



EGE ÜNİVERSİTESİ



DOKTORA TEZİ

**BALARILARINDAKİ AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ
HASTALIĞI ETKENİ OLAN *PAENIBACILLUS LARVAE*'NİN
LARVALI PETEK VE BAL ÖRNEKLERİNDEN
KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER
BİYOLOJİK YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ**

Mehmet ÖZDEN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ataç UZEL

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 21.08.2017

Bornova-İZMİR

2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**BALARILARINDAKİ AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ
HASTALIĞI ETKENİ OLAN *PAENIBACILLUS LARVAE*'NİN
LARVALI PETEK VE BAL ÖRNEKLERİNDEN
KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER
BİYOLOJİK YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ**

Mehmet ÖZDEN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ataç UZEL

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 21.08.2017

Bornova-İZMİR

2017

Mehmet ÖZDEN tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Balarılarındaki Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı Etkeni Olan *Paenibacillus larvae*’nin Larvalı Petek ve Bal Örneklerinden Konvansiyonel ve Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Teşhisi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 21.08.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof.Dr.Ataç UZEL

Raportör Üye

: Prof.Dr.İsmail KARABOZ

Üye

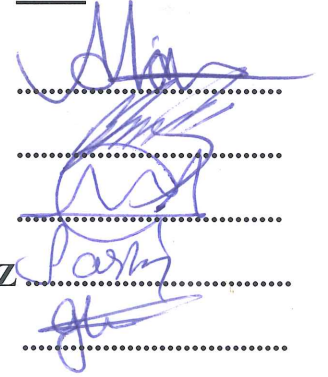
: Prof.Dr.Mustafa ATEŞ..

Üye

: Prof.Dr.Süheyla TÜRKYILMAZ

Üye

: Yrd.Doç.Dr.Göksel ERBAŞ



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Balarılarındaki Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı Etkeni Olan *Paenibacillus larvae*’nın Larvalı Petek ve Bal Örneklerinden Konvansiyonel ve Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Teşhisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

21 / 08 / 2017

İmzası



Adı-Soyadı

Mehmet ÖZDEN

ÖZET**BALARILARINDAKİ AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ
HASTALIĞI ETKENİ OLAN *Paenibacillus larvae*'nın LARVALI
PETEK VE BAL ÖRNEKLERİNDEN KONVANSİYONEL VE
MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ**

ÖZDEN, Mehmet

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ataç UZEL

Ağustos 2017, 108 sayfa

Ülkemizde AYÇ hastalığı teşhisi, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın "Laboratuvarlar Arası Metot Birliği" kitapçığına göre, konvansiyonel kültür yöntemi ile yapılmaktadır. Konvansiyonel kültür yöntemi ile teşhis, uzun sürmekte ve maliyeti yüksek olmaktadır. Bazı ülke ve laboratuvarlarda OIE tarafından da tavsiye edilen moleküler yöntemler kullanılarak daha hızlı sonuçlar alınabilmektedir. Bu çalışma ise, teşhis prosedüründe uygulanabilirliği açısından konvansiyonel kültür yöntemi, Konvansiyonel PCR ve Real-Time PCR yöntemlerinin paralel olarak uygulanacağı bir metot karşılaştırma projesi olarak tasarlanmıştır.

Bu amaçla farklı kaynaklardan 96 adet larvalı petek, ballı petek ile az sayıda kabartılmış petek ve ergin arı örnekleri toplanmıştır. Örnekler önce konvansiyonel kültür metodu ile incelenmiş, daha sonra örneklerden DNA izolasyonu yapılarak Konvansiyonel PCR ve Real-Time PCR metotları ile incelenmiştir. Moleküler çalışmalar için, literatürlerde belirtilen primer çiftleriyle sonuç alınamamış, üç başarısız denemeden sonra ancak dördüncü çalışmada PCR için farklı, Real-Time PCR için farklı primerler kullanılarak metotlar optimize edilebilmiştir. Sonuç olarak, konvansiyonel kültür metodu ile 10, konvansiyonel PCR ile 16, Real-Time PCR ile 25 örnek pozitif olarak bulunmuştur. Kültür yöntemi ile pozitif bulunan tüm örnekler, moleküler yöntemlerle de pozitif bulunmuştur. Çalışmamız sonucundaki bulgular ışığında, AYÇ şüpheli bir örnek, moleküler yöntemlerle muayene edilip negatif bulunursa menfi olarak değerlendirilebilir. Moleküler yöntemlerle pozitif bulunursa, kültür yöntemi ile muayeneye alınıp, konvansiyonel kültür yöntemi sonuçlarına göre değerlendirilmesinin uygun olacağı belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Balarısı, Amerikan Yavru Çürüklüğü, Teşhis, PCR, Real-Time PCR



ABSTRACT**DIAGNOSIS OF HONEYBEES' AMERICAN FOULBROOD'S CAUSATIVE AGENT *Paenibacillus larvae* FROM SUSPICIOUS BROOD AND HONEY BY MOLECULAR AND CONVENTIONAL METHODS.**

ÖZDEN, Mehmet

PhD in Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ataç UZEL

August 2017, 108 pages

In Turkey, diagnosis of American Foulbrood Disease (AFB) is carried out with conventional bacteriological methods according to the “Laboratory Method Unification Manual” of Ministry of Food, Agriculture and Livestock. Diagnosis with conventional culture method is time consuming and expensive. In some countries and laboratories, molecular methods recommended by OIE could be used for faster results. This research was designed as a method comparison work where conventional methods, PCR and Real Time PCR methods will be applied parallel regarding to application on the diagnosis process.

For this purpose, 96 samples consisting of larval broods, honey broods and phenomenal amounts of harvested broods and adult bees were taken from different sources. Samples were initially examined by culture methods, and then by conventional PCR and real time PCR methods. In molecular studies optimization was achieved with different primers for conventional PCR and real time PCR methods. As a result, 10 samples were found to be positive with conventional culture methods, 16 were positive with PCR and 25 were positive with Real-Time PCR. All samples found positive with culture method were also found to be positive with molecular methods. According to the findings of our work, an AFB suspicious sample can be considered as negative if it is also was found negative with molecular methods. If it is found to be positive with molecular methods, it would be appropriate that the sample should be examined and results should be evaluated with culture methods.

Keywords: Honeybee, American Foulbrood, Diagnosis, PCR, Real-Time PCR

TEŞEKKÜR

Bu projenin yürütülmesini TAGEM/ HS / 10 / 13 / 01 / 170 proje kodu ile destekleyen Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Politikalar ve Araştırmalar Genel Müdürlüğü TAGEM'e, 2016 Fen 010 No'lu proje olarak destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı'na, Enstitü eski Müdürümüz Necdet AKKOCA'ya, projenin gerçekleştirilmesi sırasındaki destekleri için İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden Laborant Nihat AÇIKGÖZ ve Murat GÜLTEKİN'e uygulamaların gerçekleştirilmesi sırasındaki yardımları için Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD Moleküler Laboratuvarından Y. Biyolog Dr. Ş. Orçun KALKAN, Y. Biyolog Gürkan YİĞİTTÜRK, Y. Biyolog Bahtiyar YILMAZ'a, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden Doç. Dr. Ayşe KILIÇ ve Yrd. Doç. Dr. Halil ŞİMŞEK'e teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Tarihçe ve Taksonomi	5
2.2 Dünya’da ve Türkiye’de Mevcut Durum	10
2.2.1 Dünya’da AYÇ hastalığının mevcut durumu	10
2.2.2 Türkiye’deki mevcut durum	12
2.3.AYÇ ile İlgili Yapılan Güncel Çalışmalar.....	13
2.3.1 Etken ve hastalığın tabiatı üzerine yapılan çalışmalar.....	13
2.3.2. Korunma ve tedavi üzerine yapılan çalışmalar.....	18
2.3.3 AYÇ’nin teşhis yöntemleri	23
2.3.3.1 Fenotipik yöntemler	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.3.2 Moleküler yöntemler.....	25
2.3.4 Tiplendirme, karakterizasyon ve ileri düzey moleküler çalışmalar	34
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Materyal	39
3.1.1 Çalışmada kullanılan örnekler	39
3.1.2 Kullanılan besiyerleri.....	42
3.1.3 Kullanılan boyalar, kimyasallar ve tamponlar	45
3.1.4 Kullanılan test mikroorganizmaları	48
3.1.5 PCR reaksiyonunda kullanılan primerler ve prob.....	48
3.1.6 Kullanılan cihazlar	50
3.2 Metot	51
3.2.1 Örneklerin işleme hazırlanması ve kültür yöntemiyle analizi	53
3.2.2 Etken izolasyonu ve tanımlanması.....	54
3.2.3 Örneklerden moleküler çalışmalar için DNA izolasyonu	58
3.2.4 Konvansiyonel PCR çalışmaları	59
3.2.5 Real – time PCR çalışmaları	60
3.2.6 Sekans analizi ile çalışmanın verifikasyonu	61

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.2.7 Tespit limiti çalışmaları	61
4. BULGULAR.....	64
4.1 Kültür Yöntemi Bulguları.....	65
4.2 Konvansiyonel PCR Yöntemi Bulguları	69
4.2.1 DNA ekstraksiyonu	69
4.2.2. Primerler ve konvansiyonel PCR.....	70
4.2.3 Konvansiyonel PCR bulguları	71
4.3 Real – Time PCR Bulguları.....	73
4.4 Tespit Limiti Çalışmaları	74
4.4.1 Konvansiyonel PCR tespit limiti	74
4.4.2 Real-time PCR tespit limiti.....	75
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	77
5.1 Klasik Kültür Yöntemi	77
5.2 DNA İzolasyon Çalışmaları.....	82
5.3 Konvansiyonel PCR Çalışmaları	83
5.4 Real-Time PCR Çalışmasının Sonuçları	86

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5.5 Tespit Limiti Çalışmalarının Sonuçları	87
5.6. Yöntemlerin Genel Değerlendirilmesi	87
5.7 Teşhis Süreleri Ve Maliyet Analizi	88
5.8 Yöntemlerin Birlikte Değerlendirilmesi	88
6. ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR DİZİNİ	93
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Uruguay’da bal örneklerinde bulunan <i>P. larvae</i> sporu sayılarının dağılımı ...	11
2.2 Bal arılarının patojenleri şeması	14
2.3 AYÇ Hastalığının şematize edilmiş patogenezi	15
2.4 ERIC I ve ERIC II tiplerinin patojenitesi	16
2.5 Enfekte larvalardan elde edilen DNA örneklerinin PCR görüntüsü.....	23
2.6 Rekombinant metalloprotease’ın süt hidroliz testi ile gösterilen proteolitik aktivitesi.....	33
2.7 <i>P. larvae</i> vejetatif bakterileri ve sporlarında immunfloresans ile konfokal mikroskopide metalloprotease belirlenmesi.	34
2.8 Bulgaristan <i>P. larvae</i> genotiplerinin biyotiplere dağılımı.....	36
3.1 AYÇ şüpheli bir örneğe uygulanan uzama testi	50
3.2 Larvalı, ballı, kabartılmış ve temel petek örnekleri.....	51
3.3 Fungal kontaminasyon nedeniyle çalışma dışı bırakılan bir örnek	51
3.4 Ekim hazırlıkları	52
3.5 Kolonilerin makroskobik görünüşleri	54
3.6 Saha izolatının Gram boyamasının mikroskop görüntüsü.....	55
3.7 Oluşturulan standart eğri.....	61
4.1 Klasik kültür yöntemiyle izole edilen şüpheli kolonilerin dağılımı	64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.2 P. larvae referens suşunun Kanlı Kolombiya Agar'daki Görüntüsü.....	64
4.3 P. larvae saha izolatının J, Nutrient, Kanlı Kolombiya agardaki görüntüsü....	65
4.4 P Örneklerin sıvı besiyerindeki 72 saatlik kültürlerinin görüntüsü.....	65
4.5 Örneklerden izole edilen DNA'ların bir kısmının Nanodrop cihazındaki ölçüm sonuçları	69
4.6 Konvansiyonel PCR bulguları	71
4.7 Konvansiyonel PCR yönteminde jel elektroforezi sonrası pozitif örneklerin görüntüsü.....	71
4.8 Real-time PCR bulguları	72
4.9 Real-time PCR yöntemi ile yapılan çalışmanın görüntüsü	72
4.10 Pozitif ve negatif örneklerin floresan eğrileri	73
4.11 Konvansiyonel PCR tespit limiti çalışması sonucu	74
4.12 LightCycler 480 cihazından alınan amplifikasyon eğrileri.....	74
5.1 Pozitiflik oranları karşılaştırılması.....	74
5.1 Pozitiflik Oranları Karşılaştırılması.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>P. larvae</i> ve <i>P. pulvifaciens</i> suşlarının fenotipik karakteristikleri	8
2.2 <i>P. larvae</i> ve <i>P. pulvifaciens</i> 'i <i>Paenibacillus</i> türlerinden ayıran özellikler	9
2.3 <i>P. larvae</i> ve <i>P. pulvifaciens</i> suşlarının G+C içerikleri	9
2.4 Antibiyotik kullanmadan tedavi sonuçları	19
2.5 <i>P. larvae</i> PCR primer sekanslarının diğer türlerin nükleotid sekansları ile özdeşliği	27
2.6 Primerler ve farklı kombinasyonlarla ampliconların uzunlukları	28
2.7 Primerlerin <i>P. larvae</i> 16S rRNA geni içindeki dizilimleri ve pozisyonları	29
2.8 <i>P. larvae</i> PCR'ı için seçilen oligonükleotid primerleri	30
2.9 <i>P. larvae</i> genotiplerinin ERIC I, II, III, ve IV karakteristikleri	35
2.10 Bulgar aralıklarında <i>P. larvae</i> genotiplerinin dağılımı	36
3.1 Örnek Bilgileri	40
3.2 Konvansiyonel PCR için ilk sentezlenen primer ve prob	48
3.3 16S rRNA geni temelli, konvansiyonel PCR için kullanılan primerler	49
3. 4 16S rRNA temelli real-time PCR için kullanılan primerler ve prob	50
3.5 Vitek 2 Compact BCL kit içeriği	57
3.6 Metalloproteinaz gen bölgesi hedefli primerler ve prob	59

