



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**EGE BÖLGESİNDE BULUNAN TİCARİ KANATLI
İŞLETMELERİNDE MYCOPLASMA SYNOVIAE
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Hamza KILIÇ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EGE BÖLGESİNDE BULUNAN TİCARİ KANATLI
İŞLETMELERİNDE MYCOPLASMA SYNOVIAE
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Hamza KILIÇ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK**

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ege Bölgesinde Bulunan Ticari Kanatlı İşletmelerinde *Mycoplasma synoviae* Varlığının Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Hamza KILIÇ

Tarih: 07.02.2022

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalında

Hamza KILIÇ tarafından hazırlanan “Ege Bölgesinde Bulunan Ticari Kanatlı İşletmelerinde *Mycoplasma synoviae* Varlığının Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07.02.2022

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

Ankara Üniversitesi

Raportör-Üye

Dr. Öğr. Üyesi Gözde YÜCEL TENKEKİ

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Murat YILDIRIM

Kırıkkale Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	3
1.2. Etiyoloji	4
1.2.1. Sınıflandırma	4
1.2.2. Morfoloji ve Boyama	6
1.2.3. Üreme Gereksinimleri	6
1.2.4. Koloni Morfolojisi	7
1.2.5. Biyokimyasal Özellikleri	8
1.2.6. Kimyasal ve Fiziksel Etkenlere Duyarlılığı	8
1.2.7. Antijenik Yapı	9
1.2.8. Virülens Faktörleri	10
1.3. Patogenez ve Epidemiyoloji	10
1.3.1. Klinik Bulgular	12
1.3.2. Patolojik Bulgular	14
1.4. Teşhis ve Ayırıcı Teşhis	15
1.5. Koruma Stratejileri	18
1.5.1. Tedavi	19
1.5.2. Aşılama	20

2. GEREÇ ve YÖNTEM	22
2.1. Gereç	22
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	22
2.1.2. İzolasyonda Kullanılan Besiyeri	24
2.1.3. Kullanılan Referans Suş	24
2.1.4. Moleküler Teşhis	25
2.2. Yöntem	26
2.2.1. Örneklerin Hazırlanması	26
2.2.2. Bakteriyel Kültür	26
2.2.3. Moleküler Teşhis	28
2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu	28
2.2.3.2. qPCR Analizi	28
3. BULGULAR	30
3.1. Bakteriyel Kültür Bulguları	30
3.2. Moleküler Teşhis Bulguları	30
4. TARTIŞMA	32
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	38
ÖZET	39
SUMMARY	40
KAYNAKLAR	41
EKLER	48
Ek-1. Etik Kurul Raporu	48

ÖNSÖZ

Mycoplasma synoviae (Ms), önemli ekonomik kayıplara sebep olan, tavuk ve hindi yetiştiriciliğinde dünya çapında kontrol ve eradikasyon çalışmaları yürütülen önemli bir etkindir. Vertikal bulaşma özelliği sebebiyle birçok ülkede yasal mevzuatlarla damızlık sürülerin arılığı sağlanmaya çalışılmaktadır. Ayrıca dünya genelinde yaygın aşılama çalışmalarıyla hastalıkla mücadele edilmesine karşın ülkemizde damızlık sürülerde aşı kullanımı yasaktır. Günümüz ekonomik şartları ve teknolojisi göz önüne alındığında özellikle ülkemizin yüz akı sektörleri arasında yer alan kanatlı endüstrisi için fayda sağlayacağını düşündüğümüz bu çalışma ile Ms enfeksiyonunun Ege Bölgesindeki güncel durumunu ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu çalışmada İzmir, Manisa, Aydın, Denizli, Uşak, Kütahya ve Afyonkarahisar illerinde bulunan ticari tavuk ve hindi işletmelerinden örneklemeler yapılmıştır. Ms varlığı, toplanan tüm örneklerde konvansiyonel kültür yöntemi ve direkt qPCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) testi ile araştırılmıştır.

Doktora öğrenimim süresince her konuda destek olan danışman hocam Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet AKAN'a, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya, Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na teşekkür ederim. Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı personelleri, mesai arkadaşlarım Doç. Dr. Fethiye ÇÖVEN, Dr. İsmail ŞAHİNDOKUYUCU, Özge YILMAZ ÇAĞIRGAN, Dr. Ercüment ERTUNÇ, Ayhan GÜNCÜ'ye ve ekibimize dışarıdan teknik destek hizmeti veren Bahtiyar YILMAZ'a teşekkür ederim. Ayrıca tez konum ile ilgili bilgi ve tecrübelerini paylaşan, çalışmamda kullandığım izolatu temin ettiğim Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarı personelleri; Dr. Ümit ÖZDEMİR, Dr. Şefika Hande ERPEK ve Muhammed KARAHAN'a teşekkür ederim. Son olarak bu süreçte bana her zaman güç veren eşim Bahar KILIÇ ve kızım Umut Yaz KILIÇ'a, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan annem Sevim KILIÇ, babam Bayram KILIÇ'a ve ablalarım Buket DOĞAN ve Fatma FİDAN'a sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Baz çifti
Cq	Quantification Cycle
CRD	Kronik Solunum Yolu Enfeksiyonu
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GI	Üreme İnhibisyon Testi
HA	Hemaglutinasyon
HI	Hemaglutinasyon İnhibisyon
IFA	İndirekt Florasan Antikor Testi
IHC	İmmunohistokimyasal Teknik
IP	İndirekt İmmunperoksidaz Testi
LC	Light Cyclers
MSP	Mycoplasma Synovial Protein
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPIP	National Poultry Improvement Plan
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPLO	Pleuro Pneumonia Like Organism
SPA	Serum Pleyt Aglutinasyon
T _m	Erime Sıcaklığı
<i>vlhA</i>	Variable Lipoprotein ve Hemaglutinin A

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Mikoplazma kolonileri.	8
Şekil 1.2. Ayak tabanı ve eklemlerde Ms kaynaklı oluşan şişlik.	13
Şekil 1.3. Sekiz haftalık hindide ayak tabanında granülasyon dokusu ve purulent eksudat.	15
Şekil 1.4. Mikoplazma etkenlerinin tanı yöntemleri.	16
Şekil 2.2. Ekim yapılmamış Frey broth (kırmızı) ve Ms üreyen Frey broth (turuncu-sarı).	27
Şekil 2.3. Frey agarda üretilen Ms WVU1853 suşu.	27
Şekil 3.1. İllere göre Ms pozitif kümes sayısının alınan örnek sayısına oranı.	31

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Mikoplazma türleri ve doğal konakları.	5
Çizelge 1.2. Tavuk ve hindilerde görülen mikoplazma türlerinin bazı biyokimyasal özellikleri.	8
Çizelge 2.1. Kuluçkahane ve damızlık kümeslerden toplanan numunelerin illere göre dağılımı.	23
Çizelge 2.2. Ticari tavuk ve hindi kümeslerinden toplanan numunelerin illere göre dağılımı.	23
Çizelge 2.3. Modifiye Frey besiyeri içeriği.	24
Çizelge 2.4. Primerler ve TaqMan® probunun genel özellikleri.	25
Çizelge 2.5. qPCR yöntemi için hazırlanan reaksiyon karışımı ve hacimleri.	29
Çizelge 2.6. qPCR reaksiyonunun ısı, zaman ve döngü süreleri.	29
Çizelge 3.1. Ms izolasyonu sonuçları.	30
Çizelge 3.2. qPCR test sonuçları.	31

1. GİRİŞ

Mikoplazmalar, insanlarda, birçok hayvan, bitki ve insektalarda bulunan, doğada serbest olarak yaşayabilen en küçük ve en basit prokaryotik mikroorganizmalardır. Bu prokaryotlar, küçük boyutları ve genomları, özellikle hücre duvarlarının olmayışı ve yalnız plazma membranına sahip olmalarıyla karakterizedir. Bu özellikleri mikoplazmaların kendilerine özel ‘sahanda yumurta’ benzeri koloni morfolojisi oluşturmalarını, antibiyotiklere karşı direnç geliştirmelerini ve kompleks besinsel gereksinimlerini açıklamaktadır (Razin ve ark., 1998). Mikoplazmaların bazı türleri farklı konakları enfekte edebilmektedir. Bazı türleri ise konak spesifik olup tek bir hayvan türünü enfekte eder. Örneğin; *Mycoplasma meleagridis* sadece hindileri enfekte eder (Kleven, 1998). Genellikle mikoplazmalar mukozal yüzeylerde kolonize olurlar ve invaziv değildirler. Fakat, *Mycoplasma gallicepticum* ve *Mycoplasma synoviae* türlerinin hücre içine penetrasyon yeteneklerine sahip oldukları bilinmektedir (Dusanic ve ark., 2009 ve Winner ve ark., 2000).

Kanatlı hayvanlarda görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan mikoplazmalar; *Mycoplasma gallicepticum* (Mg), *Mycoplasma meleagridis* (Mm), *Mycoplasma synoviae* (Ms) ve *Mycoplasma iowae* (Mi)’dir. Genellikle solunum sistemi üzerinde etkileri olan bu etkenlerin horizontal bulaşmanın yanı sıra vertikal bulaşmaları sebebiyle de özellikle damızlık hayvanların ari olması açısından oldukça önemlidir (Ferguson-Noel ve ark., 2013a).

Ms kolonileri ilk olarak 1960 yılında Chalquest ve Fabricant’ın nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) gereksinimlerini ortaya koyması sonucu tespit edilmiştir. 1964 yılında Olson ve arkadaşları ise ilk kez *M. synoviae* adını farklı bir tür olarak isimlendirmiştir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Ms kanatlı hayvanlarda çoğunlukla subklinik üst solunum yolu enfeksiyonuna sebep olmaktadır. Newcastle hastalığı ve/veya İnfeksiyöz Bronşitis ile kombine

olduğu takdirde, hava kesesi lezyonlarına sebep olabilmektedir. Sistemik enfeksiyon oluşturmada eklemelerde ve tendonlarda synovitis, tendovaginitis ve bursitis şekillenmektedir (Ferguson-Noel ve ark., 2013b).

Ms hem tavuklar hem de hindiler için patojen bir mikroorganizmadır. Genellikle üst solunum yolu hastalığı olarak ortaya çıkarken, İnfeksiyöz Synovitis'e yol açmakta, hava keselerinde ve eklemelerde yangı oluşturarak büyüme ve gelişmeyi, çıkım randımanını ve yumurta randımanını etkilemekte ve özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda kabuk şekil bozukluklarına sebep olduğu bildirilmektedir (Catania ve ark., 2010).

Ms'in neden olduğu hastalık tablosunda özellikle de solunum sistemi formunda; konağın yaşı, türü, miks enfeksiyon oluşumu ve suşun virulensi oldukça önemlidir. Ayrıca beslenme ve havalandırma koşullarına bağlı olarak kümes içerisindeki fazla amonyak, toz, aşırı kalabalık kümesler, dezenfeksiyon noksanlıkları ve stres faktörleri hayvanları daha duyarlı hale getirmektedir. Etkenin doğal konakları arasında tavuk, hindi ve beç tavuğu bulunmakta olup en duyarlı hayvan tavuktur (Akan ve İzgür, 2002).

Ms evcil kanatlılarda azalan yumurta kalitesi ve verimi, büyümede gerileme, azalan kuluçka randımanı ve karkas kayıpları sebebiyle kanatlı endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Tavuk ve hindi sürülerinde etkenin yayılmasında vertikal bulaşmanın büyük önem taşıması sebebiyle en etkili kontrol yöntemi sürülerin düzenli olarak izlenmesi ve özellikle pozitif damızlık sürülerin elemine edilmesidir. Enfeksiyonun yayılmasının önlenmesi için güvenilir ve hızlı teşhis gerekmektedir (Luitel ve ark., 2020).

Kanatlı mikoplazmalarının teşhisinde etken izolasyonu, moleküler yöntemlerle organizmanın nükleik asit tespiti ve serolojik testler kullanılmaktadır. Ms'in teşhisinde kültür yöntemi altın standarttır, ancak bu yöntem zahmetli ve zaman alıcıdır. Tamamlanması 3-4 hafta kadar sürebilmektedir. Serolojik yöntemler ise sürü izleme ve kontrol programlarında dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu

testlerde düşük sensitivite, nonspesifik reaksiyonlar ve kros-reaksiyonlar şekillenebilmesi sebebiyle konfirmasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu açıdan, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli testler hızlı, hassas ve spesifik olup mikoplazmal DNA varlığını tespit etmek için kültürel yöntemlerin yerine sıklıkla kullanılmaktadır (Pohuang ve ark., 2020).

Ms enfeksiyonlarına karşı tedavide antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak enfeksiyonun tamamen ortadan kaldırılmasında yeterli değildirler. Enfeksiyondan korunmada ise canlı aşılar birçok ülkede tercih edilmektedir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

1.1. Tarihçe

Mikoplazmalar, ilk olarak 1898 yılında Nocard ve Roux tarafından sığırlarda görülen Pleuro Pneumonia olgularından izole edilmiş, bu sebeple önceleri PPLO (Pleuro Pneumonia Like Organism), *Asterococcus*, *Anulomyces* diye adlandırılmış ancak ilk kez Julien Nowak tarafından 1929 yılında *Mycoplasma* adı verilmiştir (Arda ve İzgür, 1984 ve Krass ve Gardner, 1973).

Kanatlılarda mikoplazma enfeksiyonları ilk kez, Dodd tarafından, 1905 yılında İngiltere’de, hindilerde epizootik pnömo enterit olarak adlandırılmıştır (Dodd, 1905). 1935 yılında Nelson burun akıntısı görülen tavuklardan elde ettiği kokobasil görünümüne sahip, yavaş üreyen bu mikroorganizmaların embriyolu tavuk yumurtasında ve doku kültürünün yanı sıra besiyerinde de ürediğini tespit etmiştir (Nelson, 1935).

Dickinson ve Hinshaw (1938), hindilerin İnfeksiyöz Synovitis’ini adlandırmışlardır. 1943’te Delaplane ve Stuart, embriyolu tavuk yumurtasında etkeni üreterek, tavuklardan Kronik Solunum Yolu İnfeksiyonu (CRD)’nu, daha sonra ise sinüzitli hindilerden Mg izole etmişlerdir.

