Nr, Holt JG. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, 1, 740-760. Williams & Wilkins, Baltimore USA.
- Razin S, Yogev D and Naot Y (1998)** *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, *Microbiology and molecular biology reviews*, 1094-1156.
- Salisch H, Hinz KH, Graack HD and Ryll M (1998)** *A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in concurrently infected chickens*, *Avian Pathology*, 27, 142-147.
- Salisch H, Ryll M, Hinz KH and Neumann U (1999)** *Experiences with multispecies polymerase chain reaction and specific oligonucleotid probes for the detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae*, *Avian Pathology*, 28, 337-344.
- Scott PC, Jones J, Morrow CJ, Ley DH and Whithear KG (1994)** *Experiences with a live attenuated Mycoplasma synoviae vaccine*, *Proc Western Poultr Dis Conf*, 43, 97-98.
- Sharma JM (1994)** *Avian respiratory immunity and immunosuppression*. AAAP July 10 San Francisco
- Silveira RM, Fiorentin L and Marques EK (1996)** *Polymerase chain reaction optimization for Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae diagnosis*, *Avian Diseases*, 40(1), 218-222.
- Slavik MF, Wang RF, Cao WW (1993)** *Development and evaluation of the polymerase chain reaction method for diagnosis of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens*, *Mol Cell Probes*, Dec 7(6): 459-63
- SPSS :SPSS /PC + V.2.0 (1998)** Base manual for the IBM PC/XT/AT and PS/2, Marjia and Morusis, 14 Inc. 444 N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611,
- Stanley WA, Hofcare CL, Speksnijder G, Kleve SH and Aggrey SE (2001)** *Monitoring Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin*, *Avian Diseases*, 45, 534-539.

- Stearns RC, Barnas GM, Walski M, and Brain JD (1987)** *Deposition and phagocytosis of inhaled particles in the gas exchange region of the duck, Anas platyrhynchos*. Respiratory Physiology. 67:23-36.
- Tully JG (1983)** *General cultivation techniques for mycoplasmas and spiroplasmas*. In “*Methods in Mycoplasmaology*” Ed, Razin, S, Tully JG, 1, 99-101, Academic Pres.
- Ülgen M (1991)** *Kanatlıların kronik solunum yolu infeksiyonu ( Chronic Respiratory Disease-CRD) üzerinde karşılaştırmalı bakteriyolojik ve serolojik araştırmalar*, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bursa.
- Wang H, Fadl AA and Khan MI (1997)** *Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas*, Molecular and cellular probes, 11, 211-216.
- Winner, F, Rosengarten R and Citti C (2000)** *In vitro cell invasion of Mycoplasma gallisepticum*, Infect Immun, 68, 4238-4244.
- Yönetmelik (1991)** *Kuluçkahane ve damızlık kanatlı işletmeleri yönetmeliği* R.Gazete: 20.03.2007 – 26468 [http://www.kkgm.gov.tr/yonetmelik/kuluckahane\\_yon.html](http://www.kkgm.gov.tr/yonetmelik/kuluckahane_yon.html)  
28.10.2007, 16:45
- Zanella A, Martino PA, Pratelli A and Stonfer M (1998)** *Development of antibiotic resistance in Mycoplasma gallisepticum in vitro*, Avian Pathology, 27, 591-596.