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Örneklerin Analiz Sonuçları	64
4.2 Elde Edilen Suşların Biyokimyasal Profilleri	68
4.3 Real-Time PCR Tespit Limiti Hesaplama Tablosu	76
5.1 Örneklerin Muayene Bulguları	78
5.2 Teşhis Yöntemleri ve Maliyetleri	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AYÇ	Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı
AvYÇ	Avrupa Yavru Çürüklüğü Hastalığı
TAGEM	Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
PCR	Polymerase Chain Reaction / Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Real-time-PCR	Real-time (gerçek zamanlı izlenebilen) Polymerase Chain Reaction
PBS	Fosfat Buffer Solution
dNTP	deoksiribonükleozid trifosfat
bp	Base pair (Baz çifti)
DNA	Deoksiribonükleik asit
ml	mililitre
µl	mikrolitre
pmol	pikomol
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
BHITA	Thiaminli Brain Heart Infusion Agar
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
KA+N	Nalidiksik asitli Kanlı Agar
KCA	Kanlı Kolombiya Agar
KA	Kanlı Agar
FAT	Floresan Antikor Test
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
OIE	Ofis International Epizootica (World Organisation for Animal Health -Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

GTHB	Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
RNA	Ribo Nükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
ARDRA	Amplified rDNA (Ribosomal DNA) Restriction Analysis
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -galactoside
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

1. GİRİŞ

Bal arılarının (*Apis mellifera*) en önemli ve en çok kayıplara sebep olan bakteriyel hastalığı Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) hastalığıdır (Genersch 2010). Hastalığın etkeni, Gram (+) bir basil olan *Paenibacillus larvae*'dır ve oldukça dayanıklı endosporlara sahiptir. *P. larvae* arılara kolayca bulaşabilmekte ve özellikle zayıf veya stresli kolonilerde koloni kayıplarına kadar varabilecek zararlara yol açabilmektedir. Hastalık, bu haliyle özellikle gezginci arıların korkulu rüyası konumundadır. Hastalığın, diğer bazı bakteriyel ve viral arı hastalıklarından ayırımı klinik olarak mümkün değildir. Hastalıkla mücadelenin etkin olabilmesinde hastalığın laboratuvar teşhisinin hızı ve doğruluğu büyük önem taşımaktadır (Williams 2000).

AYÇ, Türkiye'deki mevzuata göre (12.11.2011 tarihli Bal Arılarının Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığına Karşı Korunma ve Mücadele Talimatı) bal arılarının ihbarı mecburi olan tek bakteriyel hastalığıdır. Yürürlükteki uygulamalara göre; AYÇ tespit edildiğinde hastalık mihrakında, belirti gösteren tüm balarısı kolonileri, "akşam tüm arılar kovana döndükten sonra" kovan giriş deliği kapatılıp hızlı ve kesin etkili bir dezenfektanla arılar öldürülür. Daha sonra öldürülmüş olan koloniye ait tüm yetişkin arı, larva, bal ve petekler yakılarak imha edilir. Kovan ise kostik soda, hipoklorit gibi dezenfektanlarla muamele edilip, güneşte kurutulduktan ve/veya pürümüzle tüm yüzeylerine ısıtma işlemi uygulandıktan sonra kullanılabilir. Bu işlemlerin ardından yetiştiriciye ait tüm koloniler iki ay boyunca yerinde karantina altına alınır. Bölgeye başka arıların girişine ve arıların bölgeden çıkışına izin verilmez. Arıların bulunduğu bölgenin tüm girişlerine uyarı levhaları konularak diğer arıcılar uyarılır. Bütün bu itibar kaybına ve maddi kayba yol açan uygulamalara rağmen yetiştiriciye herhangi bir tazminat ödemesi de söz konusu değildir.

Tespiti halinde yol açtığı önemli zararlar nedeniyle, ülkemizde hastalığın teşhisi ile ilgili olarak yetkilendirilen Veteriner Kontrol Enstitüleri, hastalık teşhisini, uluslararası kabul görmüş ve valide edilmiş metotlar ile yapmak zorundadır. Aksi takdirde yol açılacak zararların telafisi mümkün değildir.

Şu anda Türkiye'deki Veteriner Kontrol Enstitülerinde uygulanan kültür yöntemi ile laboratuvar tanısı en az yedi gün süren, uzun ve zahmetli bir teşhis

prosedürüdür. Bu prosedür Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB) Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü'nce The World Organization for Animal Health, Office International des Epizooties (OIE), tarafından yayınlanan “Terrestrial Manual”da altın metot olarak belirtilen Kültür Metodu temel alınarak oluşturulmuştur. “Laboratuarlar Arası Metot Birliği” kitapçığı uyarınca etkenin Brain Heart Infusion Agar ve Broth, % 5 koyun kanlı Columbia Agar gibi çeşitli besi yerlerine ekimi öngörülmektedir. Ekimi müteakip $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 7-14 günlük bir inkubasyon süresi sonunda şüpheli herhangi bir üreme tespit edilmezse menfi olarak değerlendirmektedir. Üreme saptanması durumunda üreyen kolonilerden biyokimyasal testler ile ayırıcı tanıya gidilmesi söz konusudur. Bu teşhis prosedürü uzun ve bazı nektar bölgelerinde en fazla 10-15 gün konaklayan gezginci arıcalar için büyük maddi kayıplara sebep olabilecek bir süredir.

Hâlihazırda tüm dünyada hastalığın teşhisi için hazır strip testlerden kültür metoduna kadar özgüllükleri, duyarlılıkları, maliyetleri, süreleri değişik seviyelerde olan pek çok metot kullanılmaktadır. Ülkeler veya birlikler, amaçlarına göre bu teşhis metotlarından bazılarının kullanımını öngörmekte, resmi olarak sonuçlarına itibar etmekte bazılarının sonuçlarını ise geçersiz kabul etmektedir. Testlerin resmi otoritelerce kabulündeki kriterler değişmekle birlikte, genel olarak insanlardaki hastalıklarda otorite kabul edilen Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) benzeri olarak hayvanlar için OIE genel otorite olarak kabul edilmektedir.

OIE, hastalıkların teşhisi için temel referans niteliğinde olan “Terrestrial Manual” adlı kılavuzunu yayınlamakta ve bu kılavuzu bilimsel gelişmelerin ve yayınların gelişimine paralel olarak sürekli yenilemektedir.

AYÇ hastalığının teşhisiyle ilgili olarak, kültür metodu dışındaki teşhis metotlarının önerilmediği 2004 yılında yayınlanmış “Terrestrial Manual” sonrasındaki yayınlarda, gerek nomenklatördeki değişiklikler, gerekse moleküler teşhis yöntemlerindeki gelişmeler daha hızlı ve güvenilir sonuçlar alabilmeyi mümkün kılmıştır. Bu gelişmeler neticesinde OIE, 2008 yılında yayımlanan Terrestrial Manual'da AYÇ teşhisi için moleküler yöntemleri de önerilen teşhis metotları arasına almıştır (OIE Terrestrial Manual 2008 ve 2016).

Ülkemizde, uygulama aşamasında hastalıkla mücadele ve teşhiste durum bazı karışıklıklar göstermektedir. Bu karışıklıklardan en başta geleni, hastalık mücadelesinde antibiyotik kullanımının yasak olması ve mücadelenin sadece koloninin tazminatsız olarak imhası esasına dayanmasıdır. Mevcut durumda arı yetiştiricileri ifşa olmamak ve kolonilerini kaybedip maddi zarara uğramamak için hastalığı gizleme yoluna gitmektedir. Hastalık gizlendikçe yaygınlaşmakta, balarılarında yol açtığı zararın önüne geçmek için ruhsatlı antibiyotik olmadığından başka hayvan türleri için piyasaya sunulmuş olan antibiyotikler bilinçsizce, dozaj, uygulama yolu ve süresi tamamen ampirik bir şekilde kullanılmaktadır. Bu ampirik tedavi kanunen yasaktır (ruhsatlı ilaçlar için; <http://www.gkgm.gov.tr/vtu/>) ve balda yol açtığı kalıntı nedeniyle balın pazar değerini de yok etmektedir. İçinde antibiyotik kalıntısı olan balların imhası gerekmektedir (Parvanov et al. 2006).

Bu bilinçsiz tedavi girişimleri iki şekilde zararlıdır. İlki, bu kullanımlarla etkendeki direnç oluşumu için gerekli zemin hazırlanarak etkenin zamanla daha güçlü olmasının önü açılmaktadır. İkincisi, kullanılan antibiyotik çok iyi bir koruyucu olan bal içinde yıkımlanmadan aynen muhafaza edilmekte, bu balların kontrolsüz bir şekilde piyasaya sürülmesiyle gıdalar yoluyla insanlara kadar ulaşmakta ve insanlarda sağlık problemlerine yol açmaktadır (Parvanov et al. 2006). Ülkemizde tüketime sunulan ballarda, Kloramfenikol, Nitrofuran, Tetrasiklin grubu, Sülfonamid grubu, Betalaktam grubu, Makrolid grubu, Kinolon grubu, Karbamatlar, Pyretiroidler gibi antibiyotikler ile Organoklorlu maddeler, Kurşun, Bakır, Kadmiyum, Çinko elementleri ve Naftaline yönelik bir Ulusal Kalıntı İzleme Programı resmi otoritelerce titizlikle yürütülmektedir. http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler/Gıda%20ve%20Yem%20Hizmetleri/gida_kontrol/Ulusal_Kalinti_Izleme_Plani_2017.pdf (Erişim tarihi 05 Eylül 2017)

Bilinçsiz antibiyotik kullanımının laboratuvar teşhisi yönünden en önemli dezavantajı ise bilinçsizce çok yüksek dozda uygulanan antibiyotiğin örnekte de yüksek düzeyde bulunması ve bu durumun etkenin kültüre edilmesini engellenmesidir. Etkenin antibiyotik kullanımı nedeniyle kültüre edilememesi, klinik belirtiler ve bakteriyoskopide müspet belirtiler gösteren örneklerin teşhisinde yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu durum, klinik olarak (Anamnez, renk, koku, uzama v.b.) ve bakteriyoskopide (Gram pozitif sporlu

basiller gibi) pozitif belirtiler gösteren örneklerde, moleküler yöntemleri avantajlı kılmaktadır (Gillard et al. 2008, de Graaf et al. 2006b).

Bunun yanı sıra arıcılığın rutin işlemlerinden olan hasat sonrası balmumunun eritilip, otoklavda steril edilerek temel petek olarak tekrar kullanılması moleküler yöntemler açısından dezavantajlı bir durum oluşturmaktadır. Burada temel peteğin hammaddesi olan doğal balmumunun elde edildiği kolonilerde AYÇ etkeninin olması durumunda, otoklavlanmasına rağmen mevcut DNA moleküler yöntemlerle tespit edilebilmekte, bu da yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir (Ryba et al. 2009).