1950'nin başlarında Markham ve Wong (1952) ile Van Roekel ve Olesiuk (1953)'un yaptıkları çalışmalarda, tavuk ve hindilerden elde edilen mikroorganizmaların başarılı bir şekilde üretilmesiyle birlikte bunların Pleuropneumonia grubundan (*Mycoplasma spp.*) olduklarını bildirmişlerdir.

Ms kaynaklı İnfeksiyöz Synovitis olgusu ilk olarak Olson ve ark. (1954, 1956) tarafından ortaya konmuştur. Ms'in solunum sistemi formu (Olson ve ark., 1964) ve hava keselerinin enfeksiyonu tablosu (Kleven ve ark., 1972) ise broylerlerde İnfeksiyöz Bronşitis ve Newcastle aşıları kullanımı ile görüldüğü bildirilmiştir.

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Sınıflandırma

Mikoplazmalar, *Mollicutes* sınıfı, *Mycoplasmatales* takımı, *Mycoplasmataceae* ailesinde bulunan, 120'den fazla alt türü olan, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, pleomorfik şekillerde görülebilen, fakültatif anaerob mikroorganizmalardır (Akan ve İzgür, 2002). *Mollicutes* sınıfında veteriner hekimliği için önemli olan başlıca iki familya; *Mycoplasmataceae* ve *Acholeplasmataceae*'lerdir. Bunların temel olarak farklılıkları; morfolojileri, genom büyüklükleri ve besinsel gereksinimleridir (Weisburg ve ark., 1989).

Dünya'da 120'den fazla mikoplazma türü olduğu ve bunların 20'sinden fazlasının kanatlı hayvanları enfekte ettikleri bilinmektedir. Mg ve Ms kanatlı türleri için majör patojenler olup, Mm ve Mi ise hindilerde önemlidir (Kleven, 2008a). Kanatlılarda görülen mikoplazma türlerinin güncel listesi Çizelge 1.1'de bulunmaktadır (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Çizelge 1.1. Mikoplazma türleri ve doğal konakları (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Tür	Doğal Konak	Glikoz Fermentasyonu	Arjinin Hidrolizi
<i>A. laidlawii</i>	Birçok tür	+	-
<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>	Akbaba	+	-
<i>M. falconis</i>	Doğan	-	+
<i>M. gallinarum</i>	Tavuk	-	+
<i>M. gallinaceum</i>	Tavuk	+	-
<i>M. gallisepticum</i>	Tavuk, Hindi, Saka, Diğerleri	+	-
<i>M. gallopavonis</i>	Hindi	+	-
<i>M. glycyphilum</i>	Tavuk	+	-
<i>M. gypis</i>	Kızıl Akbaba	-	+
<i>M. imitans</i>	Ördek, Kaz, Keklik	+	-
<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>	Sığırcık	+	-
<i>M. synoviae</i>	Tavuk, Hindi	+	-
<i>M. tullyi</i>	Penguen	+	-
<i>U. gallorale</i>	Tavuk	-	-

Genom büyüklükleri 580-1350 kbp ve G+C içeriği %23-40 olan, 300-800 nm büyüklüğündeki, küçük pleomorfik mikoplazmaların sitoplazmik membranları protein, lipid ve karbonhidrat yapıda üç tabakalı ünit membrandan oluşmaktadır. Ünit membranın yapısındaki bu maddeler mikroorganizmaların antijenik özelliklerinden sorumludurlar. Sitoplazmik membranın yapısındaki karbonhidratlar, diğer suşlarla kros-reaksiyonlarda ve nötralizan antikorların tespitinde rol oynamaktadırlar. Proteinler ise; metabolik inhibisyon ve presipitasyonda rol alan antikorların sentezini uyarmaktadırlar (Ferguson-Noel ve ark., 2013a ve Saif, 2001).

Eritrositleri hemaglutine etme özelliği olan Mg, Mm ve Ms türlerinde ise bu katmanın üzerinde, plazma membranından köken alan, yarım ay şeklinde kabarcıklar vardır. Bu kabarcıklar eritrositler üzerinde yer alan glikoforin reseptörleri yardımıyla bakterinin eritrositlere tutunmasını sağlamaktadır. Serolojik olarak hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testi bu üç tür için kullanılabilir (Ferguson-Noel ve ark., 2013a).

1.2.2. Morfoloji ve Boyanma

Giemsa ile boyanmış preparatlarda veya karanlık saha incelemelerinde, Ms genellikle 0,2-0,5 µm çapında pleomorfik kokoid veya kokobasiller cisimler olarak görünür. İnce çubuk, filament ve halka formları da görülmüştür (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Mikoplazmalar, diğer bakterilerden farklı olarak hücre duvarlarından yoksundurlar. Bu sebepten dolayı Gram boyanma özellikleri olmamasına karşın Gram negatif gibi boyanırlar. Mikoplazmaların genetik yapıları incelendiğinde ise Gram pozitif bakterilerle ilişkilidirler. Günümüzde filogenetik olarak Gram pozitif bakterilerin içerisinde, fakat ayrı bir soy olarak sınıflandırılmaktadırlar (Krieg ve ark., 2010).

1.2.3. Üreme Gereksinimleri

Mikoplazmaların üretilmesi diğer bakterilere göre daha zordur. Nazlı üreyen bu mikroorganizmaların laboratuvar koşullarında üreyebilmesi için bazı özel üretme faktörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ms genellikle %10-15 oranında domuz serumu içeren proteince zengin ortamlara ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca bazı maya türevli bileşenlerin ilavesi faydalı olmaktadır. Ms'in üretilmesinde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) eklenmesi gerekmektedir. Gram pozitif bakteri kontaminantlarının üremesini engellenmek için penisilin G, Gram negatif bakteriler ile mantarların üremesinin engellenmesi için de thallium acetate eklenmektedir. Ayrıca kullanılan besi yerlerine fenol kırmızısı gibi indikatör maddeler de katılabilmektedir (Ferguson-Noel ve ark., 2013a). Günümüzde, kanatlı mikoplazma türlerini üretmek için yaygın olarak kullanılan besi yerleri Frey (Frey ve ark., 1968) veya Bradbury (Bradbury, 1977) tarafından geliştirilen besiyerleridir.

Mikoplazmalar oldukça yavaş üreyen mikroorganizmalar olup genellikle 37-38°C ve %5-10 CO₂'li ortamı tercih etmektedirler. İlk izolasyonda doku antijenleri, antikolar ve toksinler ortamda fazla olabileceğinden inokulum seyreltilerek

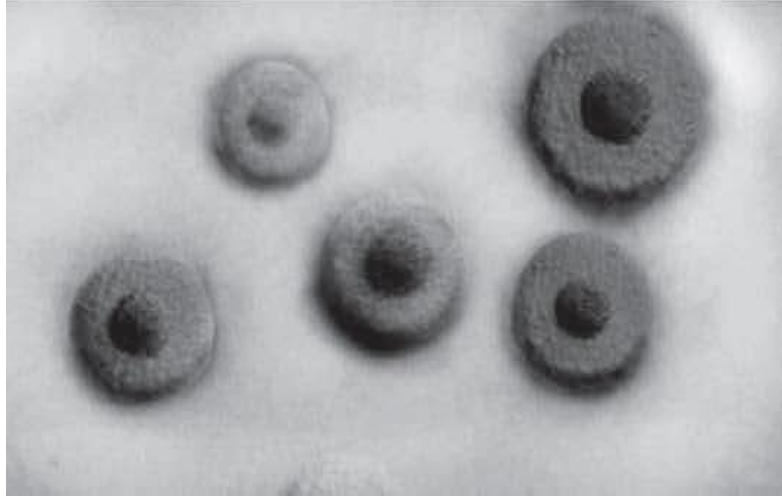
hazırlanmalı ve 24 saat sonra yeni besiyerine pasajlanmalıdır. Sıvı besiyerine %10 oranında ekim yapılmalıdır. Koloniler 3-10 gün içerisinde katı besiyerinde şekillenirler (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Glikozu fermente eden mikoplazma türleri, ortamın pH'sının düşüşüyle, besiyerini kırmızıdan turuncu/sarıya değişmesine neden olarak, büyümenin görsel olarak tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle Ms pH değişimine çok duyarlıdır. Besiyerinde bulunan fenol kırmızısı indikatörü kırmızıdan sarıya döndükten (pH 6,8'in altına indiğinde) birkaç saat sonra inkubasyon devam ederse Ms hızla ölmeye başlar. Sıvı kültürler renk değişimini takiben agara ve yeni bir sıvı besiyerine transfer edilmelidir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Mikoplazmaların, üretilmesinde ayrıca emriyolu tavuk yumurtası ve hücre kültürü yöntemleri de kullanılabilir. Diğer bakterilerden küçük oldukları için 0,45 µm'lik filtreden geçebilmektedirler (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

1.2.4. Koloni Morfolojisi

Mikoplazmalar, genellikle 37-38°C'de oldukça yavaş üremeye meyillidirler. Kolonileri, 7,2-7,8 pH'da, %5-10 CO₂'li ve nemli ortamda, 37°C'de, 5-7 gün inkübasyonda katı ve sıvı besiyerinde şekillenmektedir. Tipik kolonileri, genellikle gözle görülemeyen, ancak stereomikroskopla görülebilen, tipik 'sahanda yumurta' veya 'ortası düğmeli' şekilde, 0,1-1 mm aralığında, küçük, düzgün, sirküler yapıdadır (Şekil 1.1). Mikoplazmalarda görülen bu koloni şekline L (Lister) koloni formu denilmektedir. Mikoplazma hücreleri 0,2-0,5 µm arasında değişmekte olup genellikle kokoid, kokobasil şeklinde olmalarına karşın, ince çomak, filament ve halka formları da görülmüştür (Ferguson-Noel ve ark., 2013a).



Şekil 1.1. Mikoplazma kolonileri (Ülgen, 2018).

1.2.5. Biyokimyasal Özellikleri

Glikozun fermentasyonu türler arasında farklılık göstermekle birlikte mikoplazma besiyerlerine ilave edilmektedir. Bazı türlerde temel enerji kaynağı olarak glikoz fermentasyonu yerine arjinin kullanılmaktadır. Yalnız *M. iowae* ve bazı türler hem arjinini hem de glikozu fermente edebilmektedir (Ferguson-Noel ve ark., 2013a). Kanatlı mikoplazma etkenlerinin biyokimyasal özelliklerini gösteren tablo Çizelge 1.2’de sunulmuştur.

Çizelge 1.2. Tavuk ve hindilerde görülen mikoplazma türlerinin bazı biyokimyasal özellikleri.

	HA	Glikoz	Arjinin	Fosfataz	Tetrazolyum	Film Spot	NAD
Mg	+	+	-	-	+	-	-
Ms	+	+	-	-	±	+	+
Mm	±	-	+	+	-	-	-
Mi	-	+	+	-	-	-	-

1.2.6. Kimyasal ve Fiziksel Etkenlere Duyarlılığı

Mikoplazma türlerinin hücre duvarının olmaması sebebiyle dış ortama ve dezenfektanlara karşı dayanıklılığı azdır ancak; hücre duvarı metabolizması üzerinde etkili tüm antibakteriyellere karşı dirençlidirler. Bununla birlikte, dondurup çözdürmeye diğer bakterilere kıyasla daha dayanıklıdırlar. Mikoplazmalar, canlı

vücudunda uzun süre yaşayabilirken, dış ortamda sıcaklık artışı ile yaşam süresi kısalmaktadır. Etkenin çevresel koşullardan etkilenmesi etken ile mücadelede oldukça önemlidir (Akan ve İzgür, 2002 ve Jordan, 1996).

Yaygın olarak kullanılan birçok dezenfektana karşı duyarlıdırlar. Kanatlı mikoplazmalarının inaktivasyonunda kullanılan başlıca dezenfektanlar; fenol bileşikleri, formalin, beta-propiolakton ve tiyomersal'dır (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Sıvı kültürleri -70°C'de veya liyofilize edilerek +4°C'de yıllarca muhafaza edilebilmektedir. Agarda taze üreyen koloniler oda sıcaklığında günlerce canlı kalabilirler. Mg ve Ms'in enfekte kuluçkalık tavuk yumurtasından 45,6 – 45,8°C ve 12-14 saatlik inkubasyon sonucu inaktive edildiği bildirilmiştir. Ayrıca tüy, toz, yem, içme suyu ve dışkı dahil olmak üzere çevresel örneklerde tespit edilebilmektedir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

1.2.7. Antijenik Yapı

Ms, MSPA (Mycoplasma synovial protein A/C-terminal hemagglutinin proteini) ve MSPB (Mycoplasma synovial protein B/N-terminal lipoprotein) adlı iki antijene sahiptir. MSPA'nın hemagglutinin ile ilgili olduğu bilinmektedir; ancak MSPB'nin fonksiyonu bilinmemektedir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020). Bu iki antijen prolipoprotein yapısındadır ve *vlhA* (variable lipoprotein ve hemagglutinin) geni tarafından kodlanırlar (Noormohammadi ve ark., 2000).

Ms'in *vlhA* geni ile Mg'nin *vlhA* 4.10 (pMGA1.7) geni yüksek oranda birbirlerine benzemekte ve birbirine benzer proteinleri kodlamaktadırlar. Bu sebepten dolayı da serolojik testlerde bu mikroorganizmalar arasında çapraz reaksiyon olabilmektedir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Hemaglutininler, Ms ve Mg'nin virülensi için önemlidir. Özellikle kolonizasyonda rol alan en önemli yüzey antijenleridirler (Bencina, 2002).

1.2.8. Virülens Faktörleri

Ms'in izolatları arasında hastalık yapma özellikleri bakımından farklılıklar vardır. Bazı virulent saha suşlarının çok az klinik tablo oluşturduğu ya da hiç oluşturmadığı bilinmektedir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Saha suşlarının patojenitesi ve virülenslerindeki farklılıklar sadece hemaglutinasyon, hemadsorbsiyon, hücrelere tutunma veya silyostazis gibi virülens faktörleri ile açıklanamamaktadır. Ancak, hemaglutinasyon pozitif veren bir Ms suşu, negatif verene göre daha yaygın İnfeksiyöz Sinovitis lezyonları yapmaktadır (Lockaby ve ark., 1998).