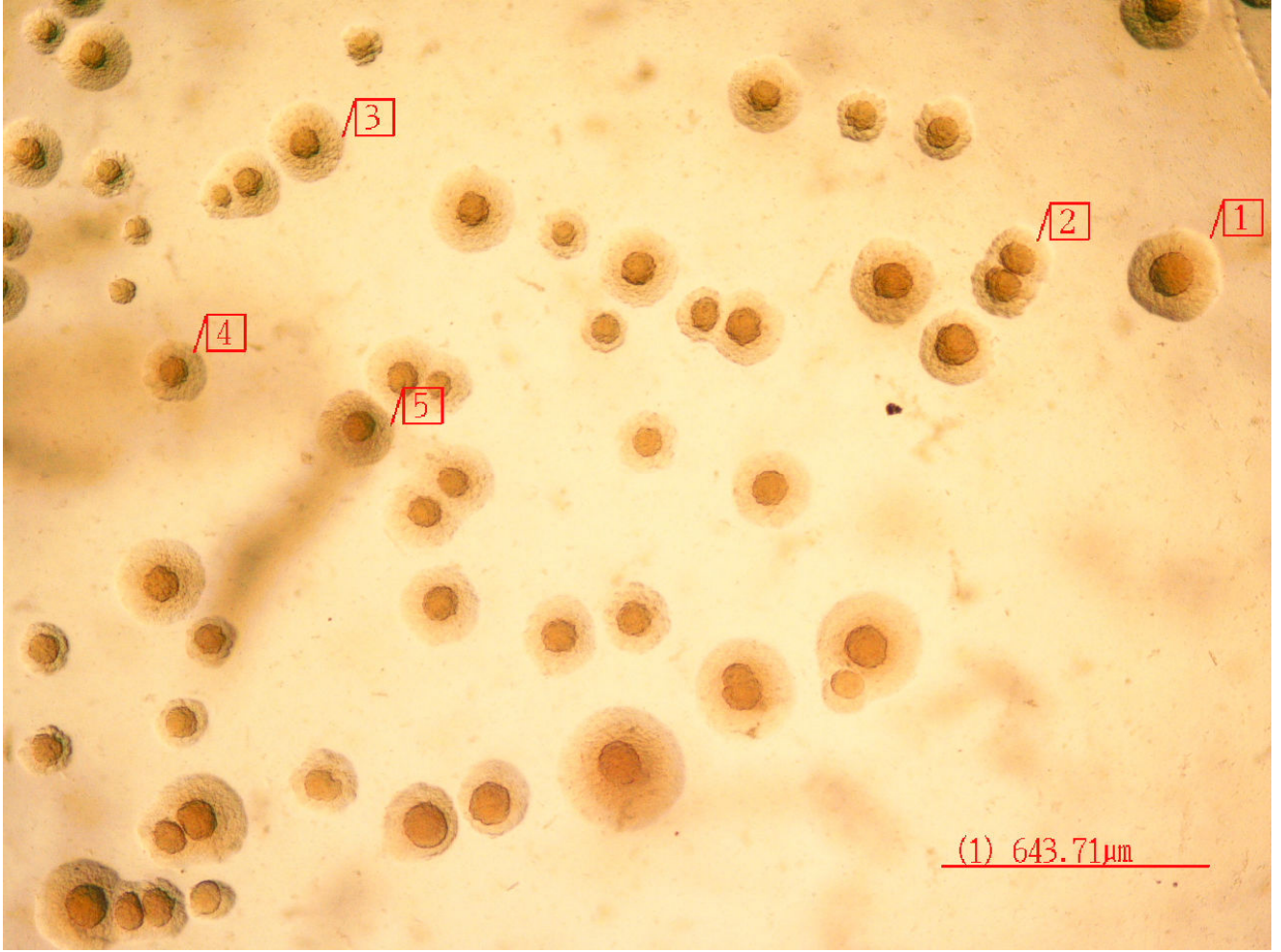
## 9. ÖZGEÇMİŞ

24.04.1977 yılında Tarsus'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Konya Meram Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 1995 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı. 2000 yılında *Veteriner Hekim* ünvanını aldı ve aynı yıl içerisinde Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde doktora öğrenimine başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır. İngilizce bilmektedir.

## 10. TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışması sırasında ilgi ve yardımlarını gördüğüm, Mikrobiyoloji ana bilim dalı başkanı Prof. Dr. Mehmet ATEŞ'e, Prof. Dr. Behiç SERPEK'e Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ana bilim dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. U. Sait UÇAN'a, Yrd. Dç. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ'ye, beni doktora eğitimi almaya teşvik eden ve çalışmalarım süresinde beni destekleyen babam Vet. Hekim Ramazan GÜRBÜZ'e, benim yokluğumda işyerimde beni destekleyen iş arkadaşlarıma, Vet. Hekim Ahmet OKUR'a, Vet. Hekim Mustafa YAĞCILAR'a, test kitlerinin temininde yardımcı olan Gürcan İYİSAN'a numunelerin işlenmesi ve testlerin yapılmasında katkıları olan Araş. Gör. Dr. Kürşat KAV ve Araş. Gör. Zafer SAYIN'a, Konya Vet. Kont. Araş. Enst. Müd. Dr. Adnan ÖZTÜRK'e, Dr. Gülşen ORHAN'a, Doç. Dr. Leyla GÜLER'e, Uzm. Vet Hekim Kamile KESLER'e, Levent KAYNAR' a, Ali GÖK'e ve tüm doktora çalışmam boyunca her türlü fedakârlığa katlanan ve destek veren değerli eşime ve anneme teşekkür ederim.