Burada teşhis için temel olarak bakteri genomunda mutasyonlarla değişikliğe uğramamış, en iyi korunmuş olan genlerden 16 S rRNA gen bölgesi ve ikincil metalloproteinaz gen bölgesi esas alınmış moleküler çalışmalar öne çıkmaktadır. Tüm moleküler çalışmalar ve taksonomik çalışmalar, genetik olarak iyi korunmuş bu gen bölgeleri esas alınarak yapılmaktadır (Bakonyi et al., 2003)

Yukarıda anlatılanlar ışığında teşhis için uygun metodun seçilmesi, kullanılan teşhis metodunun sonuçlarının yorumlanması ile örneğe ve metoda uygun sonuçların raporlanması büyük bir önem arz etmektedir.

Çalışmamızda OIE Terrestrial Manual'da (2008) kabul edilen teşhis yöntemleri, aynı örnekler üzerinde uygulanarak AYÇ ayırıcı teşhisinde, teşhis metotları arasındaki duyarlılık, özgüllük, hız, güvenilirlik, maliyet gibi kriterler ortaya koyulmaya çalışılacaktır. Yapılan bu metot karşılaştırma çalışması sonunda materyal çeşidine, laboratuvar altyapısına, süreye ve maliyete göre hangi metodu seçmenin daha uygun olacağı hususunda araştırmacılara yardımcı olunabilecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Tarihçe ve Taksonomi

İnsanların arılara ve arı hastalıklarına ilgisi, arıcılığın başlaması ile birlikte artmıştır. Konuyla ilgili ilk kayıtlara, güncelleri kadar kesinlik içermemekle birlikte Aristotle, Virgil ve Pliny'nin eserlerinde rastlanmaktadır. Bu eserlerdeki bilgiler, kesinlik içermediği için pek dikkate alınmasa da güncel olarak tanımlanmış olan arı hastalıkları ile ilgili ilk kayıtlar oldukları kabul edilir. Bu tanımlamalar içinde AYÇ veya Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalıklarına benzer ilk kayıtların 1771 yılında not edildiği belirlenmiştir (Williams, 2000). Balarılarının yavru çürüklüklerinin iki farklı türde olduğu, birinin mühürlenmemiş larvalarda daha hafif ve tedavi edilebilir, diğerini ise mühürlenmiş larvalarda daha kötü ve tedavi edilemez olduğu Dzierzon tarafından 1882 yılında bildirilmiştir (Genersch, 2010). Araştırmacı, yavru çürüklüklerini ikiye ayırmış; İlkin “ılımlı ve tedavi edilebilir” tanımlamıştır. Tanımlanan bu hastalık, muhtemelen günümüzde “Avrupa Yavru Çürüklüğü” olarak tanımladığımız hastalıktır. Araştırmacının ikinci hastalık tanımı ise “kötü huylu ve tedavi edilemez” yavru çürüklüğü olmuştur. Muhtemelen tanımlanan bu ikinci hastalık ta günümüzde “Amerikan Yavru Çürüklüğü” olarak kabul edilen hastalık idi. 1885 yılında Chesshire ve Cheyne tarafından yavru çürüklüğü olarak tanımlanan olgulardan *Bacillus alvei* izole edilmiş ve yavru çürüklüğü etkeni olarak tanımlanmıştır (Genersch, 2010). Yavru çürüklüğü bakteriyolojisi ile ilgili ilk çalışmalar ise yine aynı yıllarda yapılmaya başlanmış, yavru çürüklüklerinde kaçınılmaz bir şekilde bir patojen etkenin varlığı, bu etken ile arıların kendi aralarında ve çevre ile olan etkileşimlerinin sağlıklarını etkilediği vurgulanmıştır (Genersch, 2010).

Veteriner hekimliği, uzunca bir süre, talihsiz bir şekilde memeliler haricindeki türlere ilgisiz kalmıştır. Veteriner hekimlerin bal arıları ile ilk ilgilenmeye başlaması, yoğun Varroosis salgınları gibi, ruhsatlı ilaçlara yoğun ihtiyaç duyulan olaylarla birlikte gerçekleşmiştir (Williams, 2000).

AYÇ hastalığı ve etkeni üzerine ilk çalışmalar, 1906 yılında Gershom Franklin White'ın çalışmalarına dayanmaktadır (Genersch, 2010). White (1906), arı hastalıklarının bakteriyolojisi üzerine yaptığı çalışmada, uzama gösteren visköz larvalardan *B. alvei*'yi izole etmekte başarısız olmuş, bunun yerine

hastalıklı ve ölü larvalarda, istisnasız olarak, çomak şekilli, endosporlu saptamış, bunu *Bacillus larvae* olarak sınıflandırmıştır (Genersch, 2010). Bu çalışma, arıcılıkta bakterilerin önemi konusunda da ilk ciddi ve önemli çalışma kabul edilir. İlk olarak bu çalışmada, AYÇ etkeni, diğer basil türlerinden fenotipik karakterizasyon ve klinik etkileri itibarıyla farklı olarak tanımlanarak *B. larvae* adıyla literatürdeki yerini almıştır (Genersch, 2010). Bu tarihten sonra AYÇ etkeni ile çalışan tüm araştırmacılar referans olarak White'ın çalışmasına atıfta bulunmuşlardır. Ayrıca araştırmacı, farklı etkenlerce farklı klinik belirtilerle seyreden iki farklı yavru çürüklüğü olduğunu vurgulayan ilk araştırmacıdır (Genersch, 2010).

Bu araştırmacıdan sonra uzunca bir süre, etkenin taksonomisi üzerine değişiklik yapılmasını gerektirecek herhangi bir kayda rastlanmamaktadır. 1950 yılında Katznelson, günümüzde AYÇ hastalığının farklı bir klinik formu olarak değerlendirilen “tozlu kabuk” olarak tanımlanan, turuncu pigmentasyon gösteren yavru çürüklüğü etkenini, AYÇ etkeninden farklı bir etken olan *Bacillus pulvifaciens* olarak tanımlamıştır (Genersch et al., 2006). Sonraki bazı araştırmacılar, etken üzerinde yaptıkları çalışmalarda, fenotipik karakterizasyon ve kültür ihtiyaçları açısından ayrı bir tür olarak değerlendirilmesini uygun görmemişler, etken uzunca bir süre klasifikasyon dışında bırakılmıştır (Genersch et al., 2006). Nakamura, gelişmekte olan DNA analizlerini uygulayarak, daha önce *Bacillus pulvifaciens* olarak tanımlanmış 34 suşu incelemiş, ilk önce kuvvetli katalaz aktivitesi gösteren 10 adedini, fenotipik karakterizasyona hiç uymadığı için çalışma dışı bırakmıştır. Kalan 24 suş üzerinde yaptığı fenotipik karakterizasyon çalışmaları, DNA saflaştırma, tekrar birleştirme ve G+C içeriklerine göre yaptığı çalışma sonunda aşağıdaki tablolarda detaylandırılan verileri elde etmiştir. Araştırmacı, elde ettiği veriler doğrultusunda, bakterinin *B. pulvifaciens* olarak tekrar klasifikasyona alınmasını önermiş, önerisi kabul görmüştür (Nakamura, 1984).

1992’de uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesinin “*Bacillus* Genusunun Taksonomisi Alt Komitesi” türlerin tanımlanması için gerekli minimum standartları belirlemiş, nomenklatör buna göre yeniden düzenlenmiştir. Bu komitenin tavsiyeleri doğrultusunda karşılaştırmalı 16S rRNA dizi analizi verilerine göre, 1991 yılında en az beş filogenik hatta sahip olduğu bildirilen

Bacillus hatlarından, grup 3 olarak belirlenen hatta bulunan bakterilere, diğer *Bacillus* türlerinden belirgin bir şekilde fenotipik özellikleri ve tür spesifik 16S RNA probu ile ayrılan aerobik endospor geliştiren *Paenibacillus* adında yeni bir tür olarak sınıflandırılması öngörülmüştür (Ash et al., 1993). Çalışma, *B. larvae* ve *B. pulvifaciens* suşları arasında çok yakın akrabalık olduğunu belirlemiş ve bu türler *Paenibacillus* genusu altında yeniden sınıflandırılmıştır. Bu düzenlemeye göre suşlar, *Paenibacillus larvae* ve *Paenibacillus pulvifaciens* olarak adlandırılmıştır.

Takip eden çalışmalarda, *P. larvae* ve *P. pulvifaciens* olarak adlandırılan bakteriler, SDS-PAGE, yağ asitleri, fenotipik karakterizasyon ve numerik analiz, DNA-DNA hibridizasyonu, DNA temel kompozisyonu, ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction Analysis) AFLP Analizi, RAPD metodları ile çalışılmış, *P. larvae* subsp. *larvae* ve *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* olarak tekrar sınıflandırılmışlardır (Heyndrickx et al., 1996).

Testin karakteristiği	<i>P. larvae</i>	<i>P. pulvifaciens</i>
Hareket	v	v
Eliptik sporlar	+	+
Santral ve subterminal sporlar	+	+
Şişkin sporlar	+/-	+/-
Anaerobik gelişim	+	+
Tiamin ihtiyacı	+	-
Eskülin hidrolizi	+	+
Arjinin dihidrolazı	-	+
Kazein hidrolizi	+	+
Sitrat kullanımı	-	-
Hidrojen sülfid üretimi	-	-
İndol üretimi	-	-
Jelatin eritme	+	+
Nitrat indirgeme	v	v
ONPG	-	-
Üreaz	-	-
Voges-Proskauer	v	v
Karbonhidratlardan asit üretimi		
N-Asetilglukozamin, D-Glikoz, Gliserol, D-Mannoz, Riboz ve D-Trehaloz	+	+
Mannitol	-	+
Salisin	+	-
D-Fruktoz, D-Galaktoz, metil-D-glikozid, ve D-Tagatoz	v	v

Tablo 2.1: *P. larvae* ve *P. pulvifaciens* suşlarının fenotipik karakteristikleri (Heyndrickx et al., 1996).

+: Pozitif

-: Negatif

+/-: Zayıf Pozitif

V: Değişken

Özellik	<i>P. larvae</i>	<i>P. pulvifaciens</i>	<i>P. alvei</i>	<i>P. validus</i>	<i>P. polymyxa</i>
Anaerobik gelişim	+	+	+	-	+
Arjinin dihidrolaz	-	+	-	-	-
İndol üretimi	-	-	+	-	-
Jelatini eritme	+	+	+	-	+
ONPG	-	-	+	-	+
Asit oluşturma					
N-asetilglukozamin	+	+	+	-	-
Maltoz	-	-	+	+	+
Niştasta	-	-	+	v	+
Sükroz	-	-	v	+	+
Mannitol	-	+	-	+	+
Salisin	+	-	v	-	+
d-Ksiloz	-	-	-	+	+
Karbohidrattan gaz	-	-	-	-	+

Tablo 2.2: *P. larvae* ve *P. pulvifaciens*'i yakın *Paenibacillus* türlerinden ayıran özellikler (Heyndrickx et al., 1996) .

+: Pozitif

-: Negatif

+/-: Zayıf Pozitif

V: Değişken

Suşlar	LMG no	% G+C	Suş ile % DNA eşleşmesi				
			6911	14427	14428	9820	14426
<i>P. pulvifaciens</i>	6911	43.3	100				
	14427	42.9	100	100			
	14428	42.0	99	100	100		
<i>P. larvae</i>	9820	42.3	90			100	
	14426	42.2		81		95	100

Tablo 2.3: *P. larvae* ve *P. pulvifaciens* suşlarının kendi aralarında ve içlerindeki DNA eşleşme verilerindeki G+C içerikleri (Heyndrickx et al., 1996)

Bu çalışmadan sonra, birbirine yakın olan alt türler üzerinde sınıflandırmaya yönelik çalışmalar devam etmiştir. 2004 yılında, Kilwinski ve arkadaşları, *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC49843) suşunun aşağıda detayları verilen karşılaştırmalı katalaz, plageman testleri, spesifik PCR reaksiyonu, BIOLOG biochemical fingerprinting system, 16S rDNA sekanslama gibi biyokimyasal ve genetik çalışmalar sonrasında *P. larvae* subsp. *larvae* olarak tekrar sınıflandırılmasını öngörmüşlerdir (Kilwinski et al., 2004).