Sialidaz aktivitesi, nitrik oksit üretimi ve hücre invazyonu, Ms virülensi ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca MSPA ve MSPB'nin antijenik varyasyonları da virülens faktörü olarak görülmektedir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

1.3. Patogenez ve Epidemiyoloji

İnfeksiyöz Sinovitis ilk olarak 1950-1960 yılları arasında ABD'de 4-12 haftalık broyler tavuklarda görülmüştür. 1970'li yıllarda ise solunum formu daha yaygın olarak görülmeye başlanmış olup dünya çapında yaygın bir enfeksiyondur. Subklinik enfeksiyon olarak günümüzde de halen görülebilmektedir. Ms enfeksiyonları yaşlı ticari yumurtacı sürülerde sıklıkla görülebilmektedir. Hindilerde ise genellikle 10-20 haftalık yaştaki sürülerde görülmektedir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Tavuk ve hindiler Ms enfeksiyonunun doğal konaklarıdır. Ayrıca ördek, kaz, beç tavuğu, güvercin, japon bildiricini, sülün, keklik, devekuşu, filamingo, serçe ve

diğer yabani kuş türlerinin doğal olarak enfekte olduğu bildirilmiştir. Sülünler, kazlar, ördekler ve muhabbet kuşları ise deneysel enfeksiyonlara karşı duyarlıdır (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020). Kleven ve Fletcher (1983), serçelerin yapay olarak enfekte olmalarına karşı oldukça dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Tavuklarda akut enfeksiyon genellikle 4-16 haftalık yaşlarda, hindilerde ise 10-24 haftalık yaşlarda görülmektedir. Kronik enfeksiyon akut fazı takip edebilir ve sürünün yaşamı boyunca devam edebilir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Mikoplazmalarda bulaşma, çeşitli şekillerde olabilmektedir. Enfekte hayvanlardan sağlıklılara direkt temas ile horizontal bulaşma, kontamine yem, su, altlık ve personel ile indirekt bulaşma olabilmektedir. Ayrıca damızlıklardan yumurtaların kontaminasyonu ile vertikal bulaşma da oldukça önemlidir (Nascimento ve ark., 2005).

Ms enfeksiyonları lateral ve vertikal yol ile bulaşabilmektedir. Lateral bulaşma doğrudan temas ile hızlı şekilde olabilmektedir. Sürüde birkaç tavuk klinik belirti gösterse bile solunum yoluyla bulaşma sonucunda tüm sürünün %100'ü enfekte olabilmektedir. Bulaşma çoğunlukla, konjonktiva ve üst solunum yolu aracılığıyla olmaktadır (Weinack ve ark., 1983).

Vertikal bulaşma Ms'in tavuk ve hindilerde yayılmasında büyük önem taşımaktadır. Broyler damızlık bir kümesin deneysel olarak enfekte edilmesi sonucunda, inokulasyonu takiben 6-31 gün arasında, bir günlük civciv, infertil yumurta ve kabukaltı ölmüş embriyoların trakealarında Ms enfeksiyonu tespit edildiği bildirilmiştir (Vardaman, 1976). Ticari damızlık sürüler yumurta üretimi sırasında enfekte olduğu zaman ilk 4-6 hafta vertikal bulaşmanın en fazla olduğu dönemdir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

İnfeksiyöz Sinovitis'in 6 günlük civcivlerde görülmesi, yumurta ile bulaşma sonucu inkübasyon periyodunun daha kısa olduğunu göstermektedir. Lateral bulaşma ile ortaya çıkan enfeksiyonlarda ise kuluçka süresi 1-21 arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Bu süre, organizmaya giren etkenin miktarı ve patojenitesine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Antikorlar ise klinik tablo ortaya çıkmadan önce tespit edilebilmektedir. Trakeal yol ile alınan etken 4 gün içerisinde trakea ve sinüs enfeksiyonuna sebep olur ve temas halindeki diğer kanatlılara hızlıca bulaşır. Hava kesesi lezyonları ise 17-21 gün sonra şekillenir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020). Hava kesesi yangısı Newcastle hastalığı ve İnfeksiyöz Bronşitis aşılı veya diğer solunum yolu enfeksiyonlarıyla birlikte şiddetlenir (Kleven ve ark., 1972). Hava kesesi yangısını tetikleyen diğer faktörler; olumsuz kümes koşulları ve Gumboro gibi immunsupresyona sebep olan hastalıklardır (Giambrone ve ark., 1977). Ayrıca şiddetli sinovitis görülen hindilerde meningeal vaskülit lezyonları görülmüştür (Chin ve ark., 1991).

Hücre duvarına sahip olmayan mikoplazma etkenlerinin konak dışında ömrü oldukça azdır. Etkenin konak dışında soğuk ortamlarda yaşama süresi artmakta, tavuk dışkısında 1-3 gün arasında canlı kalabilmektedir (Akan, 2007). Yapılan çalışmalarda etkenin insan burun boşluğunda bir gün, giysilerde ise üç gün kadar yaşayabildiği ve bu nedenle özellikle çiftliklerdeki bakıcıların sürüler arasında farklı kişiler olması gerekmekte, buna imkan yoksa da iş akışını negatif sürülerden şüpheli ve en son pozitif sürülere doğru takip etmesi enfeksiyonun yayılımını önlemek adına önemlidir (Akan ve İzgür, 2002).

1.3.1. Klinik Bulgular

Kanatlı hayvanlarda Ms enfeksiyonları genellikle eklem bozuklukları ve solunum sistemi bozuklukları ile karakterize olmak üzere iki formda karşımıza çıkmaktadır (Akan ve İzgür, 2002).

Akut enfeksiyon, tavuklarda genellikle 4-16 haftalık yaşlarda, hindilerde ise 10-24 haftalık yaşlarda görülmektedir. Kronik enfeksiyon, akut formu takiben

oluşabilir ve bazen de persiste olarak sürü hayatının geri kalanında etkeni taşıyabilmektedir. Bazen de kronik tablo sürüde herhangi bir yaş aralığında akut form oluşmadan şekillenebilmektedir (Ferguson-Noel ve ark., 2013b).

Tavuklarda İnfeksiyöz Sinovitis'te ilk olarak gözlenebilen belirtiler ibikte solma, topallık ve büyümede geriliktir. Hastalık ilerledikçe tüyler karışır, ibik küçülür ve hatta bazı olgularda mavimsi kırmızı renkte olabilmektedir. Özellikle ayak ve diz eklemleri etkilenir, Şekil 1.2'de görüldüğü gibi eksudat birikimi, şişlik ve buna bağlı topallık şekillenir. Hindilerde ise sıklıkla göğüste su dolu kabarcıklar şekillenir. Enfekte hayvanlar genellikle dehidre, cansız ve güçsüz haldedir. Çoğunlukla dışkının rengi yeşilimsi görülür. Hava kesesi yangısı özellikle kış aylarında hava kalitesinin bozulduğu dönemlerde, broyler sürülerde sıklıkla ortaya çıkmaktadır (Ferguson-Noel ve ark., 2013b).



Şekil 1.2. Ayak tabanı ve eklemlerde Ms kaynaklı oluşan şişlik (Adul-Azis ve Barnes, 2018).

Yumurtacı sürülerde, verim düşüklüğü, dölsüz yumurta sayısında %10'dan fazla artış ve dömlü yumurtalarda kabuk altı ölümler şekillenmektedir. Ayrıca yumurtacı tavuklarda Ms, *E. coli* kaynaklı peritonitis tablosunda mortalitenin artmasına sebep olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda Hollanda, İtalya ve Almanya'da yapılan çalışmalarda Ms'in apikal yumurta kabuğu anormalliklerinde rol oynadığı ortaya konmuştur (Ferguson-Noel ve ark., 2013b).

Hindilerde Ms, tavuklardaki bulgulara benzer klinik tablo oluşturur. Topallık en yaygın görülen semptomdur. Eklemlerdeki şişliklerin dışında bazen sternal

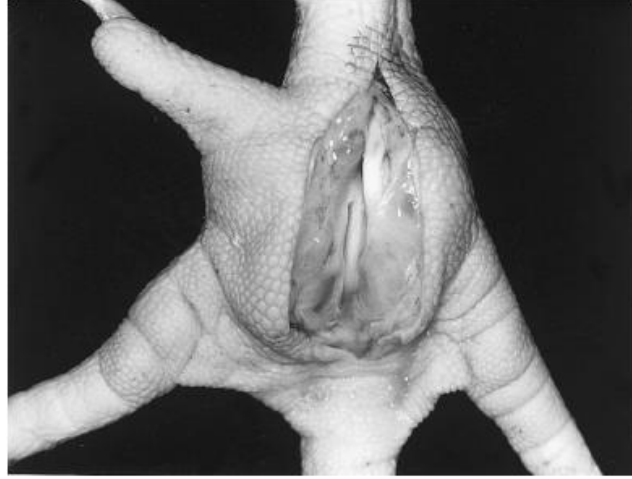
bursada genişleme görülür. Enfekte hayvanlarda kilo kaybı görülür (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Hindilerde solunum sistemi semptomları genellikle görülmez. Ancak Ms pozitif sürülerin trakealarından Ms tespit edildiği bildirilmiştir. Hindilerde görülen sinüzitin Ms ve Mm'in sinerjistik etkisi sonucu olduğu tespit edilmiştir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Tavuklarda morbidite; klinik sinovitis olgularında %2-75 arasında, respiratorik olgularda ise genellikle subklinik olmakla birlikte %90-100 oranında tüm hayvanlarda görülebilmektedir. Mortalite ise genellikle %1'den azdır ve %10'a kadar çıkabilmektedir. Hindilerde ise morbidite %1-20 arasında değişmektedir (Ferguson-Noel ve ark., 2013b).

1.3.2. Patolojik Bulgular

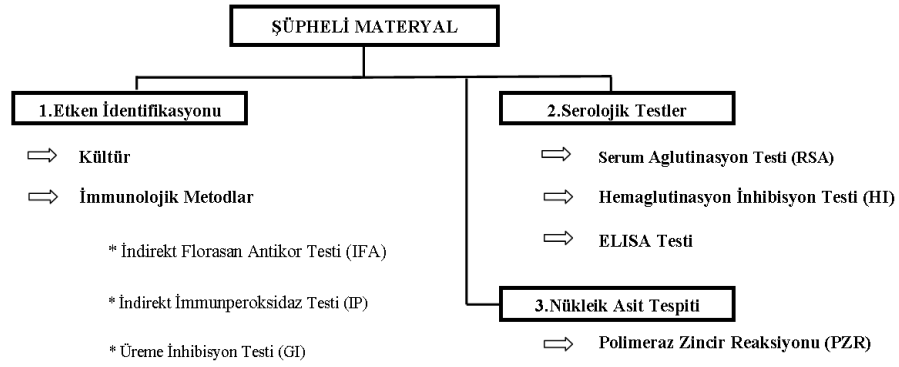
İnfeksiyöz Sinovitis formunda tavuk ve hindilerde genellikle tendon kılıflarının, eklemlerin ve omurga bursalarının sinovial membranlarında Şekil 1.3'deki gibi eksudat birikir. Böbrekler şişkin ve renkleri solgundur. Hastalığın ilerleyen formlarında tendon kılıflarında, eklemlerde ve hava keselerinde kazeöz eksudat görülür. Üst solunum yollarında büyük lezyonlar görülmez. Hava keselerinin ise şeffaflığını kaybederek matlaştığı görülebilmektedir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).



Şekil 1.3. Sekiz haftalık hindide ayak tabanında granülasyon dokusu ve purulent eksudat (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

1.4. Teşhis ve Ayırıcı Teşhis

Kanatlı mikoplazma etkenleri serolojik, bakteriyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenebilmektedir. Mikroorganizmaların konvansiyonel kültürel yöntemler ile izolasyonu ve teşhisi, mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde altın standarttır (Kleven, 2008a). İzolasyon için alınabilecek numuneler; taze alınmış organ veya dokular, eksudatlar, seyreltilmiş doku homojenizati, sıvıplar, yumurta sarısı ve embriyolar olabilmektedir. Klinik bulgular ve lezyonlar materyal seçiminde önemlidir. Kanatlı mikoplazmalarının laboratuvar teşhisinde Şekil 1.4'te görüldüğü üzere şüpheli materyalden doğrudan etken izolasyonu ve identifikasyonu veya enfekte dokulardan, sıvıplı numunelerinden etkenin DNA'sının tespiti teknikleri kullanılmaktadır. Ayrıca serolojik testler tanı amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (OIE, 2021).



Şekil 1.4. Mikoplazma etkenlerinin tanı yöntemleri (OIE, 2021).

Teşhiste örnek seçimi önemli olup, enfeksiyonun yerleştiği organa göre farklılık göstermektedir. Canlı hayvanlardan orofarinks, özefagus, trakea, göz, kloaka ve fallus sıvıpları alınmalıdır. Ölü hayvanlardan ise akciğer, trakea dokuları, burun boşluğu, infraorbital sinüs, trakea ve hava kesesi sıvıpları alınabileceği gibi infraorbital sinüs ve eklem sıvıları da enjektörle çekilerek örnek alınabilmektedir. Ayrıca kuluçkadan çıkamayan canlı veya ölü embriyolardan vitellin membranı iç yüzeyi, orofarinks ve hava kesesinden örnek alınabilir. Alınan örnekler laboratuvara soğuk zincirde 24-48 saat içerisinde ulaştırılmalıdır ve transport besisi olarak PPLO broth ya da Frey's broth kullanılmalıdır. Numunelerin seri seyreltilmeleri, dokulardaki spesifik antikorların, kullanılan antibiyotiklerin veya inhibe edici maddelerin varlığını azaltarak mikoplazmaların izolasyon şansını arttırmaktadır.