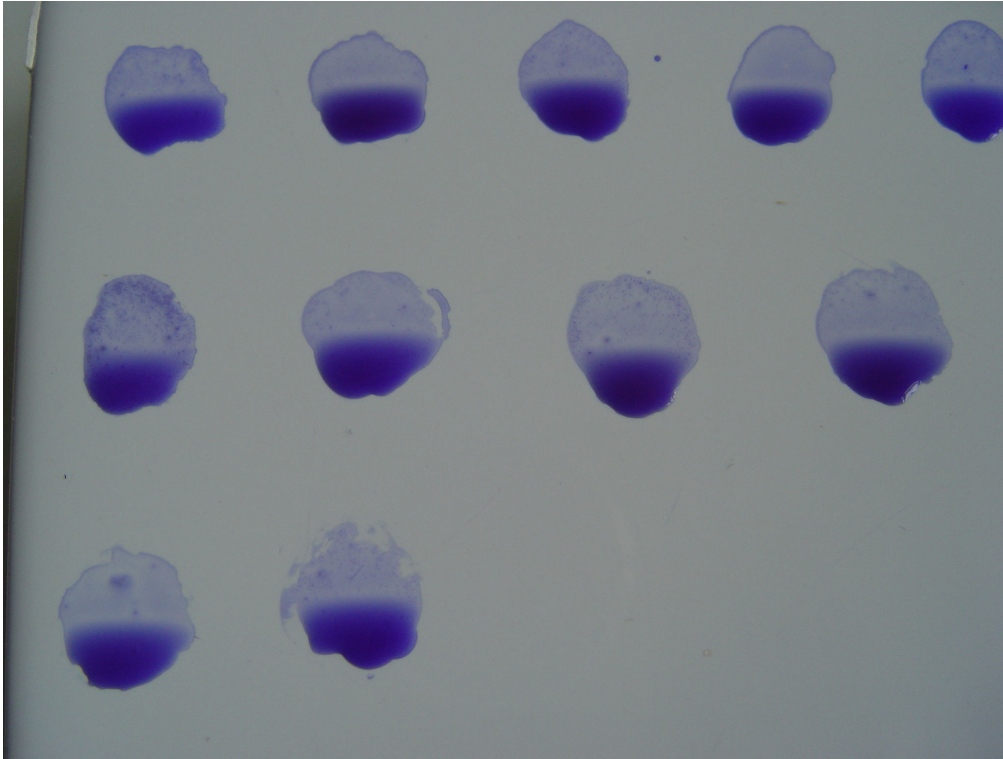
## 11. EKLER



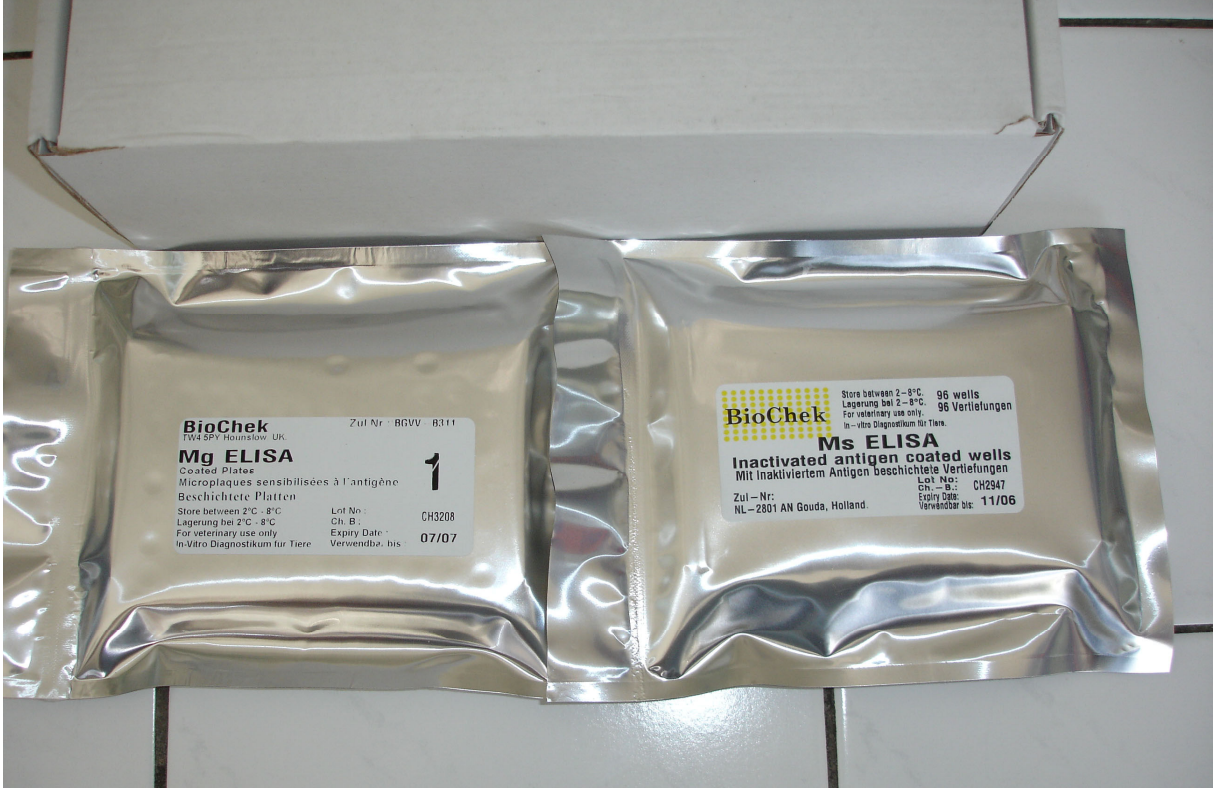
Resim 4 Mycoplasma besiyerinde *Mycoplasma gallisepticum* kolonileri