Alt türler arasındaki bu yakınlık, araştırmacıların ilgisini çekmiş, gelişen moleküler tiplendirme metotlarının *P. larvae* alt türlerine uygulanmasıyla sınıflandırmada yeni bir yaklaşım şekillenmiştir. 2006 yılında Genersch ve arkadaşları, 44 adet *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* ve *P. larvae* subsp. *larvae* suşu ile 9 adet referens suş üzerinde uyguladıkları rep-PCR, PFGE, 16S rRNA sekanslama, API, API ZYM, biyoanaliz özellikleri gibi metotlar sonucunda, bu mikroorganizmaların alt tür ayrımı olmaksızın *Paenibacillus larvae* olarak tekrar sınıflandırılmasını öngörmüşlerdir (Genersch et al., 2006).

Mevcut sınıflandırma göz önüne alındığında, kaynaklarda (OIE Terrestrial Manual 2008; Ryba et al., 2009), *P. larvae*, Gram pozitif, yuvarlak uçlu, düz veya kıvrık 0,5 µm en, 1,5 ile 6 µm boyunda, mikroskopta iplikçikler veya zincirler şeklinde görülen, bazı suşları hareketli, santral veya subterminal sporlu basil olarak tanımlanmaktadır. Sporlar, dış koşullara sıra dışı dayanım sağlayan yedi koruyucu katmana sahiptir. Çevresel şartlara oldukça dayanıklı olup, doğada en az 30 ile 50 yıl canlı kalabilirler. Preperatlarda serbest olarak görülebilirler. Endosporlar, görüntü olarak diğer türlere benzese de, diğer *Bacillus* türlerinde sporlar enfektif değilken, *P. larvae*'da sadece sporlar hastalık yapma kapasitesine sahiptir (OIE Terrestrial Manual 2008; Ryba et al., 2009).

2.2 Dünya’da ve Türkiye’de Mevcut Durum

2.2.1 Dünya’da AYÇ hastalığının mevcut durumu

Tüm Dünya’da AYÇ hastalığı, arı kolonilerinin geleceğini, dolayısıyla arılara bağlı polinasyonu ve tarımsal üretimi de tehdit eden en önemli etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Genersch, 2010). Arıcılık sektörüne önem veren ülkeler de hastalıkla mücadelede başarılı olabilmek için ülkelerindeki arı

hastalıklarının yaygınlığına yönelik tarama çalışmaları yapmaktadırlar. Bu çalışmalara kısaca göz atacak olursak;

Antunez ve arkadaşları, 2001 ve 2002 yıllarında Uruguay'da gerçekleştirdikleri örneklemeleri takiben, klinik belirti gösterip göstermediği ayrımı yapmaksızın 101 bal örneğinden ülkesel bir *P. larvae* taraması gerçekleştirmişlerdir. Örnekler önce steril distile su ile sulandırılıp ısıtılardan geçirilmiş, ardından 9µg/ml nalidiksik asit eklenmiş J agara ekilmiştir. Ekimler sonrası *P. larvae* koloni yapısı gösteren, Gram pozitif, katalaz ve Voges-Proskauer negatif kolonilere PCR yöntemi uygulanmış ve 101 örneğin 52'sinde (% 51.5) *P. larvae* yönünden pozitiflik saptamışlardır. Araştırmacılar daha sonra spor sayılarına göre ülkesel AYÇ dağılımı haritasını oluşturup mücadele için öncelik verilecek bölgelerle ilgili, resmi makamlara yol göstermişlerdir (Antunez et al., 2004).



Şekil 2.1: Uruguay'da bal örneklerinde bulunan *P. larvae* sporu sayılarının dağılımı (Antunez et al., 2004).

Lindström ve arkadaşları, kuzey Finlandiya'da izole bir ortamda 13 arı kolonisi ile yaptıkları çalışmada, *P. larvae*'nin ana bulaşma kaynağı olarak koloni içini işaret etmişler, kolonide 100'den fazla hasta larva gözü bulunması halinde, hastalığın klinik belirtiler ve diğer kolonilere bulaştırma tehlikesinin oluşması nedeniyle tehlikeli olarak değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir (Lindström et al., 2008).

Gillard ve arkadaşları, 2004 ve 2005 yıllarında, İsviçre'de görsel olarak AYÇ görülüp görülmediğini not ederek 237 arı ve 67 bal örneğini kültür ve PCR yöntemleri ile incelemişlerdir. Araştırmacılar, klinik belirtilerde hastalık şüphesi

gösteren kolonilerden aldıkları örneklerde türüne göre % 83-100 oranında, klinik belirti göstermeyen kolonilerden aldıkları örneklerde ise yine türüne göre % 22-41 oranında *P. larvae* varlığı saptadıklarını bildirmişlerdir (Gilliard et al., 2008).

Peters ve arkadaşları, epidemiyolojik tarama çalışması sonucunda yaptıkları hesaplamalarla, Almanya North Rhine – Westphalia eyaletinde 1999 ile 2003 yılları arasında, her 1000 arı kolonisi başına 0,8 vaka, Bavaria ve Baden Wuttemberg eyaletlerinde ise her 1000 arı kolonisi başına 0,2 vaka yaygınlık saptamışlardır (Peters et al., 2006).

Fernandez ve arkadaşları, Eylül 2007 - Ocak 2008 arasında Arjantin’de dört arılıkta, 69 kovanda, tüm çerçevelerdeki enfekte larvaları sayıp skorlayarak, AYÇ ile mücadelede avantaj elde etmeye yönelik bir izleme çalışması gerçekleştirmişlerdir (Fernandez et al., 2010). Hiç enfekte larva olmayan koloni sağlıklı, 1-10 enfekte larva olan hafif, 11-50 enfekte larva olan orta ve 50’den fazla enfekte larva olan koloniler de şiddetli olarak sınıflandırılmışlardır. Kültür yöntemi ve biyo-istatistik değerlendirme sistemlerini kullanan araştırmacılar, örneklerin alındığı kolonilerde % 42 oranında subklinik AYÇ enfeksiyonu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, bu oranın klinik AYÇ hastalığı gelişimi için yüksek ve riskli bir seviye olduğunu bildirmişlerdir (Fernandez et al., 2010).

2.2.2 Türkiye’deki mevcut durum

Ülkemizde, AYÇ yaygınlığı ile ilgili çalışmalar, yasal nedenlerden dolayı (Anon-2011) uygulamaya yönelik saha çalışmalarından ziyade, genellikle anket çalışmaları şeklinde, farklı bölgelerde değişik araştırmacılar tarafından yapılmıştır.

Çakmak ve arkadaşları, 2003 yılında, Güney Marmara bölgesinde gerçekleştirdikleri genel tarama çalışmasında, kültür yöntemi ile AYÇ hastalığını saptamadıklarını bildirmişlerdir (Çakmak vd., 2003).

Borum ve arkadaşları, Güney Marmara’da, anket çalışması ve klinik muayene sonrası laboratuvar çalışmaları şeklinde yaptıkları çalışmada AYÇ hastalığını saptamadıklarını bildirmişlerdir (Borum vd., 2010).

AYÇ hastalığını, Türkiye’deki ülke genelinde gezici entansif arıcılık yapılan arılıklarda, anket, klinik muayene ve kültür yöntemi ile araştıran diğer

araştırmacılar (Kaftanoğlu vd., 1995, Aydın vd., 1999, Akmaz, 2001, Sıralı ve Doğaroğlu, 2005;, Şahinler ve Gül, 2005, Şimşek, 2008;, Yalçınkaya, 2008) ise hastalığın yayılış oranını % 13.76-% 29 arasında bulduklarını bildirmişlerdir.

Kültür metodu ve moleküler metodun birlikte kullanıldığı çalışmalarında, Kılıç ve arkadaşları; AYÇ hastalığından şüpheli 25 işletmeden aldıkları 100 arı larvası, bal ve balmumu örneğinden; larvalarda kültür metodu ile yedisinde pozitiflik, moleküler olarak PCR ile ise sekizinde pozitiflik, bir balmumu, yedi bal örneğinde pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir (Kılıç vd., 2010).

Ülkemizde yapılarak yayınlanmış olan son çalışmada, Güney Marmara bölgesinde, (Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çanakkale ve Yalova illeri) toplam 23 arılıktaki 725 kovan yavru çürüklüğü yönünden incelenmiş, şüpheli bulunan 19 arılıktaki 105 kovandan örnekler alınmış ancak hiçbir örnekte kültür veya PCR ile etkenin saptanamadığı bildirilmiştir (Borum vd., 2010).

2.3. AYÇ İle İlgili Yapılan Güncel Çalışmalar

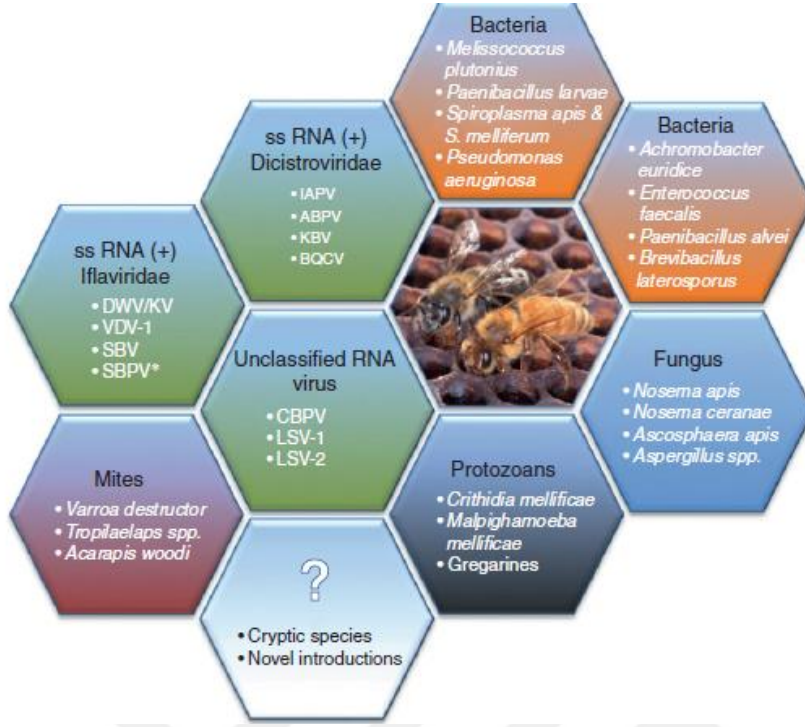
AYÇ hakkında son yıllarda yapılan yayınları incelediğimizde, rutin teşhis ve taramaların yanı sıra çalışmaların birkaç farklı alan üzerine yönlendiğini gözlemlemekteyiz.

- 1- Etken ve hastalığın tabiatı üzerine yapılan çalışmalar.
- 2- Korunma ve tedavi üzerine yapılan çalışmalar.
- 3- Teşhis metotlarının etkinliği üzerine yapılan çalışmalar.
- 4- Tiplendirme, karakterizasyon ve ileri düzey moleküler çalışmalar.

2.3.1 Etken ve hastalığın tabiatı üzerine yapılan çalışmalar

AYÇ etkeninin üzerine yapılan çalışmalar, diğer hastalık etmenleri ile etkileşimleri yönünden genel çalışmaların yanı sıra, etken ve patojenitesi, bakterinin çevresel etkileri ve etkileşimleri üzerine derinlemesine özelleşmiş çalışmalar olarak yayılmaktadır.

Evans (2011), genel olarak bal arısı hastalıklarını aşağıda şematize ettiği şekilde gruplandırarak AYÇ üzerine çalışmıştır.



Şekil 2.2: Küresel olarak bal arılarının sağlığını etkilediği kabul edilmiş olan “Bal Arılarının Patojenleri” şeması. “?”; diğer akarlardan çapraz geçişle etkileme potansiyeli olan parazitleri tanımlar (Evans 2011).

Kısaltmalar: SBV, Torba Çürüklüğü Virüsü (Sacbrood virus); VDV, Varroa destructor virüsü; IAPV, İsrail Akut Paraliz Virüsü (Israeli acute paralysis virüsü); BQCV, Siyah Kraliçe Virüsü (Black queen cell virus); KBV, Kashmir bee virus; ABPV, Akut Paraliz Virüsü (Acute bee paralysis virus); SBPV, Yavaş Paraliz Virüsü (slow bee paralysis virus); CBPV, Kronik Paraliz Virüsü (chronic bee paralysis virus); LSV, Snai Gölü Virüsü (Lake Sinai virus); Deforme Kanat Virüsü, [Deformed wing virus (DWV)] bir suşu olarak saptanmış olan Kakugo virüsü (KV) ile birlikte listelenmiştir. *, Bu virüsün klasifikasyonu yaygın olarak desteklenmesine rağmen yeterli oranda kabul görmemiştir.