Mikoplazmalar, bakteriyolojik kültürlerde oldukça zor üreyen bakterilerdir ve yaklaşık 3-4 hafta kadar inkübasyon süresine ihtiyaç duymaktadırlar. Mikoplazmaları üretmek için kullanılan besiyerleri protein, maya ekstraktı, glikoz, serum ve bakteriyel inhibitörler içermektedir. Frey tarafından geliştirilen besiyeri dünya çapında yaygın şekilde kullanılmaktadır. İçeriğindeki nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) özellikle Ms izolasyonunda büyüme faktörüdür (OIE, 2021). Ms enfeksiyonun akut döneminde lezyonlardan izole edilebilir ancak; kronik evrede canlı mikroorganizmalar lezyonlu dokularda bulunmayabilir. Üst solunum yollarında ise etken kalıcı olduğu için izolasyon da örnek alımında tercih edilebilir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020). Ms identifikasyonunda üreme inhibisyon testi

(growth inhibition test) ve spesifik problemlerle yapılan PCR testi kullanılmaktadır (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2013a).

Kültür teknikleri fazla iş gücü ve zaman kaybına sebep olabilmekte ayrıca, kronik enfekte ya da antibiyotik tedavisi almış kanatlılarda daha da zor yapılabilir. Kültür teknikleri mikoplazmaların; patojeniteleri, antibiyotik dirençliliği, virulens faktörleri ve suş farklılıkları gibi epidemiyolojik çalışmalarında kullanılmaktadır (Demirbilek ve ark., 2017).

Kanatlı mikoplazmalarının identifikasyonunda biyokimyasal testler (arjinin hidrolizi, glikoz fermentasyonu) spesifik olmayıp, immünolojik yöntemler (Florasan Antikor Testi, İmmunperoksidaz Testi ve Üreme İnhibisyon Testi) ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (OIE, 2021).

Serolojik testler yaygın kullanıldıklarında özgünlük ve duyarlılıkları açısından eksiklikleri olabilmektedir ve sürülerin kontrollerinde kullanılması tavsiye edilmektedir. En yaygın kullanılan testler; Serum Pleyt Aglutinasyon (SPA) Testi, ELISA Testi ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Testi'dir (OIE, 2021). Mikoplazma enfeksiyonlarının sürü bazında ön tanısı için, izolasyon ve identifikasyon yöntemlerine başvurmadan önce serolojik yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Kullanılan serolojik testlerin özgünlüğü ve duyarlılığı düşük olup, yalancı pozitif ve negatif sonuçlar görülebilmektedir (Demirbilek ve ark., 2017).

Synovitis ile karakterize Ms enfeksiyonları ise başlıca synovitis yapan; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pasteurella* ve *Salmonella*'lar ile karışabilmektedir (Ferguson-Noel ve ark., 2013b). Hindilerin hava kesesi yangısı ile karakterize Mm enfeksiyonlarını diğer mikoplazma etkenleri ile ayırt etmek önemli olabilmektedir. Ayrıca Mm kaynaklı iskelet anormalliklerini ise Mi ve diyet kaynaklı olanlarla karıştırmamak gerekmektedir (Chin, 2013).

1.5. Koruma Stratejileri

Mikoplazmalar için en önemli kayıp, enfekte damızlık sürülerden elde edilen yumurtalar ile elde edilen civciv performansı verileridir. Bu sebeple ülkemizde ilk olarak 1989 yılında ‘Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerin Sağlık ve Kontrol Yönetmeliği’ yürürlüğe girmiş ve en son 2014 yılında yapılan değişiklikler ve ilgili yönetmeliğe bağlı 2015 yılında yayımlanan uygulama talimatı kapsamında damızlıkların ve kuluçkahanelerin kontrolleri yapılmaktadır. Bu yönetmelik kapsamında işletmelerden alınan örnekler bağlı bulundukları bölge Enstitülerince *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, Mg, Mm (hindilerde) etkenleri ile toplam bakteri ve mantar yönünden laboratuvarlarda analiz edilir. Ülkemizde damızlık ve kuluçkahanelerden tavuklarda Mg, hindilerde ise Mm kontrolleri için sıvı, civciv, yumurta, kan ve çevresel numuneler alınarak ilgili enstitülerce analizleri yapılmaktadır. Bu kontrollerin altı ayda bir yapılması gerekmektedir. Yapılan analiz sonuçlarında aranan bakteriyel etkenlerin izole edilmesi durumunda, damızlık sürüler kesime, kuluçkahanelerde bulunan yumurtalar ise sofralık kullanım imkanı yoksa imha edilmektedir. 2015 yılından sonra kontrolü yapılan etkenler arasında Ms çıkartılmıştır. Ayrıca ülkemizde damızlık kanatlılarda mikoplazma aşılarının kullanımı yasaktır.

Ülkemize yurtdışından ithal edilen kuluçkalık yumurtalar ile ilgili 01.01.2015 tarihli ‘Devekuşu Cinsi Yumurtalar Dışında Kalan Kuluçkalık Yumurtaların Türkiye Cumhuriyeti’ne Sevkleri İçin Veteriner Sağlık Sertifikası’ gereği yumurtaların elde edildiği sürüler; tavuklar için Mg, hindiler için ise Mg ve Mm yönünden tarama programlarına sokulmuş olmaları, Ms yönünden ise muayene edilmiş ve herhangi bir klinik bulgunun olmama şartları aranmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde Mg’nin kontrolüne 1960’lı yıllarda başlanmış olup Ms ve Mm daha sonraları programa dahil edilmiştir. Mikoplazma kontrol programı ABD’de National Poultry Improvement Plan (NPIP) kapsamında işletmelerin gönüllülük esasına dayalı olarak yürütülmektedir. Bu kapsamda, broyler

damızlık, yumurtacı damızlık, hindi damızlık işletmeleri, ayrıca hobi ve süs kuşları, oyun kuşları, su kuşları işletmelerinde mikoplazma kontrolleri yapılmaktadır.

Kanatlılar için patojen olan tüm mikoplazmalar, vertikal olarak bulaştıkları için öncelikli hedef mikoplazma-ari damızlık stoklar elde etmek olmalıdır. Mikoplazma-ari sürülerin devamlılığının sağlanması için yine ari kaynaklardan temini ve hepsi içeri hepsi dışarı yetiştirme sistemi kullanılmalıdır (Okwara, 2016). Sürüleri mikoplazma etkenlerinden uzak tutmak için etkili biyogüvenlik yöntemleri uygulamaları gerekmektedir. Günümüzde ise küçük coğrafi alanlarda büyük ticari sürülerin bulunması bu yöntemlerin uygulanmasını zorlaştırmaktadır (Kleven, 2008a).

Mikoplazma enfeksiyonlarının önlenmesi için sürekli olarak uygulanan izleme programlarının olması gerekmektedir. Herhangi bir salgın durumunda diğer sürülere bulaşmayı önlemek için erken tespit oldukça önemlidir. Yaşlı damızlık sürülerde döl verimini arttırmak için sürüye genç erkekleri eklemek oldukça riskli bir uygulamadır. Genel olarak ise az sayıda numunenin daha sık izlenmesi, çok sayıda numunenin daha az sıklıkla izlenmesine tercih edilmektedir (Kleven, 2008a).

1.5.1. Tedavi

Antibakteriyel tedavi, klinik belirtilerin ve kayıpların önlenmesine yardımcı olsa da enfeksiyonu sürüden tamamen elemine edemez ve uzun vadeli çözüm değildir. Mikoplazmalar ile enfekte damızlıklarda antimikrobiyaller ile yapılan tedavilerde klinik belirtilerin ve transovaryan bulaşma riskinin azaldığı bildirilmektedir. Ayrıca kuluçkalık yumurtaların antibiyotik çözeltisine daldırılması veya tek tek yumurtaların enjeksiyonu Mg ve Mm'in yumurta geçişini azaltmak veya ortadan kaldırmak için kullanıldığı bildirilmiştir (Kleven, 2008a). Oksitetrasiklin, aminoglikozidler, linkozamidler, florokinolonlar, tylosin ve tiamulin gibi birçok antimikrobiyal ajanın, çeşitli kanatlı mikoplazmalarına karşı etkili oldukları bildirilmiştir. Özellikle son zamanlarda yapılan çalışmalarda mikoplazma ile enfekte tavuklarda tylosinin etkisinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Buna karşın,

tetrasiklin, makrolid ve kinolonlara karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Yumurtaların tylosin gibi antibiyotiklerle daldırma yoluyla tedavisi ve doğrudan yumurtaya inokulasyonu veya kuluçkalık yumurtaların ısıtılma maruz bırakılması gibi yöntemler de yumurta ile bulaşın engellenmesi için kullanılmaktadır (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Ayrıca yoğun antimikrobiyal ilaçlarının kullanımı dirençli Mg ve Ms etkenlerinin gelişmesine yardımcı olmaktadır. Mikoplazmalar diğer bakterilere göre daha yüksek mutasyon oranlarına sahip olduklarından, tylosin ve oksitetrasiklinlere karşı da yakın zamanda özellikle Avrupa'da yoğun kullanımları sonucunda direnç geliştirecekleri düşünülmektedir (Okwara, 2016).

1.5.2. Aşılama

Kanatlı mikoplazma etkenlerinden Mg ve Ms için ülkemizde ve dünyada kullanılan aşılar bulunmaktadır. Mg için inaktif aşılar ve canlı aşılar kullanılmaktadır (Raviv ve Ley, 2013). Ms için ise inaktif bakterin aşıları ticari olarak bulunmaktadır. Ancak bakterin aşıları ile Ms enfeksiyonlarının kontrolü ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır. Canlı Ms aşısı; MS-H Avusturalya saha izolatlarının mutasyonu sonucunda elde edilmiştir. Aşının etkinliği ve güvenilirliği deneysel ve saha çalışmalarıyla kanıtlanmıştır. Aşının $4,8 \times 10^5$ cfu/ml'lik dozunun koruyucu olduğu ve bağışıklığın aşılamadan 3-4 hafta sonra şekillendiği, 40'ıncı haftaya kadar sürdüğü tespit edilmiştir. MS-H, özellikle Ms kaynaklı yumurta kabuk anomalilerine karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Bu aşı geniş kullanım alanı bulmakta ve 3-6 haftalık yaşlarda, diğer viral aşılarla da hiçbir sorun yaşatmaksızın çoğunlukla göze damla şeklinde uygulanmaktadır. MS-H aşısının hindiler için de etkili ve koruyucu olduğu bildirilmiştir (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Ülkemizde Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılmış canlı aşı olarak; Intervet Veteriner İlaçları Paz. ve Tic. Ltd. Şti. (MSD Hayv. Sağ.) tarafından satışa sunulan Nobilis Mg 6/85 ve Nobilis Ms-live aşıları bulunmaktadır. İnaktif Mg aşısı ise; yurtdışından ithal edilen ve Güneşli A.Ş. tarafından satışa sunulan MYC-

VAC isimli yağ emülsifiye aşısıdır (BVKE, 2019). Sahada aşının kullanımı, sürünün genel sağlık durumu ve Mg/Ms antikor titresinin varlığına göre değişkenlik göstermektedir. Mg canlı 6/85 aşısı özellikle sağlıklı yumurtacı sürülerde altı haftalık yaş ve sonrası ile yumurtlama dönemi öncesi dört haftaya kadar kullanımı uygun görülmektedir. Yüksek enfeksiyon riskine göre ise sürülerin durumu ve yaşına göre iki uygulama yapılabilmektedir (Anonim, 2019).

Bu çalışmada, Ege bölgesinde bulunan ticari tavuk ve hindi işletmelerinde Ms varlığının klasik kültürel metot ve *vlhA* genini hedefleyen qPCR yöntemi ile belirlenmesi; hem hastalığın geniş kapsamlı taramasının yapılması hem de teşhis metotlarının karşılaştırılması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

Çalışmada kullanılan örnekler için ‘Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ onayına gerek bulunmadığına ilişkin ‘Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurulu Raporu’ Ek-1’de yer almaktadır.

Tez çalışmasında kullanılan örnekler Ege bölgesinde bulunan İzmir, Aydın, Manisa, Denizli, Uşak, Kütahya ve Afyonkarahisar illerinde yer alan ticari tavuk ve hindi işletmelerinden toplandı. Örneklemede damızlık kümesler, kuluçkahaneler, broyler kümesleri ve ticari yumurtacı kümesler kullanıldı. 2021 yılı Ocak ile Aralık ayları arasında toplanan örnekler Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı’nda çalışıldı. Bu zaman aralığında her kümeden sadece bir kez örnekleme yapıldı.

Damızlık işletmelerin her bir kümesinden 15 adet trakeal ve 15 adet kloakal sıvap örnekleri Frey broth içeren taşıma vasatı içerisinde aynı gün laboratuvara ulaştırılacak şekilde alındı. Bu kapsamda 10 adet yumurtacı damızlık tavuk kümesi ve 211 adet broyler damızlık tavuk kümesi olmak üzere toplam 221 adet damızlık kümesinden 3315 trakeal sıvap ve 3315 kloakal sıvap örnekleri toplandı.

Kuluçkahanelerden yapılan örneklemede işletme başına 10 adet kabukaltı ölmüş civcivlerin akciğer, trakea ve vitellin membran örnekleri toplandı. Bu kapsamda toplam 13 adet tavuk kuluçkahane işletmesinden 130 adet kabukaltı ölmüş tavuk civciv örnekleri ve 2 adet hindi kuluçkahane işletmesinden 20 adet kabukaltı ölmüş hindi palazı örnekleri toplandı.

Broyler tavuk, yumurtacı tavuk ve etlik hindi kümeslerinden iç organ (akciğer, trakea) veya kümes başına 15 adet trakeal sıvap ve 15 adet kloakal sıvap örneği

toplandı. Bu kapsamda, ticari yumurtacı tavuk ve broyler tavuk işletmelerinden 22 kümeden ve etlik hindi işletmelerinden 6 kümeden olmak üzere toplamda 28 kümeden akciğer ve trakea örnekleri toplandı. Ayrıca broyler tavuk ve yumurtacı tavuk işletmelerinden 110 kümes ile 1 adet etlik hindi kümesinden 1665 trakeal sıvap ve 1665 kloakal sıvap örnekleri toplandı.