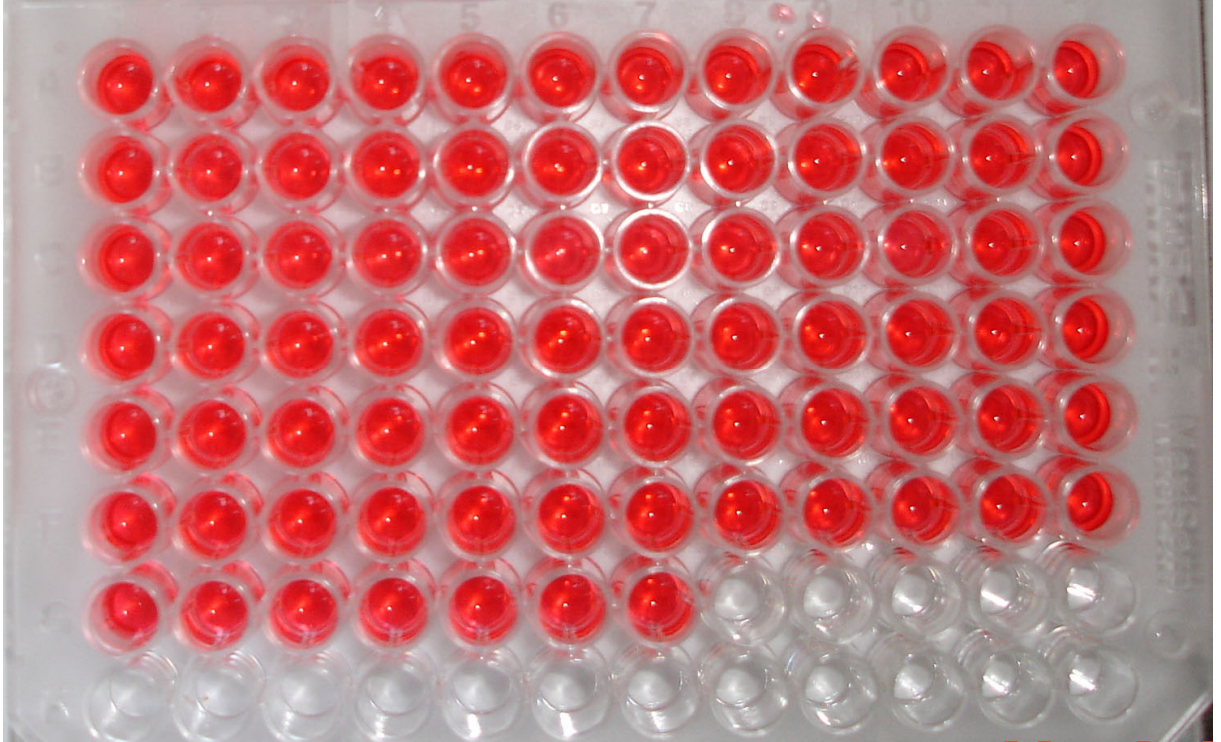
**Resim 5 MG ve MS Antijenleri**



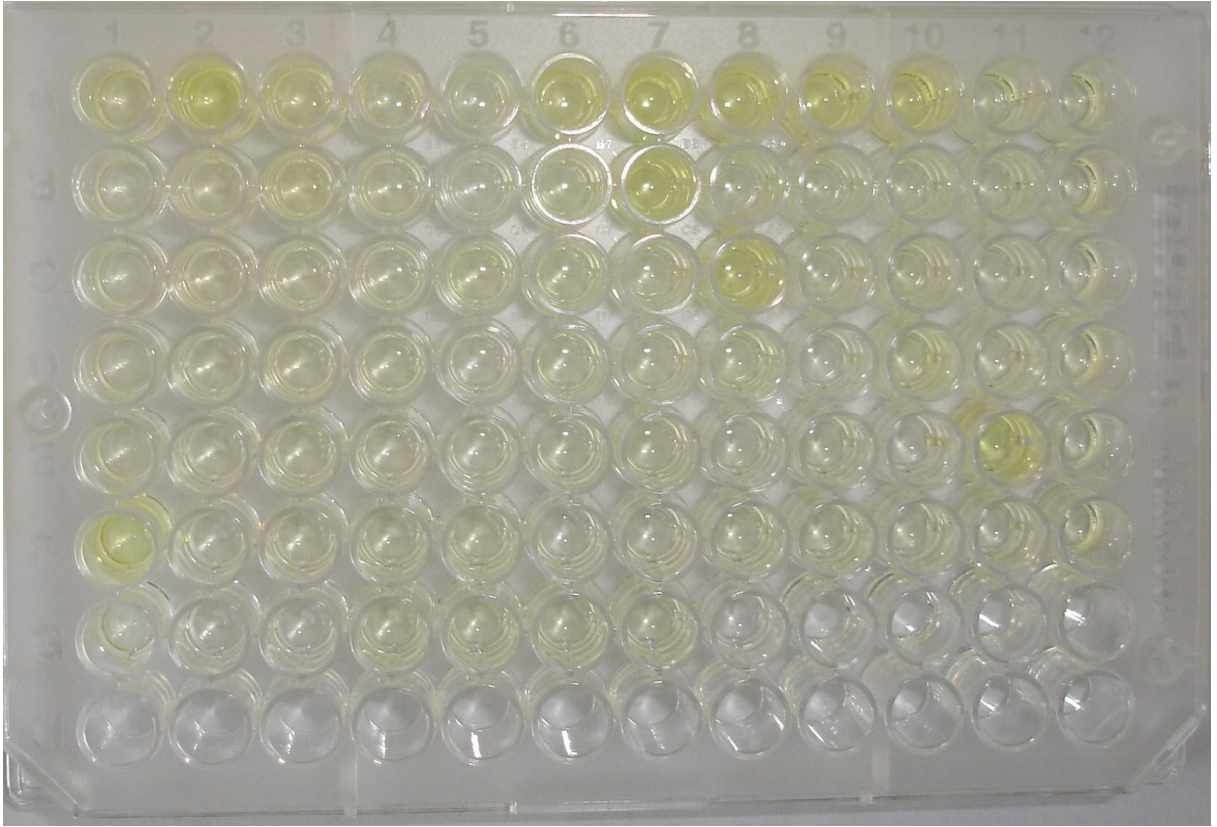
**Resim 6 MG antijeni ile LAT testinin yapılışı**



Resim 7 MG ve MS ELISA pleytleri



Resim 8 ELISA testi yapılmış pleyt



**Resim 9 ELISA testi**