AYÇ’nün vertikal ve horizontal olarak bulaşabildiğini, çiçek, nektar, polen ve su kaynaklarının kontamine olmasıyla fekal-oral yolla da bulaşabileceğini, *Lactobacillus spp.* ve *Bifidobacterium spp.* Bakterilerinin *P. larvae* üremesini baskıladığını bildirmiştir (Evans, 2011).

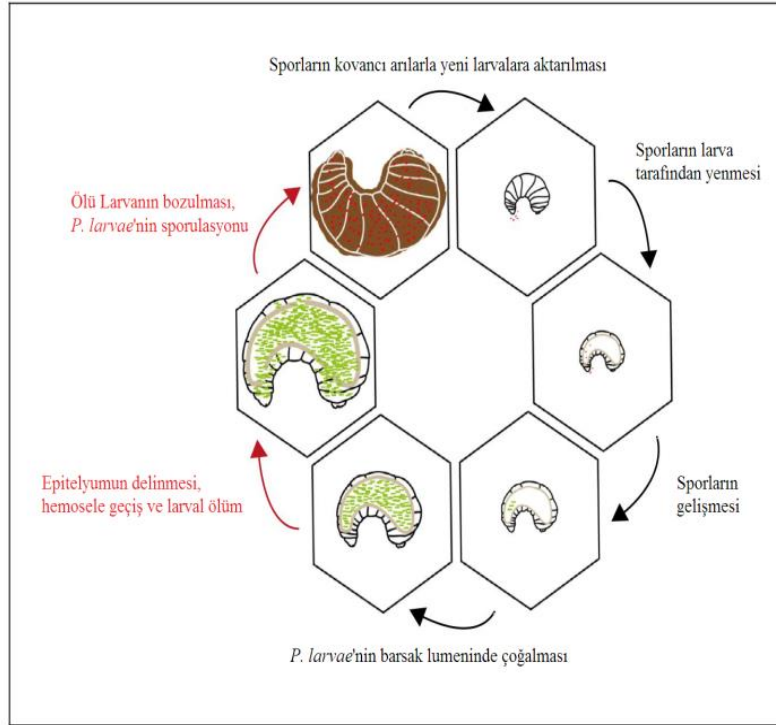
Adjlane ve ark. (Adjlane et al., 2014), enfekte ve sağlıklı kovanlardaki

- Çerçevelerden alınan işçi arılar,
- Petek gözlerinden alınan bal,
- Çerçeveden alınan balmumu,

-Koloniler arasından toplanan polen,

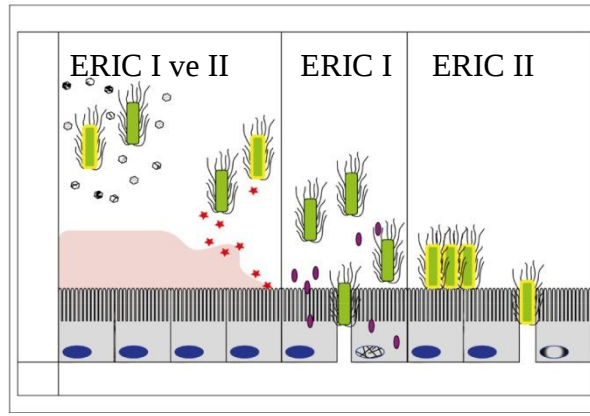
-Kovan dibinden toplanan artıklardan örnekleme yapmışlar, örnekleri kültür yöntemi ile çalışıp, kontamine kovanlardan alınan örneklerde % 40 - % 80, sağlıklı kolonilerden alınan örneklerde ise % 0 - % 20 arası AYÇ hastalığı yönünden pozitiflik saptamışlardır. Bu sonuçların, klinik belirti görülmeyen durumlarda bile hastalığın tehdit oluşturabileceğine işaret ettiğini bildirmişlerdir.

Poppinga ve Genersch (2015), *P. larvae*'nin patojenitesi üzerine yaptıkları araştırmada, etkenin Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) tiplerine göre hücresel düzeyde patojenitesini incelemiş, larva üzerindeki patojenitesini aşağıdaki gibi açıklamışlardır.



Şekil 2.3: AYÇ Hastalığının Şematize Edilmiş Patogenezi (Poppinga and Genersch, 2015).

Ayrıca araştırmacılar, etkenin ERIC I ve ERIC II tiplerinin patojenitesini aşağıdaki gibi şematize etmişlerdir (Poppinga and Genersch, 2015).



Enfekte larvanın hemoseli

Şekil 2.4: ERIC I ve ERIC II tiplerinin patojenitesi (Poppinga and Genersch, 2015).

Schild ve arkadaşları, düşük moleküler ağırlıklı *P. larvae* metabolitleri üzerine yaptıkları çalışmada, bu metabolitlerin larva üzerine toksik etkilerini saptamışlardır. Çalışmalarında en virulent suşun DSM 16116, benzer olarak DSM 16115 (ERIC II suşlar) virulent bulunduğunu bildirmişlerdir.

ERIC II ve ERIC IV suşlarının ERIC I suşlarından daha kısa inkübasyon süresine ihtiyaç duyduğunu, ERIC II ve ERIC IV suşlarının LT_{100} değeri 6-7 gün iken ERIC I suşlarında bu değerin, yaklaşık 12 gün olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. ERIC tipi bilinmeyen DSM 17237 suşunun özelliklerini ERIC II ile uyumlu bulmuşlar, ERIC I olan NRLL B-41635 suşunun ERIC II ile tam benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar, gelecekte bu metabolitler üzerinde çalışmanın patojenite, teşhis ve genetik çalışmalara yönelmesi ile daha faydalı olacağını bildirmişlerdir (Schild et al., 2014).

Neuendorf ve arkadaşları, *P. larvae* DSM 7030 (ATCC 9545) DSM 8442 ve *P. larvae* subsp. *pulvificiens* DSM 8443 suşları ile 86 saha izolatu, *P. larvae* DSM 16115 ve DSM 16116 (AB tipi) çalışmışlar, rep-PCR, Biolog sistem ile *P. larvae* subsp. *larvae* suşlarının metabolik profillerini ortaya koymuşlardır (Neuendorf et al., 2004).

Forsgren ve arkadaşları, suşların stabilitesi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Referens suşlar ve saha suşlarından oluşan 8 suşu 65°C'de 15

dakikadan, 93°C’de 10 dakikaya kadar farklı ısıtma işlemi karşı, ayrıca 1 aydan az, 6 aylık, 12 aylık ve 18 aylık depolama süreleri sonundaki dayanımları, gelişme oranlarının araştırılması üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar, referans suşlarda, ısıtma işlemleri sonunda genotipine göre değişen %0 ile %30 arasında bir yeniden canlanma oranı saptadıklarını bildirmişlerdir. Stabilitede ise, saklamada 1 aydan az sürede bile % 45 ile % 80 arasında kayıplar saptandığını bildirmişlerdir (Forsgren et al., 2008).

Antunez ve arkadaşları, virulens faktörü olma olasılığı bulunan, glikolitik yola katılan sitosolik bir enzim olan “enolase” üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar, enolazın bal arısı larvası üzerinde toksik ve immunojenik özelliklerini saptamış, larva gıdasındaki LC₅₀ değerini 4 ng/μl olarak saptamışlardır. Araştırmacılar, *P. larvae*’nin enolaz üretmesi ve bunun da patojenik indikatörlerden görülmesinden hareketle, Uruguay’da izole edilen 50 suşta, enolaz gen bölgesini üretmiş, klonlamış, saflaştırmış ve rekombinant proteini elde etmişlerdir. Enolaz toksisitesine yönelik çalışmışlar, 5, 50 ve 500 ng/μl enolaz içeren gıdalarla larvayı iki gün boyunca beslemişlerdir. En düşük doz olan 5 ng/μl dozda bile enolaz’ın yüksek toksisiteye sahip olduğunu, immunojenik bir protein olduğunu ve salınmasının plazminojen aktivatörü olma potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, enolaz’ın immunojenik olmasından hareketle, enolaz’ın Flourescein Antibody Test (FAT) ile tespitine yönelik çalışmışlardır (Antunez et al., 2011-1).

Genersch ve ark., (2005) farklı genotiplerdeki 17 suş kullandıkları patojenite düzeyini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada, 100 ile 800 CFU ml⁻¹ gıdada LC₅₀ dozlarını ve 6 ile 13 gün arasında değişen LT₁₀₀ değerlerini belirlemişlerdir.

Çalışmadaki larvaların % 100’ü spor içeren beslenme sonrası AYÇ’den ölmüştür (Genersch et al., 2005).

Behrens ve arkadaşları (2000) erkek ve işçi balarısı larvalarında *P. larvae*’nin letal enfeksiyon seviyesi üzerine bir çalışma yapmışlar, erkek larvalarının ölüm süresinin bir gün daha uzun olduğunu, mortalitenin de %10 kadar daha az olduğunu belirtmişlerdir (Behrens et al., 2010).

Djukić ve ark., *P. larvae*’nin patojenezini anlayabilmek için, DSM 25430 (ERIC II genotipi) ve DSM 25719 (ERIC I genotipi) suşlarının genom sekanslarını incelemişler, sırasıyla 4,056,006 bp büyüklüğü ve 3,928 protein

kodlayan gen bölgesi, ve 4,579,589 bp büyüklüğünde ve 4,868 protein kodlayan gen bölgesi barındırdığını, %44 ve %45 G/C içeriği, 23 ve 25 rRNA gen bölgesi, 79 ve 81 tRNA gen bölgesi, 75 ve 99 pseudogen, 256 ve 366 transpozon, 22 ve 8 faj bölgesi belirlemişlerdir. Her iki suşta da kollajenaz ve toksin gibi virulans ile ilişkili proteinleri kodlayan 9,7 kb plasmid geni bulunduğunu saptanışlardır. Bu sonuçlar, *P. larvae*'nın patojenitesinde plazmidlerin yerini belirlemek açısından da ayrıca önemlidir (Djukić et al., 2014).

2.3.2 Korunma ve tedavi üzerine yapılan çalışmalar

Evans (2011) yayınında, bal arılarının tüm patojenlerini sınıflandırarak ortaya koymuş, (Bkz. Şekil 2.2) AYÇ'nün vertikal ve horizontal olarak bulaşabildiğini, çiçek, nektar, polen ve su kaynaklarının kontamine olmasıyla fekal-oral yolla da bulaşabileceğini, ayrıca *Lactobacillus spp.* ve *Bifidobacterium spp.* bakterilerinin *P. larvae* üremesini baskıladığını bildirmiştir (Evans, 2011).

Evans (2004) bir çalışmasında abaecin ve defensin adı verilen iki antimikrobiyal peptidin *P. larvae*'yla etkileşimleri araştırılmış, özellikle abaecin'in ilk 24 saatte *P. larvae* gelişimine karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Evans, 2004).

Parvanov ve arkadaşları (Parvanov et al., 2006) üç arılıktaki toplam 119 kolonide antibiyotik kullanmadan tedavi seçenekleri üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar, karantina, hastalıklı çerçeveleri yakma ve % 4 NaOH ile dezenfekte etme prosedürünü içeren bir protokol ile hastalıklı kovanlarda AYÇ mücadelesinin etkinliğini araştırmışlardır. Bu süreçte klinik belirti gösteren kolonileri, besin olmaksızın 48 saat soğuk bir yerde tutulduktan sonra tamamen yeni kovanlara, yeni temel peteklerle aktarılmışlardır. 15 gün arayla iki kez kolonileri klinik yönden kontrol etmişler, balları da *P. larvae* sporları yönünden analiz etmişlerdir. Bir yıl sonra kontrol edilen kolonilerin hiç birinde hastalık saptamadıklarını, bu yöntemin mücadelede etkili olduğunu bildirmişlerdir (Parvanov et al., 2006).

Çalışmaya ait veriler Tablo 2.4'te verilmiştir.

Arılıklar	Koloni Sayısı	Hastalıktan Sönen Koloni Sayısı	Çalışılan Bal Arısı Sayısı	Kontamine Bal Arısı Sayısı	Oğul Verenler	Çalışma Sonundaki Kontamine Sayısı
1	43	7	36	7	7	-
2	64	8	56	18	18	-
3	12	5	7	3	3	-

Tablo 2.4 Antibiyotik kullanmadan tedavi sonuçları (Parvanov et al., 2006).