Tüm yetiştirme grupları dahil edildiğinde toplamda; 332 kümeden 9960 sıvap, 28 kümeden iç organ (akciğer, trakea) numunesi ve 15 kuluçkahaneden 150 adet kabukaltı ölmüş civciv örneği toplandı. Taşıma vasatı olarak Frey's Broth kullanılmış olup örnekler soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Tez çalışmasında her kümeden toplanan örnekler havuzlanarak (her örnek tipi kendi içerisinde) bir örnek olarak değerlendirildi. Buna göre örnekleme yapılan iller ile yetiştirme tiplerine göre kümes/işletme sayıları Çizelge 2.1 ve 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Kuluçkahane ve damızlık kümeslerden toplanan numunelerin illere göre dağılımı.

	İzmir	Manisa	Uşak	Toplam
Broyler Damızlık Kümesi	146	35	30	211
Yumurtacı Damızlık Kümesi	0	10	0	10
Tavuk Kuluçkahane İşletmesi	9	3	1	13
Hindi Kuluçkahane İşletmesi	1	1	0	2
Toplam	156	49	31	236

Çizelge 2.2. Ticari tavuk ve hindi kümeslerinden toplanan numunelerin illere göre dağılımı.

	Broyler Tavuk Kümesi	Yumurtacı Tavuk Kümesi	Etlik Hindi Kümesi	Toplam
İzmir	16	4	2	22
Manisa	28	17	4	49
Aydın	4	5	0	9
Denizli	2	2	0	4
Uşak	8	0	0	8
Kütahya	0	6	1	7
Afyonkarahisar	4	36	0	40
Toplam	62	70	7	139

2.1.2. İzolasyonda Kullanılan Besiyeri

Tez çalışmasında Ms izolasyonu için Modifiye Frey besiyeri kullanılmış olup, besiyeri içeriği Çizelge 2.3’de gösterilmiştir. Frey besiyeri hem sıvı hem de katı olarak hazırlandı. Distile su, Frey Mycoplasma Broth Base (Sigma-Aldrich, Katolog no: 102243060), glikoz ve fenol kırmızısı karıştırılıp, pH 7,6-7,8 olacak şekilde ayarlandı ve 121°C’de 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi. Katı besiyeri ise bu karışıma bakteriyolojik agar ilave edilerek hazırlandı. Daha sonra bu karışım 50°C’ye soğutularak içerisine, domuz serumu, talyum asetat, penisilin, β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β -NAD), Sistein ve MEM vitamin solüsyonu ilave edildi. Hazırlanan sıvı besiyeri steril falkon tüplere 10 ml koyularak porsiyonlandı. Katı besiyeri ise steril petrilere dökülerek +4°C’de muhafaza edildi (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Çizelge 2.3. Modifiye Frey besiyeri içeriği (Ferguson-Noel ve Noormohammadi, 2020).

Frey Mycoplasma broth base (BBL)	22,5 g
Glikoz	3 g
Domuz Serumu	120 ml
β -NAD	0,1 g
DL Cysteine hydrochloride	0,1 g
Fhenol red (%1)	2,5 ml
Thallium acetate (%10)	5 ml
Penicillin G	1.000.000 IU
MEM Vitamin Solution	0,25 g
Distile Su	1000 ml
Bakteriyolojik Agar (Katı besiyeri için)	10 g

2.1.3. Kullanılan Referans Suş

Tez çalışmasında pozitif kontrol olarak kullanılan, *Mycoplasma synoviae* WVU1853 suşu, OIE tarafından 2019 yılında Kanatlı Mycoplasmozisi (Mg, Ms) konusunda yetkilendirilen ve ayrıca Mycoplasma Ulusal Referans Laboratuvarı olan; Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarı’ndan temin edildi.

2.1.4. Moleküler Teşhis

Tez çalışmasında moleküler yöntem hem teşhis hem de doğrulama amacıyla kullanıldı. DNA ekstraksiyonu örnek miktarına göre hem manuel olarak hem de gerek duyulduğunda Magna Pure LC (Roche, Almanya) ekstraksiyon robotu ile yapıldı.

DNA ekstraksiyonu, manuel olarak High Pure PCR Template (Roche, Katolog no: 11796828001) DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yapıldı. Ekstraksiyon robotu için Magna Pure LC Total Nucleic Acid (Roche, Katolog no: 03038505001) izolasyon kiti kullanıldı.

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR) analizleri Ehtisham-Ul-Haque ve ark. (2015), tarafından geliştirilen yöntem ile Çizelge 2.4'te bulunan primerler ve MGB (Minor Groove Binder) probu kullanılarak yapıldı. Bu yöntem *Ms* teşhisi için kullanılan PCR yöntemlerine göre daha gelişmiş ve basitleştirilmiş ve pratik bir yöntem olduğu için tercih edildi. Primerlerin çoğalttığı DNA bölgesinin uzunluğu 373 bp olup, *Ms*'in hemaglutinin ile ilgili olan MSPA adlı yüzey proteinini kodlayan *vlhA* geni hedeflendi. Bu primerler ve TaqMan® probu nükleotid dizileri NCBI veri tabanından BLAST aranması sonucunda *Ms* izolatlarının birçoğu ile anlamlı diziler oluşturduğu, diğer mikoplazmalar ile benzer sıralamaların olmadığı görüldü.

Çizelge 2.4. Primerler ve TaqMan® probunun genel özellikleri.

Etken	Hedef Gen	Oligonükleotid Dizilimi (5'-3')	Tm
<i>M. synoviae</i>	<i>vlhA</i> -F	CCC AGG AGG TGG TAC AGT TGA C	59°C
	<i>vlhA</i> -R	CAT CAA TAG CGG TTT TAG CTT CTG	58°C
	<i>vlhA</i> -prob	FAM-CTG TAG AGG CTG CTA AA-MGB/NFQ	69°C

qPCR analizi Light Cycler 480 II (Roche, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. qPCR reaksiyon karışımı LightCycler Probes Master Kit (Roche, Katolog no: 0470749401) içeriği kullanılarak hazırlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

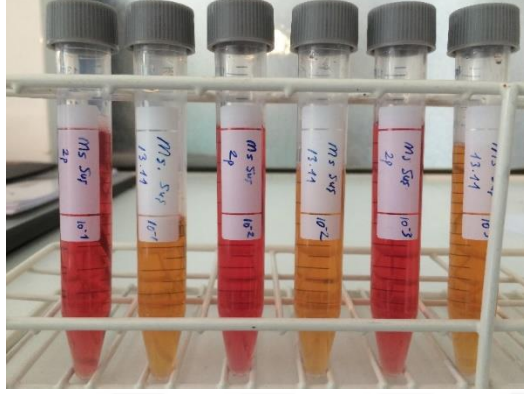
Laboratuvara ulaştırılan trakeal ve kloakal sıvaplar aynı gün içerisinde bakteri izolasyonu ve moleküler analizler için hazırlandı. Trakeal sıvaplar bir tüpe ve kloakal sıvaplar ayrı bir tüpe olacak şekilde Frey broth içeren falkon tüplerine koyuldu. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra mikoplazma izolasyonu için, trakeal sıvap içeren falkon tüpünden 0,5 ml ve kloakal sıvap içeren falkon tüpünden 0,5 ml olacak şekilde toplam 1 ml sıvı kısım alınarak ekim yapıldı. DNA ekstraksiyonu için ise her iki tüpten toplam 200 µl sıvı kısım alınarak -20°C’de saklandı.

Kuluçkahane işletmelerinden laboratuvara getirilen kabukaltı ölmüş civcivlerin vitellin membran, akciğer ve trakeaları ile broyler ve yumurtacı kümeslerden toplanan akciğer ve trakea örnekleri doku homojenizatörü (MagnaLyser, Roche) yardımıyla homojenize edildi. Elde edilen homojenizatın 1 ml’si Frey brotha ekim için alındı, 200 µl’si ise DNA ekstraksiyonu için alınarak -20°C’de saklandı.

2.2.2. Bakteriyel Kültür

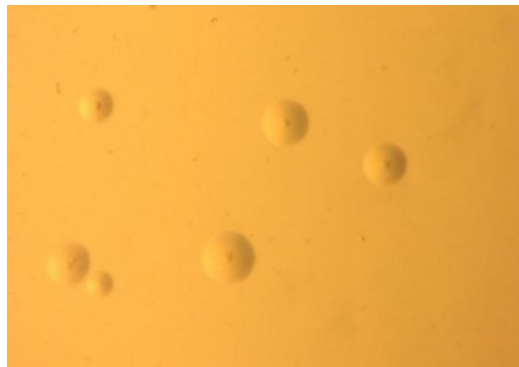
Homojenize edilen dokular ve sıvaplardan yapılan santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar direkt Frey broth içerisine %10 oranında ekildi. Daha sonra ekim yapılan broth içerisinden 1 ml alınarak 9 ml Frey broth içeren falkon tüpe aktarıldı. Buradan da bir başka 9 ml Frey broth içeren tüpe 1 ml aktararak örneğin 10^{-3} ’e kadar 10 katlı seri dilüsyonları yapıldı. Örnekler 37°C’de %5-10 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakıldı. İlk 24 saatlik inkübasyon sonucunda besiyerleri bakteriyel kontaminasyon olup olmadığı yönünden kontrol edildi. Besiyerlerinde bulanıklık görülmesi durumunda sıvı kültürler 0,45 µm’lik filtreden geçirilip Frey broth içerisine pasajlanarak inkübasyona devam edildi. Sıvı kültürler Şekil 2.2’de görüldüğü gibi her gün üremenin kanıtı olan renk değişimi (kırmızıdan turuncu-sarıya doğru) yönünden kontrol edildi. Renk değişimi görüldüğünde sıvı besiyerinden katı besiyerine pasajlanarak 37°C’de %5-10 CO₂’li etüvde inkübasyona

bırakıldı. Sıvı kültürlerde herhangi bir renk değişimi görülmediği durumlarda ise, sıvı besiyerlerine 7 gün arayla 3 kez kör pasaj yapılarak takibi yapıldı.



Şekil 2.2. Ekim yapılmamış Frey broth (kırmızı) ve Ms üreyen Frey broth (turuncu-sarı).

Katı kültürler üremeler yönünden her gün stereo mikroskop ile incelenerek Şekil 2.3'teki gibi tipik, sahanda yumurta görünümüne sahip Mikoplazma kolonileri arandı. Üremelerin tespit edildiği agarın koloni içeren kısımları blok şeklinde çıkarılarak hem sıvı hem de katı besiyerine subkültürü yapıldı. Öze yardımıyla çıkarılan agar bloğu sıvı besiyeri içerisine doğrudan koyularak, katı besiyerine ise agar bloğun koloni içeren yüzü ters çevrilip üst kısmı aşağıda olacak şekilde yeni agar yüzeyine doğrudan sürülerek subkültüre edildi. Agar yüzeyinde üremenin görülmediği 21'inci günde örnekler negatif olarak değerlendirildi. Üremenin tespit edildiği besiyerlerinden alınan kolonilere ise qPCR testi yapılarak üreyen koloninin Ms olup olmadığı doğrulandı.



Şekil 2.3. Frey agarda üretilen Ms WVU1853 suşu.

2.2.3. Moleküler Teşhis

2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Kümeslerden toplanan sıvap ve iç organ örnekleri havuz yapılarak o kümesi temsil edecek şekilde numaralandırıldı. Homojenize edilen doku ve sıvap örneklerinden elde edilen süpernatantlardan DNA ekstraksiyonu için 200 µl alınarak nükleaz-free Ependorf tüplere koyuldu.

Ms izolasyonu sonucunda üremenin görüldüğü agardan çıkarılan koloniler 1 ml Frey broth içeren tüplere koyuldu. Tüp içerisine alınan, koloni içeren agar steril öze yardımıyla Frey broth içerisinde homojenize edildi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Elde edilen homojenizattan 200 µl alınarak nükleaz-free tüplere koyuldu. Üretici firma talimatları doğrultusunda DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

Ekstraksiyon sonucunda elde edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonları spektrofotometre (NanoDrop) ile ölçüldü. Ölçülen DNA miktarları 50 ng/5µl olacak şekilde seyreltildi ve PCR yapılana kadar -20°C'de saklandı.

2.2.3.2. qPCR Analizi

qPCR işlemi total hacim 20 µl olacak şekilde 5 µl DNA, 1 µl ileri ve 1 µl geri primerleri, 0,4 µl prob ve 10 µl prob mastermiks (2x konsantrasyonlu) oranları ile gerçekleştirildi (Çizelge 2.5).

qPCR amplifikasyon koşulları; 95°C'de 10 dk ön denatürasyon sonrası 40 döngü boyunca 95°C'de 10 sn, 58°C bağlanma sıcaklığında 30 sn ve 72°C'de 1 sn tutularak gerçekleştirildi (Çizelge 2.6).

qPCR'ın tüm aşamalarında pozitif kontrol olarak Ms WVU1853 suşu ve negatif kontrol olarak ise moleküler ölçekli distile su kullanıldı.

Çizelge 2.5. qPCR yöntemi için hazırlanan reaksiyon karışımı ve hacimleri.

Karışım	Hacim (µl)
2x Probe Master Mix	10 µl
İleri Primer (0,5 µm)	1 µl
Geri Primer (0,5 µm)	1 µl
Prob (0,2 µm)	0,4 µl
Su	2,6 µl
DNA	5 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 2.6. qPCR reaksiyonunun ısı, zaman ve döngü süreleri.

Evre	Isı (°C)	Zaman	Siklus
Ön denaturasyon	95	10 dk	1
Denaturasyon	95	10 sn	35
Bağlanma	58	30 sn	
Uzama	72	1 sn	
Soğuma	40	30 sn	1

qPCR testinde, her döngü sonunda oluşan çoğalma eğrisi eş zamanlı olarak izlenerek, pozitif örnekler hem pozitif hem de negatif kontroller ile karşılaştırılarak Cq (Quantification Cycle) değerleri kaydedildi. Cq değerlerine ilişkin cut-off (limit) değeri Ehtisham-Ul-Haque ve ark. (2015), tarafından yapılan çalışmada belirlenen 36,46 olarak belirlenen değer baz alındı. Bu değer üzerinde Cq değeri veren örnekler negatif olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Bakteriyel Kültür Bulguları

Tez çalışmasında örnek toplanan toplam 375 kümese ait örneklerden yapılan Ms izolasyonu sonucunda 26 (%6,9) kümeden Ms izole edildi. Yetiştirme tiplerine göre Ms izole edilen kümes sayısı ve oranları Çizelge 3.1’de sunulmaktadır. 332 kümese ait trakeal ve kloakal sıvı örneklerinin 24 (%7,2)’ünden, 28 kümese ait akciğer/trakea örneklerinin 2 (%7,1)’sinden Ms izole edilmiş olup, 15 kuluçkahaneden alınan kabukaltı ölmüş civcivlerin vitellin membran, akciğer ve trakea örneklerinden Ms izole edilmedi.

Çizelge 3.1. Ms izolasyonu sonuçları.

	Kümes Sayısı	Ms İzole Edilen Kümes Sayısı	Ms İzole Edilen Kümes Oranları (%)
Broyler Damızlık Kümesi	211	9	4,3
Yumurtacı Damızlık Kümesi	10	2	20
Tavuk Kuluçkahane İşletmesi	13	0	0
Hindi Kuluçkahane İşletmesi	2	0	0
Broyler Tavuk Kümesi	62	4	6,4
Yumurtacı Tavuk Kümesi	70	11	15,7
Etlük Hindi Kümesi	7	0	0
Toplam	375	26	6,9

3.2. Moleküler Teşhis Bulguları

Yapılan qPCR test çalışmaları sonucunda çalışılan 375 örneğin 122 (%32,5)’si Ms yönünden pozitif bulundu. Yetiştirme tiplerine göre qPCR ile Ms tespit edilen kümes sayısı ve pozitif örneklerin oranı Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. 332 kümese ait trakeal ve kloakal sıvı örneklerinden 113 (%34)’ü, 28 kümese ait akciğer/trakea örneklerinden 8 (%28,6)’i Ms yönünden pozitif bulundu. Ayrıca 15 kuluçkahane işletmesinden alınan kabukaltı ölmüş civcivlerin vitellin membran, akciğer ve trakea örneklerinden yapılan gerçek zamanlı qPCR sonucunda 1 (%6,7) örnek Ms pozitif bulundu.

Çizelge 3.2. qPCR test sonuçları.

	Kümes Sayısı	Ms Pozitif Kümes Sayısı	Ms Pozitif Kümes Oranları (%)
Broyler Damızlık Kümesi	211	55	26,1
Yumurtacı Damızlık Kümesi	10	6	60
Tavuk Kuluçkahane İşletmesi	13	1	7,7
Hindi Kuluçkahane İşletmesi	2	0	0
Broyler Tavuk Kümesi	62	8	12,9
Yumurtacı Tavuk Kümesi	70	52	74,2
Etlük Hindi Kümesi	7	0	0
Toplam	375	122	32,5

Çalışmada Ege bölgesinde bulunan İzmir, Aydın, Manisa, Denizli, Uşak, Kütahya ve Afyonkarahisar illerinden toplam 375 kümeisten alınan örnekler direkt qPCR testi ile çalışılmış olup, illere göre gelen numune sayıları ve Ms pozitif kümes sayıları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. İllere göre Ms pozitif kümes sayısının alınan örnek sayısına oranı.

4. TARTIŞMA

Ms, tavuk ve hindilerde üst solunum yolu enfeksiyonlarına ve İnfeksiyöz Synovitis'e neden olmaktadır. Özellikle yumurtacı sürülerde Ms yumurta verimi ve kabuk kalitesini etkilemektedir. Damızlık kümeslerde ise subklinik enfeksiyon şeklinde görülür ve zamanla yumurta veriminde, kuluçka randımanında düşüş ve civciv ölümlerine neden olmaktadır (Çarlı, 2018). Broyler kümeslerinde ise özellikle yetiştirmenin üçüncü haftasından sonra başlayan canlı ağırlık kayıpları ve komplike durumlarda mortalite artışları görülmektedir (Akan, 2008).

Ms enfeksiyonları kanatlı sektörü tarafından yeterince önem verilmeyerek özellikle Mg enfeksiyonlarının gölgesinde kalmış ve işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaya devam etmiştir (Çarlı, 2018). Kanatlı mikoplazmalarının kontrolünde dünya genelinde önerilen sistemlerde ortak amaç; enfeksiyonu büyük ebeveyn (Grand Parent, GP) düzeyinde eradike ederek, ebeveyn (Parent, P) düzeyinde ise biyogüvenlik önlemleriyle hastalıktan arı sürüleri koruma olmalıdır (Gökçelik, 2008).

Bu tez çalışmasında, Ege bölgesinde bulunan tavuk ve hindi ticari işletmelerinden toplanan örneklerde Ms'in bölgedeki güncel durumunun ortaya konulması hedeflendi. Bu kapsamda İzmir, Manisa, Uşak ve Aydın illerinde faaliyet gösteren toplam 347 broyler ve yumurtacı tavuk damızlık kümeslerinin 221 adedinden örnekleme yapıldı. Ayrıca Ege bölgesinde bulunan 13 adet tavuk kuluçkahane ve 2 adet hindi kuluçkahane işletmelerinin tamamından örnekleme yapıldı. Bununla birlikte yine Ege bölgesinde yer alan 70 ticari yumurtacı tavuk, 62 broyler tavuk ve 7 etlik hindi işletmesinden olmak üzere toplamda 139 kümeden örnekleme yapıldı.

Bu çalışmada, örnekleme yapılan 211 broyler damızlık tavuk kümesinden 55 (%26,1)'i, 10 yumurtacı damızlık tavuk kümesinden ise 6 (%60)'sı qPCR ile Ms pozitif bulundu. Türkiye'de yapılan benzer çalışmalarda ise; Akan ve ark. (2008)

moleküler ve serolojik yöntemlerle yaptığı bir çalışmada, 43 broyler damızlık kümesinden 9 (%20,9)'unu Ms, 7 (%16,3)'sini Mg yönünden pozitif olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bu çalışmada, Türkiye'deki damızlıklarda Ms'in Mg'ye göre daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir. Dakman ve ark. (2009) ise, 37 adet broyler ve yumurtacı damızlık kümeden serolojik ve moleküler yöntemlerle 3 (%8,1)'ünden Ms teşhis ettiklerini bildirmişlerdir. 2015 yılında Kahya ve ark., 32 damızlık kümeden topladıkları 187 örneği Ms yönünden PCR ile incelenmiş ve bu kümeslerden 13 (%6,9)'ünü pozitif tespit ettiklerini raporlamıştır. Diğer ülkelerden, Hollanda'da 2008 yılında yapılan bir çalışmada ise, 148 broyler damızlık kümesinde %35, 40 yumurtacı damızlık kümesinde %25 oranında Ms sero-prevalansı tespit edilmiştir (Feberwee ve ark., 2008). İran'da 2002-2008 yılları arasında 350 broyler damızlık kümesinde yapılan çalışmada 60 hafta ve üstü yaştaki tavuklarda %47,8 oranında, 10-20 haftalık yaştaki tavuklarda ise %14,2 oranında Ms pozitifliği tespit edilmiştir (Seifi ve Shirzad, 2012). Portekiz'de 2008-2012 yılları arasında yapılan bir başka epidemiyolojik çalışmada ise, 36 adet aşısız broyler damızlık küme 24 (%66,7) kümes hem ELISA hem de PCR sonucuna göre pozitif bulunmuştur (Moreira ve ark., 2015). İspanya'da 2021 yılında broyler damızlık kümeslerinde yapılan bir çalışmada ELISA ile %74, PCR testi ile %35 oranında prevalans tespit edilmiştir (Cortes ve ark., 2021). Yapılan çalışmalar Ms'in damızlık kümeslerdeki prevalansının önemli düzeyde olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında elde edilen veriler özellikle Avrupa'da yapılan çalışmalardaki bulgularla örtüşmektedir. Ülkemizdeki damızlıklarda yapılan diğer çalışmalarda (Dakman ve ark., 2009 ve Kahya ve ark., 2015) ise Ms varlığı oranlarının daha düşük kaldığı görülmüş olup, sebebinin çalışmalarda kullanılan moleküler teşhis yöntemlerinin farklılıklarından olabileceği ya da bu oranın yıllar içerisinde uygulanan kontrol programlarındaki değişikliklerden ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca ülkemizde damızlıklar ile ilgili sürekli serolojik izlemelerin ve daha kapsamlı çalışmaların da yapılmasının fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, Ege bölgesinde faaliyet gösteren 13 adet tavuk kuluçkahanesinden alınan örneklerden 1 (%7,7)'inde Ms teşhis edilmiş olup, hindi kuluçkahanelerinden ise pozitiflik saptanmadı. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez

tavuk kuluçkahane numunesinden Ms teşhisi yapılmış oldu. Tavuk ve hindi kuluçkahanelerinden alınan civciv ve embriyolu yumurtalardan Ms taranması ile ilgili Türkiye’de yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Dünya’da yapılan bazı çalışmalarda ise bu tez çalışmasında elde edilen bulgular ile benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Çin’de 2017 yılında yapılan bir çalışmada; toplam 1332 adet embriyolu tavuk yumurtasına yapılan PCR sonucunda 217 adedi (%16,29) Ms pozitif tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2017). Mısır’da yapılan bir başka çalışmada; kuluçkahanede çıkımı gerçekleşen 46 adet, bir günlük civcivlerin sarı keselerinden yapılan PCR testi sonucunda 4’ü (%8,7); 20 adet döller yumurtadan ise 3 (%15)’ü Ms pozitif tespit edilmiştir (Marouf ve ark., 2020). Bu oranlar tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermekte ve damızlık kümes ve kuluçkahanelerdeki Ms varlığının önemli düzeyde olduğu görülmektedir. Ms, vertikal yolla bulaşabildiğinden enfekte sürülerden elde edilen döller yumurtaların embriolarından ve bir günlük civcivlerden etken teşhisi yapılabilmektedir (Cobb, 2011). Bu sebeple 1989 yılında yürürlüğe giren ve en son 2014 yılında yenilenen ‘Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği’ ve bu yönetmeliğe bağlı 2015 yılında yayınlanan uygulama talimatı ile damızlık ve kuluçkahanelerin kontrolleri yapılmaktadır. Ancak bu son revizyonla daha önceden kontrolü yapılan Ms kapsam dışı bırakılmıştır (Anonim, 2014). ABD’de uygulanan NPIP kapsamında gönüllü damızlık ve kuluçkahane işletmelerinde Ms kontrolleri yapılmaktadır (Anonim, 2019). Ülkemizde ise ithal edilen kuluçkalık yumurtaların sevklerinde Mg, Mm ve Ms yönünden analizlerinin yapılması istenmektedir (Anonim, 2015). Bu tez çalışmasında elde edilen yüksek oranlar (Yumurtacı damızlıklarda %60, broyler damızlıklarda %26,1 ve kuluçkahanelerde %9,1) bu kümeslerin periyodik ve rutin izlemelerinin yapılmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, örnekleme yapılan 70 adet ticari yumurtacı kümesin 52 (%74,2)’si ile 62 broyler tavuk kümesinin 8 (%12,9)’i Ms pozitif bulundu. Türkiye’de ve dünyada broyler ve yumurtacı kümeslerde yapılan çalışmalarda yumurtacı sürülerde Ms pozitifliğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile uyumlu bulundu. Ülkemizde yapılan çalışmalarda; 2014 yılında Konya’da ticari yumurtacı 20 kümeden toplanan

örneklerden yapılan kültür ve PCR sonucunda 5 (%25) kümes Ms pozitif tespit edilmiştir (Aras ve Sayın, 2014). 2015 yılında yapılan bir tez çalışmasında İzmir, Aydın, Manisa ve Denizli illerindeki broyler kümeslerinden 700 kan serumunun 422 (%60,2)'si ve yumurtacı kümeslerden toplanan 360 kan serumunun 298 (%82,7)'i Ms yönünden pozitif bulunmuştur (Özgün, 2015). Dünya'da yapılan benzer hedefli çalışmalarda ise: 2005-2006 arasında Hollanda'da Feberwee ve ark. (2008)'nin ticari yumurtacı ve broyler tavuk kümeslerinden alınan kan serumu örnekleri SPA yöntemiyle analiz edilmiş ve 185 broyler kümesinde %13, 173 ticari yumurtacı kümesinde ise %73 Ms sero-prevalansı tespit edilmiştir. Yumurtacı sürülerde Ms prevalansının daha yüksek olmasının temel nedenleri, çok katlı kafes sistemi ile yetiştirme ve düşük biyogüvenlik önlemleri olduğu bildirilmiştir (Feberwee ve ark., 2008). Polonya'da Kursa ve ark. (2019), tarafından ticari yumurtacı kümeslerde yapılan bir çalışmada, 903 kümeden 265 (%29)'i qPCR testi ile Ms pozitif tespit edilmiş olup bu çalışmada; Ms'in ticari yumurtacılarındaki prevalansının yüksek olması Avrupa kıtasındaki diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla da benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin; Almanya'da %75 (Kohn ve ark., 2009), Fransa'da %68 (Dufour-Gesbert ve ark., 2006), İngiltere'de %78,6 (Hagan ve ark., 2004) ve Portekiz'de %66,7 (Moreira ve ark., 2015) oranında yumurtacı işletmelerde Ms prevalansı tespit edildiği bildirilmiştir. Polonya'da ise Ms prevalansının (%29) bu ülkelerdekine göre daha düşük olması, çiftliklerdeki biyogüvenlik önlemlerinin daha sıkı kontrol altında tutulmasından dolayı olabileceği bildirilmiştir (Kursa ve ark., 2019). İspanya'da 2021 yılında yapılan bir çalışmada 19 ticari yumurtacı kümesin Ms sero-prevalansı ELISA ile %95, prevalansı ise PCR testiyle %95 olarak tespit edilmiştir (Cortes ve ark., 2021). Bu verilere göre özellikle ticari yumurtacı sürülerde Ms'in daha yaygın görüldüğü sonucu bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Broyler sürülerinin daha kısa ömürlü olması ve biyogüvenlik uygulamalarının daha sıkı kontrol edilmesinden dolayı Ms'in broyler sürülerinde görülme oranının daha düşük olduğu düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında da görüldüğü üzere özellikle yumurtacı kümeslerde yüksek oranda Ms varlığı beraberinde önemli yumurta problemlerini de getireceği için sürülerin Ms yönünden koruma ve kontrollerinin sürekli yapılması önemlidir.