AYÇ nedeniyle ölen larva ve AYÇ sporları ile çeşitli düzeylerde kolonilerde deneysel enfeksiyon üzerine (Lindström et al., 2008) yapılan çalışmada, ilk yılda kolonilerde klinik belirti gözlenmemiş, ikinci baharda ölü larva verilen kolonilerde kontamine bal verilenlerden daha fazla klinik belirti gözlenmiştir. Yetişkin arı dışkılarındaki spor düzeyinde enfeksiyon kaynağı fark etmezken, klinik seyirde ölü larvalar, kontamine baldan daha tehlikeli bulunmuştur. Her iki durumda da ergin arıların kovan içine dışkılayarak bıraktığı sporların kovanı kontamine ederek büyük tehlike oluşturdukları bildirilmiştir (Lindström et al., 2008).

Diğer bir çalışmada araştırmacılar (Fries et al., 2006), iki yıllık dönemde AYÇ klinik belirtileri gösteren kolonilerin verdiği 25 oğul ve oğul veren ana kolonilerde AYÇ belirtileri üzerinde çalışmışlardır. Ana kolonilerin ikisinde hastalık klinik belirtileri görülen 20 - 30 göz saptanmış, kuru-ölü larva saptanmadığı bildirilmiştir. Yapılan muayenelerde; 21 ana koloniden 21'i, 25 oğuldan 22'sinin AYÇ pozitif yönünden bulunduğu bildirilmiştir. Sonuçlar SAS GLM prosedürüne göre istatistiksel analize tabi tutulmuş. Sonuçta hastalığın klinik belirti gösteren veya subklinik seyreden ana kolonilerden oğullara bulaştığının saptandığı bildirilmiştir (Fries et al., 2006).

Genersch tarafından yapılan bir çalışmada (2010), AYÇ hastalığının antibiyotikler ile tedavisinin etkinliği ve çevresel etkileri irdelenmiştir.

-Antibiyotik kullanımının enfektif form olan sporları etkilemediği, sadece baskılayarak klinik semptomları gizlediğini bildirilmiştir.

-Balda oluşan kalıntının insan tüketimi için ürün kalitesini düşürdüğü ve gıda güvenliği açısından riski arttırdığını bildirilmiştir.

-Antibiyotikli gıda ile beslenen larvalarda yaşama oranı ve yetişkinliğe ulaşan arılarda ömrün azaldığını bildirilmiştir.

-Oksitetrasiklin ve sulfathiazol'e dirençli suşların yaygınlaşmaya başlaması nedeniyle yeni antibiyotik arayışlarının başlaması, ancak kullanımdan önce artan direnç mekanizmalarının ciddi bir problem olarak görülmesi nedeniyle antibiyotik tedavisinin önerilmediği bildirilmiştir.

Araştırmacılar, tedavide;

-AYÇ'ne dayanıklı türler yetiştirilmesine önem verilmesi gerektiğini,

-Antagonistik tedavilerle biyokontrol yöntemlerinin geliştirilebileceğini,

-Esansiyel yağlar, propolis ve bitkilerle doğal tedavi yöntemlerinin dikkate alınması gerektiğini bildirmişlerdir (Genersch, 2010).

Schafer ve arkadaşları, küçük kovan böceği (*Aethina tumida*) zararlısının balarıları ve arıcıların dışında AYÇ mücadelesinde yeni bir zorluk yarattığını, *P. larvae* ile temas eden küçük kovan böceğinin enfekte olduğu spor sayısından bağımsız olarak, az miktarlarda maruz kalma ile bile kovanlara AYÇ bulaştırabildiğini bildirmişlerdir. Beş hafta içinde işçi arılarda ve balda yüksek sayıda spor saptadıklarını belirtmişlerdir. Bu nedenle etkenle mücadele edilirken küçük kovan böceği mücadelesinin de birlikte yürütülmesi gerektiğini bildirmişlerdir (Schafer et al., 2010).

Santos ve arkadaşları, AYÇ tedavisinde antibiyotiklere alternatif olarak *Andiroba* (Tropikal bölgelerde yetişen bir tür ceviz) ve *Copaiba* (Pelesenk) esansiyel yağlarının sırasıyla 1.56–%25, MIC değerinde 24 saat, 1.56–%12.5 MIC değerinde 48 saat maruz kalma sonrası canlı *P. larvae*'ya rastlamadıklarını, in-vitro olarak *Andiroba* ve *Copaiba* esansiyel yağlarının *P. larvae*'ya karşı yüksek etkinlikte olduğunu bildirmişlerdir (Santos et al., 2012).

Başka bir çalışmada araştırmacılar (Boligon et al., 2013), konvansiyonel antibiyotiklere gittikçe artan oranda dirençli olmaya başlayan etkene karşı alternatif tedavi imkanlarının geliştirilmesinin zorunluluğundan yola çıkarak, etkene karşı yerel bir ağaç türü olan *Scutia buxifolia* ağacının ham ve fraksiyonlarına ayrılmış ekstraktlarının etkinliğini disk difüzyon ve MIC değeri olarak araştırmışlardır. Araştırmacılar ayrıca ekstraktların toksik etkisini de

araştırmış, belirtilen MIC dozlarında, 15 günlük uygulamadan sonra herhangi bir toksik etkiye rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada araştırmacılar (Jaouani et al 2014), temelde bakteriosin benzeri moleküller içeren enterokok türlerinin, *Listeria monocytogenes* ve *P. larvae* ile mücadelede de önemi üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar, farklı kaynaklardan 300 adet bakteriyosin kodlayan gen içeren enterokok saptamışlar, bunların A, P ve L50 A/B enterosinlerini farklı kombinasyonlarda bulunduran 59 adedinin *L. monocytogenes* ve *P. larvae*'ya karşı yüksek etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Tedavi üzerine yapılan bir çalışmada araştırmacılar (Flesar et al., 2010), farklı kimyasal gruplardaki 26 bileşik ve seçilen 19 ham bitki ekstraktının *P. larvae*'ya karşı in vitro antibakteriyel etkisi ve toksisitesi üzerinde çalışmışlardır. Çalışmadaki maddelerden sırasıyla sanguinarine (MIC 4 mg/ml), ardından thymoquinone, capsaicin, trans-2-hexenal ve nordihydroguaiaretik asitin (MIC 4–32 mg/ml) en güçlü antibakteriyel etkiyi gösterdiğini bildirmişlerdir. Ekstraktlar içinde şerbetçi otu ve myrtle metanolik-dichloromethane ekstraktlarının 2 ile 8 mg/ml arasında değerlerle en yüksek antibakteriyel etkiyi gösterdiğini bildirmişlerdir. Yukarıdaki maddelerin ergin arılarda 100 µg/arı düzeyinde oral toksisitesini saptayamamışlardır. Araştırmacılar, literatürlerde belirtilenlerden daha etkili, kolay erişilebilen, ucuz ve düşük toksisiteye sahip olan bu maddelerin AYÇ mücadelesinde önemli bir potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada (Nguyen et al., 2013), Güney Kore'de izole ettikleri 1216 Aktinobakteri türünden *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Massilia*, *Chitinophaga*, *Kitasatospora*, *Actinomadura*, *Pseudosporangium*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis* ve *Micromonospora* olmak üzere 11 genusa ait türlerin 92 suşunda *P. larvae*'ya karşı antibakteriyel etki saptamışlardır.

Alternatif tedavi imkanlarının araştırıldığı bir çalışmada (Bastos et al., 2008) araştırmacılar, antibiyotiklere karşı gittikçe artan dirençlilik durumunda alternatif tedaviler için çalışmalar yapılmasının gerekliliğini düşünerek, antibakteriyel etkisi bilinen propolis ekstraktı üzerine çalışmalar yapmışlardır. Araştırmacılar, Brezilya'nın çeşitli bölgeleri ve ABD Minnesota'dan elde edilen propolislerin ekstraktlarından, difüzyon metodu ile *P. larvae*'ya karşı, çalışmaya vankomisin, tetrasiklin ve tylosin antibiyotikleri de katarak karşılaştırmalı bir antibakteriyel etki değerlendirmesi yapmışlardır. Çalışmaları sonucunda 0,12 mg

ile 1,7 mg dozları arasında değişen dozlarda propolis ekstraktının *P. larvae*'ya karşı antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada (Antunez et al., 2008) araştırmacılar, propolisin etanoldeki ekstraktı ile şeker şurubunu karıştırarak, AYÇ semptomları gösteren kolonilerde, % 0.52 MIC dozundaki uygulamalarda, baldaki spor sayısında önemli azalma saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, AYÇ mücadelesinde propolis ekstraktının kullanımının etkili, arılar için güvenli ve arıcılar tarafından kolaylıkla uygulanabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Alippi ve Reynaldi (Alippi and Reynaldi, 2006), *P. larvae*'ya karşı etkinlik potansiyeli olabilecek, arıcılık orijinli spor oluşturan aerobik bakterileri araştırmışlardır. *Bacillus subtilis* (m351), *B. pumilus* (m350), *B. licheniformis* (m347), *B. cereus* (mv33), *B. cereus* (m387), *B. cereus* (m6c), *B. megaterium* (m404), *Brevibacillus laterosporus* (BLAT169), *B. laterosporus* (BLAT170), ve *B. laterosporus* (BLAT171) olmak üzere on suşun *P. larvae*'ya karşı iyi antibakteriyel etkinliği gösterdiğini bildirmişlerdir. Rastgele seçilen bu suşların Tukey metodu ile değerlendirilmesinde *B. megaterium* (m404), *B. licheniformis* (m347), *B. cereus* (m6c), *B. cereus* (mv33), ve *B. cereus* (m387) suşlarının *P. larvae*'ya karşı en etkili suşlar olduklarını bildirmişlerdir.

Çevresel etkilerin araştırıldığı bir çalışmada (Dobbeleare et al., 2001), arıcılık sektöründe sporların taşınmasında önemli bir faktör olarak görülen ahşap kovan materyalinin dekontaminasyonu üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda; Etkili bir dezenfeksiyon için %50'nin üzerinde dezenfektan yoğunluğu gerektiğini, ısıt işlemlerin etkili olduğunu ancak, pürmüzle yakma işleminin sadece yüzeydeki sporları yok ettiğini, ahşabın içine işlemiş sporlara karşı etkili olmadığı bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada (Bilikova et al., 2012) araştırmacılar, antibakteriyel etkisi bilinen propolis ekstraktının bileşenleri üzerine çalışmışlar, kovanda normal olarak bulunan bu maddelerin mücadele için yeni ve önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Radyoaktivite ile dezenfeksiyon üzerine yapılan bir çalışmada (de Guzman et al., 2010) araştırmacılar, gamma radyasyon ile *P. larvae* sporlarının dezenfeksiyonu üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar, 15kGy D_{min} dozunda γ -ışımının AFB ile enfekte materyalin dezenfeksiyonu yönünden yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

Reynaldi ve arkadaşları (2007), makrolid grubu bir antibiyotik olan tilmicosin'in *P. larvae*'ya karşı etkisini in vitro ve in vivo olarak araştırmışlardır. Araştırmacılar, hastalıklı kovanlardaki uygulamalarında 55 gram şekere katılan 1000 mg tilmicosin ile tedavi sonrası 60 güne kadar AYÇ klinik semptomları görülmediğini bildirmişlerdir (Reynaldi et al., 2007).

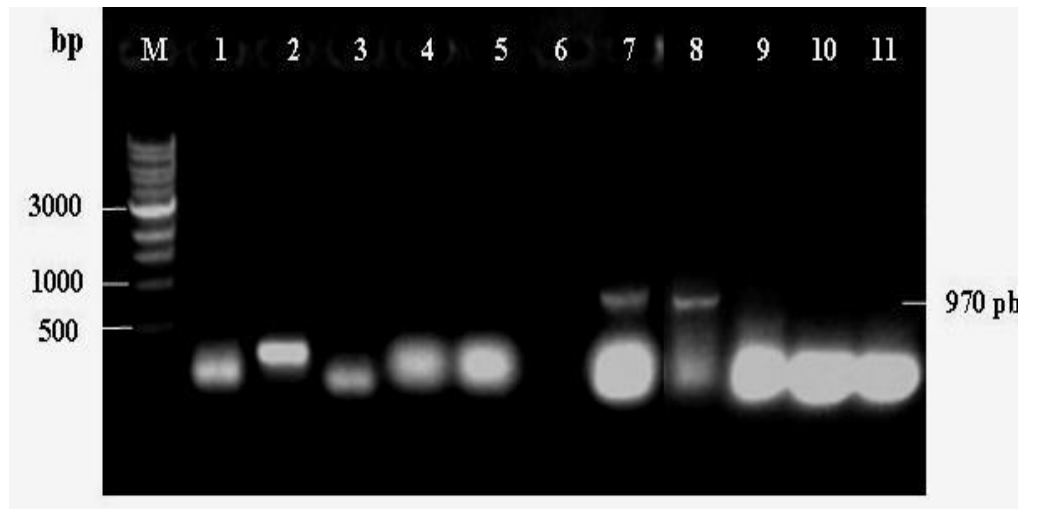
2.3.3- AYÇ'nin teşhis yöntemleri

2.3.3.1 Fenotipik yöntemler

Manuel fenotipik yöntemler

Bir çalışmada araştırmacılar (Abd Al-Fattah et al., 2010), kültür ve moleküler çalışmaları birlikte gerçekleştirmişlerdir. Mısır'da şüpheli kolonilerden yaptıkları örneklemelerde izole ettikleri mikroorganizmalara önce katalaz, amilaz, nitrat redüksiyonu, jelatinaz, kazeinaz ve Voges-Proskauer testleri uygulamışlar, Holst süt testi yapmışlar ve 9 adet *Bacillus spp.* ve 84 *P. larvae* saptamışlardır. Sonrasında kültürlerden DNA izolasyonu ve 973 bp uzunluğunda bir ampikon oluşturan primerler ile PCR uygulamışlardır.