Bu tez çalışmasında 7 adet etlik hindi kümeslerinin hiçbirinde Ms varlığı belirlenmedi. Hindi kümeslerinde Ms varlığı ile ilgili Türkiye’de çalışma bulunmamakta, Dünya’da ise sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Mısır’da 2020 yılında yapılan çalışmada, toplam 22 hindi kümesinden izolasyon ve PCR yöntemiyle 1 (%4,5)’i Ms pozitif tespit edilmiştir (Marouf ve ark., 2020). Ayrıca Feberwee ve ark.’nın 2008 yılında yaptığı çalışmada, 50 adet etlik hindi kümesinden %16 oranında Ms sero-prevalansı tespit edilmiştir. Hindilerdeki Ms sero-prevalansının düşük olmasının, bu hayvan türünde Ms’e karşı oluşan immun yanıtın daha düşük olması sebebiyle olduğu ve hindilerde etken izolasyonu ve PCR testinin serolojik analizlere göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Feberwee ve ark., 2008). Hindi sürülerinde Ms varlığının düşük bulunmasının sebebi, örneklem sayısının az olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Hindi yetiştiriciliğinin yoğun olduğu bölgelerde kapsamlı çalışmalar yapılması Ms varlığı hakkında daha fazla bilgi edinmemizi sağlayacaktır.

Mg ve Ms konfirmasyonunda klasik kültürel metotla etken izolasyonu ve PCR yöntemleri kullanılmaktadır. Etkenin kültürel yöntemler ile izolasyonu altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, Mg ve Ms’in izole edilemediği örnekler olduğu bildirilmiştir (Levisohn ve Kleven, 2000). OIE tarafından 2021 yılında yayınlanan el kitabında Mg ve Ms’in varlığının besiyerinde izole edilerek ya da etkeninin DNA’sını doğrudan tespit ederek konfirme edilebileceği bildirilmiştir. Ayrıca Mg ve Ms enfeksiyonlarının prevalans veya sürveyans çalışmalarında da tavsiye edilen etken teşhis metodunun qPCR olduğu OIE tarafından bildirilmiştir. Bu tür çalışmalar için ayrıca konvansiyonel PCR, ELISA, HI ve SPA testleri sınırlı düzeyde önerilmekte, izolasyon yöntemi ise tavsiye edilmemektedir (OIE, 2021). Bu doğrultuda Türkiye’de ve Dünya’da yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir. 2008 yılında Konya ilinde bulunan yumurtacı kümeslerden toplanan 73 tavuğa ait sıvap örneklerinden yapılan bakteriyel izolasyon sonucunda Ms üretilemezken, PCR testi sonucunda 3 örnek Ms pozitif saptanmıştır (Gürbüz, 2008). Yılmaz ve ark. tarafından 2011 yılında; 93 Ms seropozitif broyler tavuktan aldıkları akciğer, trakea ve hava kesesi örneklerine immunohistokimyasal (IHC) teknik, PCR ve izolasyon yöntemleriyle analiz edilmiş, sonucunda ise sırasıyla IHC ile 16 pozitif,

PCR ile 14 pozitif ve kültür ile de 12'sini pozitif olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Salisch ve ark. 1998 yılında yaptığı bir çalışmada; Ms seropozitif tavuklardan topladıkları sıvap, akciğer, trakea ve hava kesesi örneklerinden hem kültür hem de PCR analizleri sonucunda PCR ile %30,3 oranında, izolasyon sonucunda ise %2,6 oranında Ms pozitifliği saptamışlardır. Brezilya'da 2003 yılında yapılan deneysel bir çalışmada 3 farklı kümesin her birinden farklı haftalık yaşlarında alınan kan serumu ve trakeal sıvap örnekleri; izolasyon, PCR, SPA ve HI testler ile analiz edilmiştir. Bu çalışma ile test metotları karşılaştırılmış olup; en duyarlı ve sürülerde en erken yaşta teşhisi yapabilen testin PCR olduğu bildirilmiştir. 6-8 haftalık yaşta etkene maruz bırakılan kümeslerden klasik kültürel metotla Ms, en erken 27-28 haftalık yaşlarda izole edilmiş olup, PCR ile bu sürülerden 11 haftalık yaşlarda etken teşhisi yapıldığı bildirilmiştir. Aynı hayvanlardan alınan kan serumu örneklerinden yapılan serolojik testlerde 32'nci haftalarda pozitiflik saptanmıştır. Bu bulgu; yaygın şekilde kullanılan serolojik analizler sonucu pozitiflik tespit edilen kümeslerden izolasyona gidilmesi yöntemini desteklemektedir. Ayrıca kümeslerden alınan 10 sıvap örneğinden yapılan PCR testi sonucunda 10 örnekte Ms pozitif bulunurken, aynı sıvaplardan 6'sından Ms izole edildiği bildirilmiştir (Fiorentin ve ark., 2003). Kanatlı mikoplazma etkenlerinden Mg ve Ms'in izolasyonu ve PCR testi ile tespitinin karşılaştırılması amacıyla Pakistan'da yapılan bir çalışmada; broyler, yumurtacı ve damızlık kümeslerden toplam 181 adet örnek çalışılmış olup bu örneklerden PCR ile 35'i Mg, 72'si Ms, kültür yöntemiyle 26'sı Mg, 45'i Ms olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre PCR'ın izolasyon yöntemine göre daha duyarlı olduğu ve Mg'nin daha kolay izole edilebildiği bildirilmiştir. Ayrıca Ms'in Mg'ye göre daha yaygın görüldüğü tespit edilmiştir. İzolasyon yapılacak numunenin alınması, taşınması ve saklanması izolasyon şansını etkilerken, PCR'da ölen bakterilerin DNA'sının da saptanabilmesi sebebiyle bu koşulların daha az önemli olduğu bildirilmiştir (Muhammed ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında örnekleme yapılan toplam 375 kümeden bakteriyel kültür sonucunda 26 (%6,9) Ms suşu izole edilirken qPCR testi ile 375 örnekten 122 (%32,5)'sinde Ms varlığı belirlendi. Yapılan diğer metot karşılaştırma çalışmaları sonuçlarının da tez çalışmasında elde edilen bulgular ile uyumlu olduğu anlaşıldı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması sonucunda Ege bölgesinde bulunan ticari kanatlı işletmelerinde Ms varlığı güncel verilerle ortaya konulmuştur. Bulgular Ms'in ticari işletmelerde göz ardı edilemeyecek kadar yaygın olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte Ms, bilindiği gibi izolasyonu zor, yavaş üreyen ve özel üretme faktörlerine ihtiyaç duyan bir etkindir. Yapılan bu çalışma ile Ms'in teşhisinde kullanılan klasik kültürel yöntem ile qPCR yönteminin karşılaştırması da yapılarak qPCR yönteminin kültür yöntemine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Kanatlı sektörünün en önemli sorunlarından olan solunum sistemi problemleri, başta damızlıkları, kuluçkahane çıkım performanslarını ve devamında sahayı direkt etkileyerek önemli ölçüde ekonomik sıkıntılar yaratmaktadır. Özellikle mikoplazma etkenleriyle mücadele de koruyucu hekimliği ön planda tutarak etkenlerin bulaşma yollarını önlemek gerekmektedir. Bu sebeple kanatlı mikoplazma enfeksiyonlarının epidemiyolojilerinin anlaşılması için günümüz teknolojileri de kullanılarak gerek bölgesel gerek ülke çapında yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalarla sektörün taleplerine cevap verecek verilerin değerlendirilerek sunulmasına ihtiyaç vardır. Bu kapsamda, Ms ile ilgili moleküler epidemiyolojik çalışmalar yapılarak sahada sirküle dominant suşun genomik yapısı ortaya konulabilir.

ÖZET

Ege Bölgesinde Bulunan Ticari Kanatlı İşletmelerinde *Mycoplasma synoviae* Varlığının Araştırılması

Mycoplasma synoviae (Ms) kanatlı endüstrisinde dünya çapında büyük ekonomik kayıplara neden olan önemli bir hastalıktır. Tavuk ve hindilerin eklemlerinde, solunum yollarında ve yumurta kanallarında hastalığa neden olur. OIE listesinde yer alan Ms'in ülkemizdeki prevalansı hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Ege bölgesinde faaliyet gösteren 375 ticari kanatlı işletmesinden örnekleme yapıldı. Örnekler Ms yönünden *vlhA* geni hedefli qPCR testi ve konvansiyonel kültürel yöntem ile değerlendirildi. qPCR sonucunda, analizi yapılan 211 broyler damızlık kümesinden 55 (%26,1)'i, 10 yumurtacı damızlık kümesinden 6 (%60)'sı, 15 kuluçkahane işletmesinden 1 (%6,7)'i, 62 broyler tavuk kümesinden 8 (%12,9)'i ve 70 yumurtacı tavuk kümesinden 52 (%74,2)'si Ms pozitif bulundu, 7 etlik hindi kümesinden ise Ms saptanmadı. Toplam 375 örneğin 122 (%32,5)'si qPCR ile pozitif bulunurken; 26 (%6,9)'sından Ms izole edildi. Çalışmanın sonucunda Ege bölgesindeki kanatlı işletmelerinde Ms'in yaygın olarak bulunduğu ve Ms'in teşhisinde qPCR'in daha etkili bir yöntem olduğu gösterildi.

Anahtar Sözcükler: Broyler tavuk, Hindi, *Mycoplasma synoviae*, qPCR, Yumurtacı tavuk.

SUMMARY

Investigation of *Mycoplasma synoviae* Presence in Commercial Poultry Flocks in The Aegean Region of Turkey

Mycoplasma synoviae (Ms) is an important disease, causing enormous economic losses to the poultry industry worldwide. It causes disease in the joints, respiratory tract and oviduct of chickens and turkeys. There are not enough studies on the prevalence of Ms in Turkey, which is on the OIE list. In this study, sampling has been made from 375 commercial poultry flocks operating in the Aegean region. Samples were evaluated for Ms by *vlhA* gene-targeted qPCR test and conventional cultural method. As a result of qPCR, 55 (26.1%) of 211 broiler breeder flocks, 6 (60%) of 10 layer breeder flocks, 1 (6.7%) of 15 hatcheries, 8 (12.9%) of 62 broiler chicken flocks and 52 (74.2%) of 70 commercial layer chicken flocks analyzed were found to be Ms positive and Ms was not been detected in 7 broiler turkey flocks. Although 122 (32.5%) of 375 samples were found positive by qPCR, Ms was isolated from only 26 (6.9%) of all samples. As a result of the study, it was shown that Ms is common in poultry farms in the Aegean region and qPCR is a more effective method in the diagnosis of Ms.

Keywords: Broiler chicken, layer chicken *Mycoplasma synoviae*, qPCR, turkey.

KAYNAKLAR

- ABDUL-AZIS T, BARNES HJ (2018). Gross Pathology of Avian Diseases. American Association of Avian Pathologists.
- AKAN M, İZGÜR M (2002). Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara.
- AKAN M (2007). Kanatlılarda Mikoplazma Enfeksiyonlarının Önemi. *Mektup Ankara*, 5(3): 7-10.
- AKAN M (2008). Tavuklarda Mikoplazma Enfeksiyonları: Koruma ve Kontrol. *Mektup Ankara*, 6(1): 21-24.
- AKAN M, İZGÜR M, SAREYYÜPOĞLU B, ÇİFTÇİ A, İÇA T (2008). Tavuklarda Solunum Sistemi Hastalıklarının Epidemiyolojisi. AnkaraÜniv. BAP Projesi-Ankara.
- ANONİM (2019). National Poultry Improvement Plan. Erişim adresi: [http://www.poultryimprovement.org/documents/ProgramStandardsA-E.pdf]. Erişim Tarihi: 21/12/2021.
- ANONİM (2014). Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği. Erişim adresi: [http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/01/20140116-4.htm]. Erişim Tarihi: 28/02/2018.
- ANONİM (2015). Devekuşu Cinsi Yumurtalar Dışında Kalan Kuluçkalık Yumurtaların Türkiye Cumhuriyeti'ne Sevkleri İçin Veteriner Sağlık Sertifikası. Erişim adresi: [http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler/Veteriner%20Hizmetleri/SaglikSertifikasi/i thalat/kuluckalik_yumurta_2015.pdf]. Erişim Tarihi: 28/02/2018.
- ANONİM (2019). Piyasaya Arzı Uygun Veteriner Biyolojik Ürünler. Erişim adresi: [https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/bornova/Duyuru/18/Piyasaya-Arzi-Uygun-Veteriner-Biyolojik-Urunler]. Erişim Tarihi : 02/05/2019.
- ANONİM (2019). MSD Animal Health. Erişim adresi: [https://www.msd-animal-health.co.za/products/nobilis-mg-6-85/product-details.aspx]. Erişim Tarihi: 06/05/2019.
- ARAS Z, SAYIN Z (2014). Molecular Epidemiology of Mycoplasma synoviae Infection in Commercial Layers. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*, 20(1): 93-97.
- ARDA M, İZGÜR M (1984). Kanatlılarda Mikoplazma enfeksiyonları. *Etlik Vet.Mikrobiyol.Enst.Derg*, 5-6: 124-137.
- BENCINA D (2002). Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pat*, 31:535-547.

- BRADBURY JM (1977). Rapid biochemical tests for characterization of the Mycoplasmatales. *J Clin Microbiol*, **5**: 531–534.
- CATANIA S, BILATO D, GOBBO F, GRANATO A, TERREGINO C, IOB L, NICHOLAS RAJ (2010). Treatment of Eggshell Abnormalities and Reduced Egg Production Caused by Mycoplasma synoviae Infection. *Avian Dis*, **54**: 961–964.
- CHIN RP, METEYER CU, YAMAMOTO R, SHIVAPRASAD HL, KLEIN PN (1991). Isolation of Mycoplasma synoviae from the brains of commercial meat turkeys with meningeal vasculitis. *Avian Dis*, **35**: 631–637.
- CHIN RP (2013). Mycoplasmosis. In: Diseases of Poultry 13th Edition. Blackwell Publishing, Chapter 21 Ed: David E. Swayne, John R. Glisson, Larry R. McDougald, Lisa K. Nolan, David L. Suarez, Venugopal Nair.
- COBB SP (2011). The spread of pathogens through trade in poultry hatching eggs: overview and recent developments. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, **30**(1): 165-175.
- CORTES V, SEVILLA-NAVARRO S, GARCIA C, TUDON A, MARIN C, CATALA-GREGORI P (2021). Seroprevalence and prevalence of Mycoplasma synoviae in laying hens and broiler breeders in Spain. *Poultry Science*, **100**: 100911.
- ÇARLI T (2018). Enfeksiyöz Synovitis. Kanatlı Hayvanların Enfeksiyon Hastalıkları, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri. Ünite 22.
- DAKMAN A, GÜNAYDIN E, TÜRKYILMAZ MA, GÜLEÇ M, COŞAR M, ÖZDEMİR Ü (2009). Damızlık tavuk işletmelerinde tespit edilen mikoplazma enfeksiyonları. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, **20**: 27 – 34.
- DELAPLANE JP, STUART HO (1943). The propagation of a virus in embryonated chicken eggs causing a chronic respiratory disease of chickens. *Amer J Vet Res*, **4**: 325–332.
- DEMİRBİLEK SK, YILMAZ Ö, ÇARLI KT (2017) Kanatlı mycoplasma gallisepticum enfeksiyonlarının tanısında kullanılan yöntemler ve PCR yönteminin önemi. IV. Uluslararası Beyaz Et Kongresi, **27**: 126-133.
- DICKINSON EM, HINSHAW WR (1938). Treatment of infectious sinusitis of turkeys with argyrol and silver nitrate. *J Am Vet Med Assoc*, **93**: 151–156.
- DODD S (1905). Epizootic pneumo-enteritis of the turkey. *J Comp Pathol Ther*, **18**: 239–245.
- DUFOUR-GESBERT F, DHEILLY A, MAROIS C, KEMPF I (2006). Epidemiological study on Mycoplasma synoviae infection in layers. *Vet Microbiol*, **114**: 148–154.

- DUSANIC D, BERCIC RL, CIZELJ I, SALMIC S, NARAT M, BENIINA D (2009). Mycoplasma synoviae invades non-phagocytic chicken cells in vitro. *Vet Microbiol*, **138**: 114–119.
- EHTİSHAM-UL-HAQUE S, RAHMAN SU, KHAN MI, YOUNUS M, AWAIS MM, NASIR A (2015). A simplified duplex real-time PCR incorporating TaqMan minor groove binder (MGB) probes and an exogenous internal positive control for the simultaneous detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae cultures. *Veterinarni Medicina*, **60**: 268-273.
- FEBERWEE A, VRIES TS, LANDMAN WJM (2008). Seroprevalence of Mycoplasma synoviae in Dutch commercial poultry farms. *Avian Pathology*, **37**(6).
- FERGUSON-NOEL N, RAVIV Z, LEYDISEASE DH, CHIN RP, NOORMOHAMMADI AH, BRADBURY JM (2013a). Mycoplasmosis. In: Diseases of Poultry 13th Edition. Blackwell Publishing, Chapter 21 Ed: David E. Swayne, John R. Glisson, Larry R. McDougald, Lisa K. Nolan, David L. Suarez, Venugopal Nair.
- FERGUSON-NOEL N, NOORMOHAMMADI AH (2013b). Mycoplasmosis. In: Diseases of Poultry 13th Edition. Blackwell Publishing, Chapter 21 Ed: David E. Swayne, John R. Glisson, Larry R. McDougald, Lisa K. Nolan, David L. Suarez, Venugopal Nair.
- FERGUSON-NOEL N, NOORMOHAMMADI AH (2020). Mycoplasma synoviae Infection. In: Diseases of Poultry 14th Edition. Blackwell Publishing, Chapter 21 Ed: David E. Swayne, Martine Boulianne.
- FIÖRENTIN L, MORES MAZ, TREVÍSOL IM, ANTUNES SC, COSTA JLA, SONCINI RA, VIEIRA ND (2003). Test Profiles of Broiler Breeder Flocks Housed in Farms with Endemic Mycoplasma synoviae Infection. *Brazilian Journal of Poultry Science*, **5**(1): 37 – 43.
- FREY ML, HANSON RP, ANDERSON DP (1968). A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *Am J Vet Res*, **29**: 2163–2171.
- GIAMBRONE JJ, EIDSON CS, KLEVEN SH (1977). Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to Mycoplasma synoviae, Newcastle disease virus, and infectious bronchitis virus. *Am J Vet Res*, **38**: 251–253.
- GÖKÇELİK G (2008). Mikoplazma Enfeksiyonlarının Teşhisi ve Serolojik İzleme Programlarının Önemi. *Mektup Ankara*, **6**(1): 6-11.
- GÜRBÜZ E (2008). Tavuklarda Mycoplasma gallisepticum ve Mycoplasma synoviae nin tanısında PCR kullanımı. Doktora Tezi. Selçuk Üni. Sağ. Bil. Ens.
- HAGAN JC, ASHTON NJ, BRADBURY JM, MORGAN KL (2004). Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of Mycoplasma synoviae in UK laying hens. *Avian Pathol*, **33**: 93–97.

- JORDAN FTW, PATTISON M (1996). Poultry Diseases. 4th Ed. Saunders Company Ltd, London.
- KAHYA S, YILMAZ Ö, EYİĞÖR A, TEMELLİ S, ÇARLI KT (2015). Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by Real-Time PCRs and *Mycoplasma gallisepticum*-antibody Detection by an ELISA in Chicken Breeder Flocks. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **21**(3): 361-366.
- KLEVEN SH, KING DD, ANDERSON DP (1972). Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Dis*, **16**: 915-924.
- KLEVEN SH (1998). Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poult Sci*, **77**: 1146-1149.
- KLEVEN SH (2008a). Control of Avian Mycoplasma Infections in Commercial. *Avian Disease*, **52**: 367-374.
- KLEVEN SH, FLETCHER WO (1983). Laboratory infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*, **27**: 308-311.
- KOHN S, SPERGSEER J, AHLERS C, VOSS M, BARTELS T, ROSENGARTEN R, KRAUTWALD-JUNGHANNS ME (2009). Prevalence of Mycoplasmas in commercial layer flocks during laying period. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **122**: 186-192.
- KRASS CJ, GARDNER MW (1973). Etymology of the Term Mycoplasma. *International Journal of Systematic Bacteriology*, P: 62-64
- KRIEG N, STALEY JT, BROWN DR, HEDLUND BP, PASTER BJ, WARD NL, LUDWIG W, WHITMAN WB (2010). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd ed., Vol.4. New York: Springer.
- KURSA O, TOMCZYK G, SAWICKA A (2019). Prevalence and phylogenetic analysis of *Mycoplasma synoviae* strains isolated from Polish chicken layer flocks. *J Vet Res*, **63**: 41-49.
- LEVISOHN S, KLEVEN SH (2000). Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, **19**(2): 425-442.
- LEY DH, BERKHOF JE, MCLAREN JM (1996). *Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*Carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis. *Avian Dis*, **40**: 480-483.
- LOCKABY SB, HOERR FJ, LAUERMAN LH, KLEVEN SH (1998). Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. *Vet Pathol*, **35**: 178-190

- LUITEL PL, GANDGE RS, MAJEE SB (2020). Molecular Detection of Mycoplasma synoviae Infection in Poultry. *AJRAVS*, **5**(1): 1-7.
- MARKHAM FS, WONG SC (1952). Pleuropneumonia-like organisms in the etiology of turkey sinusitis and chronic respiratory disease of chickens. *Poult Sci*, **31**: 902-904.
- MAROUF S, MOUSSA IM, SALEM H, SEDEİK M, ELBESTAWY A, HEMEG HA, DAWOUD TM, MUBARAK AS, MAHMOUD H, ALSUBKİ RA, BAHKALİ AH (2020). A picture of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in poultry in Egypt: Phenotypic and genotypic characterization. *Journal of King Saud University-Science*, **32**: 2263-2268.
- MOREİRA FA, CARDOSO L, COELHO AC (2015). Epidemiological survey on Mycoplasma synoviae infection in Portuguese broiler breeder flocks. *Veterinaria Italiana*, **51**(2): 93-98.
- MUHAMMAD F, HUSSAIN J, FAREED SK, AHMED KHAN T, AHMED KHAN S, AHMAD A (2018). Diagnosis of Avian Mycoplasmas: A Comparison between PCR and Culture Technique. *Archives of Razi Institute*, **73**(3): 239-244.
- NASCIMENTO ER, PEREİRA VLA, NASCIMENTO MGF, BARRETO ML (2005). Avian Mycoplasmosis Update. *Brazilian Journal of Poultry Science*, **7**: 1-9.
- NELSON JB (1935). Cocco-bacilliform bodies associated with an infectious fowl coryza. *Science*, **82**: 43-44.
- NOORMOHAMMADI AH, MARKHAM PF, KANCI A, WHITHEAR KG, BROWNING GF (2000). A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of Mycoplasma synoviae. *Mol. Microbiol*, **35**: 911-923.
- OIE (2021). Terrestrial Manual, Avian Mycoplasmosis (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*), Bölüm: 3.3.5
- OKWARA N (2016). Avian Mycoplasmosis: A Review. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, **9**(5): 06-10.
- OLSON NO, BLETNER JK, SHELTON DC, MUNRO DA, ANDERSON GC (1954). Enlarged joint condition in poultry caused by an infectious agent. *Poult Sci*, **33**: 1075.
- OLSON NO, SHELTON DC, BLETNER JK, MUNRO DA, ANDERSON GC (1956). Studies of infectious synovitis in chickens. *Am J Vet Res*, **17**: 747-754.
- OLSON NO, ADLER HE, DAMASSA AJ, CORSTVET RE (1964). The effect of intranasal exposure to Mycoplasma synoviae and infectious bronchitis on development of lesions and agglutinins. *Avian Dis*, **8**: 623-631.

- ÖZGÜN MR (2015). Kanatlı Kan Serumlarında *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae* Antikorlarının Elisa ile Tespiti, Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üni. Sağ. Bil. Ens.
- POHUANG T, PHUEKTES P, JUNNU S (2020). Development and evaluation of semi-nested PCR for detection of the variable. *Korean J Vet Res*, **60**(3): 109~116.
- RAVIV Z, LEY DH (2013). Mycoplasmosis. In: Diseases of Poultry 13th Edition. Blackwell Publishing, Chapter 21 Ed: David E. Swayne, John R. Glisson, Larry R. McDougald, Lisa K. Nolan, David L. Suarez, Venugopal Nair.
- RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 1094–1156.
- SAIF YM, BARNES HJ, GLISSON JR, FADLY AM, MCDUGALD LR, SWAYNE D (2001). Diseases of Poultry. 11th Ed. Iowa State University Pres, Iowa.
- SALISCH H, HINZ KH, GRAACK HD, RYLL M (1998). A comparison of commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in concurrently infected chickens. *Av. Pathol*, **27**: 142-147.
- SEİFİ S, SHİRZAD MR (2012). Incidence and risk factors of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Iran, *Vet. World*, **5**(5): 265-268.
- SUN S, LIN X, CHEN F, WANG D, LU J, QIN J, LUO T (2017). Epidemiological investigation of *Mycoplasma Synoviae* in native chicken breeds in China. *BMC Veterinary Research*, **13**: 115.
- ÜLGEN M (2018). Mikoplazmalar ve spiroketler. *Veteriner Mikrobiyoloji ve Epidemiyoloji s.*:133-137.
- VARDAMAN TH (1976). The resistance and carrier status of meat- type hens exposed to *Mycoplasma synoviae*. *Poult Sci*, **55**: 268–273.
- WEİSBURG WG, TULLY JG, ROSE DL, PETZEL JP, OYAİZU H, YANG D, MANDELCO L, SECHREST J, LAWRENCE TG, VAN ETEN J, MANİLOFF L, WOESE CR (1989). A pylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, **171**: 6455-6467.
- WEINACK OM, SNOEYENBOS GH, KLEVEN SH (1983). Strain of *Mycoplasma synoviae* of low transmissibility. *Avian Dis*. **27**: 1151–1156.
- WINNER F, ROSENGARTEN R, CITTİ C (2000). In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect Immun*, **68**: 4238–4244.

YILMAZ F, TIMURKAAN N, KILIÇ A, KALENDER H, KILINÇ Ü (2011). Detection of Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum in chickens by immunohistochemical, PCR and culture methods. *Revue Méd. Vét*, **162**(2): 79-86.



EKLER

Ek-1



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü



İZMİR/BORNOVA VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU
PROJE DEĞERLENDİRME RAPORU

Enstitümüz Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında çalışan ve doktora öğrenimini Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji alanında yapmakta olan Veteriner Hekim Hamza KILIÇ'ın " Ege Bölgesinde Bulunan Ticari Kanatlı İşletmelerinde Mycoplasma synoviae Varlığının Araştırılması " konulu doktora tez çalışması için kullanacağı damızlık kümeslerdeki canlı hayvanlardan trakeal ve kloakal svap, kuluçkahanelerden kabuk altı ölmüş civciv ve embriyolardan iç organ (akciğer, trakea) ve vitellin membran; ticari yumurtacı ve broyler işletmelerinden canlı hayvanlardan trakeal ve kloakal svap, ölmüş hayvanlardan ise iç organ (akciğer, trakea, hava kesesi ve eklem sıvısı) örnekleri için 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayılı "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik"teki madde 8'in (k) bendinde yer alan hükümlere göre Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayına gerek bulunmamaktadır. **27.05.2020**

Dr. Ayşen BEXAZIT

Dr. M. Zeynep GÜNEŞ

Dr. Deniz TURAN

Dr. N. İlker İÇİL

Z. Nejdet ERHAN
Veteriner Hekim

H. Gökhan ÖZDEMİR
Sivil Üye

Banu BAYDAR ERDOĞAN
Sivil Üye

Adres: Erzene Mah. Ankara Cad. No:172-155 **Bornova 35040 İZMİR**
Tel: +90 232 388 00 10 **Faks:** +90 232 388 50 52 **E-posta:** Bornova.vke @ tarim.gov.tr
Web: http://vetkontrol.tarimgov.tr/bornova