Agaroz jelden ekstrakte ettikleri PCR ürünlerine sekans uygulayarak sonuçlarını doğrulamışlardır.



Şekil 2.5: Enfekte larvalardan elde edilen DNA örneklerinin PCR görüntüsü

1,2,3,4,5,6,9,10 ve 11 numaralı örnekler farklı bir basil, 7. ve 8. örnekler *P. larvae* olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir (Abd Al-Fattah et al., 2010).

Ticari kit veya otomatize sistem kullanılan fenotipik tanımlama yöntemleri

Fenotipik karakterizasyon için kullanılan başlıca ticari kit ve sistemleri, API (50 CH ve 20 E kitleri, Biomerieux), API ZYM (Biomerieux), BIOLOG Sistem (Biolog AG) ve MALDI-TOF (Biomerieux) Sistemidir.

Farklı bakteriler için uygun kitlerin seçimiyle identifikasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan API ve API ZYM sistemleri ile farklı zamanlarda, farklı araştırmacılar tarafından (Kilwinski et al., 2004; Genersch et al., 2006) *P. larvae* suşları ile çalışmalar yapılmıştır.

Kilwinski ve arkadaşları, biyokimyasal parmak izi oluşturma amaçlı çalışmalarında, API 20 E kiti kullandıklarını, *P.l. ssp. larvae* suşlarında jelatinaz aktivitesini zayıf pozitif, *P.l. ssp. pulvificiens* suşlarında pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, API 50 CH kiti kullandıklarında, *P.l. ssp. larvae* suşlarında gliserol, riboz, glikoz, mannoz, N-asetil-glikozamin, salisin ve trehaloz pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. *P.l. ssp. pulvificiens* suşlarından birinde riboz, glikoz, mannoz, mannitol, N-asetil-glikozamin ve trehaloz pozitif, diğer iki suşta ise gliserol, früktoz, maltoz, arbutin ve eskülin pozitif, mannitol negatif bulduklarını bildirmişlerdir (Heyndrickx et al., 1996; Kilwinski et al., 2004).

API ve API ZYM sistemlerinin kullanıldığı, taksonomiye yönelik diğer kapsamlı bir araştırmada (Genersch et al., 2006), *P. larvae* suşlarının dört farklı ERIC genotipinin fenotipik özellikleri çalışılmıştır.

ERIC I genotipi, mannitol fermentasyonu yönünden negatif, salisin fermentasyonu, alkalın fosfataz ve asit fosfataz yönünden pozitif bulunmuştur.

ERIC II genotipi, mannitol fermentasyonu yönünden pozitif, salisin fermentasyonu, alkalın fosfataz ve asit fosfataz yönünden negatif bulunmuştur.

ERIC III ve ERIC IV genotipleri ise, salisin fermentasyonu yönünden negatif, mannitol fermentasyonu alkalın fosfataz ve asit fosfataz yönünden pozitif bulunmuştur.

P. larvae suşlarını tanımlamak üzere bir standarda sahip bir diğer sistem olan BIOLOG Sistem ile yapılan çalışmalarda (Kilwinski et al., 2004; Neuendorf et al., 2004), *P. larvae* standardı olarak, N-asetil-D-glikozamin, D-trehaloz ve gliserol pozitif olarak bildirilmiştir. Glikojen, N-asetil-D-mannozamin, α -D-

glikoz, D-mannoz, 3-metil-D-glikoz, turanoz, pirüvik asit metil ester, pirüvik asit, L-alanine, adenozin, 2'-deoksiadenozin, inozin, timidin-5'-monofosfat ve üridin-5'-monofosfat ise zayıf pozitif olarak bildirilmiştir. Her iki araştırmacının sonuçlarında da referens suşların BIOLOG Sistem profillerinde kayda değer farklar gözlenmiş, ancak sistemin yazılımı tarafından suşların *P. larvae* olduğunun saptandığı bildirilmiştir.

Bakterilerin identifikasyonunda farklı bir identifikasyon sistemi olan MALDI-TOF ile çalışan araştırmacılar (Schafer et al., 2014), etkenin bu sistemle tanımlanabilmesi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Araştırmacılar, Almanya kökenli 68 suş ile çalışmışlar, kültür ile ürettikleri suşları identifiye etmişler, rep-PCR ve ERIC primerleri ile genotiplendirip ICMS uygulamışlar, MALDI-TOF ile çalışıp ERIC I ve ERIC II patotiplerinde *Burkholderia mallei* ve *B. pseudomallei* ile yakınlık saptadıklarını bildirmişlerdir. ERIC III ve ERIC IV patotiplerinde izolat sayısı az olduğu için anlamlı sonuçlar elde edemediklerini bildirmişlerdir.

2.3.3.2 Moleküler yöntemler

PCR temelli yöntemler

DNA izolasyon yöntemleri üzerine yapılan çalışmalar

Yaptıkları moleküler çalışma kapsamında, en uygun DNA ekstraksiyonu yöntemini belirlemeye yönelik çalışmalarında araştırmacılar; Konvansiyonel kimyasal yöntem, dondurma-çözündürme yöntemi ve ticari bir kitle ekstraksiyon yöntemi olmak üzere kullandıkları 3 farklı yöntemden, ticari bir kit ile yapılan DNA ekstraksiyonunu en uygun yöntem olarak bildirmişlerdir (Bakonyi et al., 2003).

Başka bir çalışmada, en uygun DNA izolasyon yöntemini saptamak üzerine çalışan araştırmacılar (D'ALESSANDRO et al., 2007), dondurma-çözündürme döngüleri ve spor ayrıştırma ile enzimatik DNA ekstraksiyonu olmak üzere iki farklı DNA ekstraksiyonu metodunu denemişlerdir. Materyal olarak bal ve ergin arılardan elde edilen örnek süspansiyonlarını kullanmışlardır.

Araştırmacılar, her iki yöntemle elde ettikleri DNA örneklerine 700 bp'lik bir amplikonu hedefleyen PL5 (5'-CGAGCGGACCTTGTGTTTCC-3') ve PL4 (5'-TCAGTTATAGGCCAGAAAGC-3') primer çifti ile konvansiyonel PCR

uygulamışlar, elde etikleri sonuçlar ışığında spor ayrıştırma ardından enzimatik DNA ekstraksiyonu yönteminin uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Dondurma- çözdürme döngüleriyle DNA ekstraksiyonunda, dilüe edilmiş arı örneklerinde inhibisyon saptamadıklarını, PCR hassaslığını 50 spor/reaksiyon olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. 6 döngüden az sayıda döngünün olumlu sonuç verdiğini, daha fazlasında sonuçların verimsiz bulunduğunu bildirmişlerdir. Dondurma- çözdürme döngüleriyle DNA ekstraksiyonu yöntemini, balda başarısız bulduklarını bildirmişlerdir.

Balmumunda kültüre gerek kalmadan *P. larvae* tanımlanabilmesi üzerine çalışan araştırmacılar (Ryba et al., 2009), Toluen metodu, Tween metodu, İzopropanol+Etanolla ekstraksiyon ve sporları suya aktarma olmak üzere dört yöntemle sporları balmumundan çıkarmışlar. En verimli yöntemin sporları suya çıkarma olduğunu saptadıklarını bildirmişlerdir. Ardından ticari bir kitle yaptıkları DNA ekstraksiyonu ve konvansiyonel PCR sonucunda elli örnekte altı pozitif sonuç saptadıklarını bildirmişlerdir.

16s rRNA gen bölgesi temelli yöntemler

Araştırmacılar, primer dizilimleri için etkene spesifik, değişken olmayan gen bölgelerini hedefledikleri çalışmalarda, yaygın olarak 16s rRNA temelli yöntemleri kullanmışlardır.

16s rRNA temelli özgün primer belirlemeyi hedefledikleri bir çalışmada, araştırmacılar (Govan et al., 1999), dizilimini belirledikleri, 973 bp uzunluğunda bir ampikonu hedefleyen 1 (5' AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC 3') ve 2 (5' GGAGACTGGCCAAACTCTATCT 3') primer çiftinin spesifitesini *P. larvae* ve yakın tür olarak gördükleri *P. alvei*, *P. polymyxa*, *Bacillus pumilus* ve *B. subtilis* bakterileri üzerinde denemiş, 973 bp'lik bir ampikonu hedef alan bu primerlerin diğer bakterilerle uyum oranını incelemişlerdir.

<i>P. larvae</i> primer ve türler	Sekans	<i>P. larvae</i> ile % Özdeşlik
Primer 1	AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC	100
<i>P. alvei</i>	AAGTCGAGCGGACTTGATGGAGT	70
<i>P. polymyxa</i>	AAGTCGAGCGGGGTTAATTAGAA	57
<i>B. pumilus</i>	AAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGC	66
<i>B. subtilis</i>	AAGTCGAGCGGACAGATGGGAGC	66
Primer 2	GGAGACTGGCCAAACTCTATCT	100
<i>P. alvei</i>	ACTTACTGGCGGGATCTCTATCC	61
<i>P. polymyxa</i>	GGAGACTGGCCAGATCTCTATCC	88
<i>B. pumilus</i>	GGAGACTGTTGGGATCTCTATCC	70
<i>B. subtilis</i>	GGAGACTGTTAGGATCTCTATCC	70

P. larvae PCR primerlerinin nükleotid sekansları diğer iki yakın *Paenibacillus* türü ve iki *Bacillus* türleri ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 2.5 *P. larvae* PCR primer sekanslarının diğer türlerin nükleotid sekansları ile özdeşliği (Govan et al., 1999).

Yukarıda belirtilen suşları uygun besi ortamlarında ürettikten sonra DNA ekstraksiyonu yapıp yukarıdaki primer çiftini kullanarak uyguladıkları PCR protokolü ile %100 bir spesifite saptadıklarını, yakın görülen diğer bakteri türleri ile PCR ürünü oluşmadığını bildirmişlerdir. Yöntemin tespit limitini 50 cfu/ml olarak belirlemişlerdir.

Araştırmacılar, bu PCR koşullarının kültür yöntemi ile izole edilen suşların konfirmasyonu için kullanımının uygun olacağını bildirmişlerdir (Govan et al., 1999).

Kullanılan PCR yöntemleri için özgün primer belirleme amacıyla yapılan bir başka çalışmada araştırmacılar (Dobbelaere et al., 2001), suşlardan ve direkt petek materyalinden iki farklı yöntemle DNA ekstraksiyonu, ardından dört farklı primer kombinasyonu ile PCR uygulamışlardır.

Primer 1	5'CTTGTGTTTCTTTTCGGGAGACGCCA3'
Primer 2	5' TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG3'
Primer 3 (Govan et al., 1999)	5' AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC3'
Primer 4 (Govan et al., 1999)	5' TCTATCTCAAAACCGGTCAGAGG3'
Kombinasyon 1–2	Amplikon uzunluğu: 1106 bp
Kombinasyon 1–4	Amplikon uzunluğu: 970 bp
Kombinasyon 3–2	Amplikon uzunluğu: 1119 bp
Kombinasyon 3–4 (Govan et al., 1999)	Amplikon uzunluğu: 983 bp

Tablo 2.6: Çalışmada kullanılan primerlerin ve bu primerlerin dört farklı kombinasyonla teorik olarak hedeflediği amplikonların uzunlukları. (Dobbelaere et al., 2001)

Primerler belirlenirken 16S rRNA bölgesinden X 60619, U 85263, U 86605 ve U 86606 genomları baz almışlar. Vector NTI programı ile amplikonların hizalamasını kontrol etmişler, primer setleri denenmiştir. Tüm setler, *P.l.* subsp *larvae* için spesifik bulunmuş, *P.l.* subsp *pulvifaciens* suşlarıyla da pozitif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. DNA miktarı az olan örneklerde PCR ürünü saptayamamış, bunun DNA ekstraksiyonundaki yetersizlikten kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışma, saha örneklerinden direkt DNA ekstraksiyonu ve PCR yapılabileceğini ilk ortaya koyan çalışma olması açısından önemlidir. Bu çalışmada kullanılan 1106 bp'lik bir amplikon üreten primer çifti, sonraki yıllarda uluslararası otoriteler tarafından da kabul görerek kullanımı önerilmiştir (Dobbelaere et al., 2001-2).

Kültüre edilmiş etkenin moleküler identifikasyonu üzerine çalışan araştırmacılar (Piccini et al., 2002), çalışmalarında 8 adet *P.l.* subsp. *larvae* suşu ile, bal arısı kolonilerinden izole edilmiş 9 diğer suş üzerinde çalışmışlardır.

Suşları uygun ortamlarda kültür ile üretmişler, spor varlıkları ve morfolojilerini kontrol etmişler, sonrasında DNA ekstraksiyonu yapıp, 16S rRNA bazlı, 700 bp'lik amplikon üreten PI5: 5'-CGAGCGGACCTTGTGTTTCC-3' (8 ile 27 arası), ve PI4: 5'-TCAGTTATAGGCCAGAAAGC-3' (707 ile 688 arası) primerleri ile PCR uygulamışlardır.

Çalışmalarında tespit limiti 3.2 CFU/ml olarak saptadıklarını, *P.l.* subsp *larvae* yanı sıra *P.l.* subsp *pulvifaciens* suşlarıyla da pozitif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir.

Moleküler yöntemlerin güvenilirliği ve etkinliği üzerine yapılan bir başka çalışmada araştırmacılar (Lauro et al., 2003), 29 ticari bal, 18 adet yerel üreticiden temin edilen bal, 9 hastalıklı çerçeveden alınan bal olmak üzere toplam 56 örnekle çalışmışlardır. Örneklerden yaptıkları ekimlerden elde ettikleri suşların pozitifliklerini Plageman 1985 ve PPL 1c fajları ile saptamışlardır.

PCR çalışmalarında pozitif kontrol olarak ATCC 9545 ve NRRL B-3555 *P.l.* subsp *larvae*, ATCC 49843 *P.l.* subsp *pulvifaciens* suşlarını, negatif kontrol olarak da ATCC 6633 *Bacillus subtilis* suşunu kullanmışlardır.

Örneklerden elde ettikleri kültürdeki suşlardan DNA ekstraksiyonu yapmış, sensitiviteyi arttırmak için 16S rRNA hedefli nested PCR uygulamışlardır.

Primerler	Dizilimleri	Pozisyonları	
External	969 base pair products		
PleF	TCG AGC GGA CCT TGT GTT	7	– 24
PleR	CTA TCT CAA AAC CGG TCA GAG	955	– 975
Internal	572 base pair products		
PliF	CTT CGC ATG AAG AAG TCA TG	136	– 155
PliR	TCA GTT ATA GGC CAG AAA GC	688	– 707

Tablo 2.7:Primerlerin *P. larvae* 16S rRNA geni içindeki dizilimleri ve pozisyonları (Lauro et al., 2003)

Dizilim pozisyonları, kısmi SSU-rDNA dizilimi ile yakın ilgilidir.(GenBank accession no. AY030079).

Elde ettikleri PCR ürünlerini klonlayıp sekans analizine tabi tutmuşlardır. Yöntemin taze kültürlerde, baldaki PCR inhibitörlerinin yokluğunda etkili olduğunu, tespit limitinin de < 6 cfu/ml düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmacılar ilk defa altın standart olarak belirlenmiş olan kültür yönteminin yeterliliğini tartışmaya açmış, nested PCR yönteminin kültür ve fajla identifikasyondan daha etkili olduğunu savunmuşlardır (Lauro et al., 2003).

Spesifik genlerin veya ampikonların kullanıldığı yöntemler

Direkt olarak enfekte materyalden *P. larvae* subsp. *larvae*'nın alt tür düzeyinde PCR ile saptanması hususunda bir çalışma yapan araştırmacılar (Alippi et al., 2004), ERIC-PCR kullanarak, 970 ve 550 bp'lik bir ampikonu hedefleyen KAT-1 ve KAT-2 primerleri ile kültür ve enfekte materyalden konvansiyonel

PCR yöntemini çalışmışlar, yöntemin hem suşlardan, hem de enfekte materyalden olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Alt tür ayrımının geçerli olduğu zaman dilimi içinde, PCR ile alt tür ayrımını yapabilmeyi amaçlayan bir çalışmada araştırmacılar (de Graaf et al., 2006-2), önce suşları önce besi yerlerinde üretmişler, sonra IC 9 fragmentinin varlığı ile ilgili (5'-CCAGCTC AAAATCCTACGGT-3' forward primer ve 5'-CATG GGATTTTCTTCGGGAG-3' reverse primer) kullanarak 606 bp'lik bir amplikon üreten bir PCR uygulamışlar, bu teknikle *P.l. larvae* ve *P.l. pulvificiens*'i ayırabildiklerini bildirmişlerdir. Ancak yine araştırmacılar tarafından, yöntemde tartışmaya açık noktalar olduğu da bildirilmiştir.

Birden fazla gen bölgesi temelli çalışmalar

Moleküler yöntemlerle kültür yöntemlerinin birlikte uygulandığı bir çalışmada (Bakonyi et al., 2003), araştırmacılar, AYÇ teşhisinde, izolasyon ve biyokimyasal karakterizasyon ile geliştirilen PCR analizlerini karşılaştırmışlardır. Farklı DNA ekstraksiyon, farklı primer çiftleri ile PCR ve sekans analizi ile kültür yöntemlerini karşılaştıran araştırmacılar; Tablo 2.9'daki primer dizilimlerini kullanmışlardır.

Primer ^a	Dizilimleri (5 to 3)	Orijini	Nükleotid pozisyonları	Amplikon Uzunluğu (bp)
AF 1f	GCT CTG TTG CCA AGG AAG AA	16S rRNA	436-455	451
AF 2r	AGG CGG AAT GCT TAC TGT GT		868-887	739 ^b
AF 3r	TGT CAC CGG CAG TCA TCT TA	16S rRNA	1156-1175	
AF 4f	CTG GCG GCG TGC CTA ATA CA	16S rRNA	30-49	374
AF 5r	GGC GTT GCT CCG TCA GAC TT		385-404	
AF 6f	GCA AGT CGA GCG GAC CTT GT	16S rRNA	51-70	237
AF 7r	GCA TCG TCG CCT TGG TAA GC		269-289	
AF 8f	GGA GTA ACT GCC CCT GGA GT	16S rRNA	464-483	695
AF 9r	CTT AGA GTG CCC ACC TCT GC		1140-1159	
AF 10f	TAG GCC ATG AAT TGA CTC AC	Metalloproteinase	89-108	155
AF 11r	TAT TCG GCG TAT ACA CGT CT		225-244	
Paeni 30f	CGT ATT CAG AGA CGG TGA TG	Metalloproteinase	30-49	242
Paeni 253r	TCT AAG GAA CGG AGA GCA TC		253-272	
PBL 8f	CTT TCT GGA ACG GGC AGC AA	Metalloproteinase	8-27	342
PBL 350r	GTA TGA ACG CCG CCG TTA TC		331-350	
PL 1f ^c	AAG TCG AGC GGA CCT TGT GTT TC	16S rRNA	53-75	971
PL 2r ^c	TCT ATC TCA AAA CCG GTC AGA GG		1002-1024	

Tablo 2.8: *P. larvae* PCR'ı için seçilen oligonükleotid primerleri (Bakonyi et al., 2003).

f, forward primer; r, reverse primer. En iyi sonucu veren primer çiftleri koyu olarak belirtilmiştir.

^aAF 1f primeri ile. ^bPrimerler Govan ve arkadaşlarınca yayınlanmıştır.

Araştırmacılar, kullandıkları dokuz çift primerin tespit limitinin yüksek olduğunu ve spesifitenin istenen düzeyde olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılarca en duyarlı bulunan 237 bp'lik bir ampikonu hedefleyen AF6 ve AF7 primer çiftinin, diğer yöntemlerle pozitif olduğu saptanmış 14 örneğin sadece 12'sinde pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Kullanılan primer çiftleri ve PCR protokollerinin 3.2-33.8 CFU düzeyi altındaki kontaminasyonları tespit etmekte yetersiz kaldığını bildirmişlerdir.

Yaptıkları sekans analizleri sonucunda, *P. l. larvae* ile % 100 uyum gösteren BLAST taramasının, *P. alvei* ile yapılan sekans analizinin *P. alvei* ile % 99.34, *P. l. larvae* ile %93.13 eşleştiğini bildirmişlerdir.

Çalışmalarında kullandıkları AF6 ve AF7 primer çiftinin tespit limiti 0.05 CFU, AF1 ve AF2 primer çiftinin tespit limiti 0.9 CFU olarak saptanmıştır. Metalloproteinaz gen bölgesi hedefli primer çiftlerinin tespit limiti, 10^5 - 10^7 CFU olarak bulunmuştur.

AF6 ve AF7 çifti 2.6 CFU *P. alvei* ve 11 *B. subtilis* saptamış, metalloproteinase geni hedefli primer çiftleri 10^7 CFU olan diğer bakterileri saptamışlardır (Bakonyi et al., 2003).

Kapsamlı bir metot karşılaştırmasında araştırmacılar (de Graaf et al., 2006-1), önemli bir patojen olan *P. larvae* ile ilgili uygulanmış olan tüm testleri değerlendirerek materyale ve yöneme göre avantajlı ve dezavantajlı yönleri ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada *P. larvae* suşlarına uygulanan Kültür, PCR, SDS-PAGE, RFLP (restriction fragment length polymorphism), ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis), RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), PFGE ve REP (repetitive extragenic palindromic)-PCR, ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) ve BOX, faj duyarlılık ve immunoteknikleri derleyerek sonuçları diğer araştırmacılara, çalışmalarında kılavuz olmak üzere sunmuşlardır.

Real-time PCR temelli yöntemler

Konvansiyonel PCR yönteminden daha yeni bir yöntem olan real-time PCR yönteminin *P. larvae* saptanmasına yönelik az sayıda da olsa çalışmalar mevcuttur. Henüz resmi otoritelerce kabul edilip önerilen yöntemler arasında olmasa da yöntemdeki gelişmeler, uygulama yönünden dikkate değerdir.

Real-time PCR yöntemi ile AYÇ hastalığının, taşınabilir, sahada kısa sürede pratik ve kesin bir şekilde teşhis edebileceği kompakt bir cihazın kullanılabilirliği üzerine yaptıkları çalışmalarında, araştırmacılar (Sang-Hoon Han et al., 2008), izole ettikleri *P. larvae*, *M. plutonius*, *B. subtilis*, *P. alvei*, *Enterococcus faecalis* ve *E. coli* suşları üzerine, U85263, U86605, X60636 ve X60619 sekansları baz alınarak 233 bp'lik bir amplikon üreten (16SNF (5'-GTGTTTCCTTCGGG AGACG-3', U85263 içinde 65–83 arası); 16SNR (5'-CTCTAGGTCGGCTACGCATC-3', U85263 içinde 278–297 arası) bir real time PCR yöntemi uygulamışlar, yöntemin tespit limitini 50 fg ve 11.3 *P. larvae* kromozomu olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Hastalıkların teşhisinde PCR uygulamalarının sensitivitesi ve hızı nedeniyle gittikçe yaygınlaştığını belirtmişler, bu yöntemin (DNA izolasyonu ve erime noktası dahil) tüm teşhise yayılabileceğini bildirmişlerdir. Kendi kullandıkları gibi kompakt, bilgisayarla entegre cihazlarla PCR yönteminin laboratuvar yerine sahada uygulanabilmesinin sahadaki tüm teşhis ihtiyacını karşılayabileceğini bildirmişlerdir. Çalışma verilerine göre kullandıkları yöntemin *P. larvae* ve diğer bal arısı patojenlerinin teşhisinde hızlı ve inandırıcı teşhis için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Real-Time PCR yönteminin AFB teşhisinde kullanımı üzerine başka bir çalışma gerçekleştiren araştırmacılar (Martinez et al., 2010), çalışmalarında, mikroskopi ve biyokimyasal karakterizasyon ile identifiye ettikleri JM 87 kodlu *P. larvae* suşunu kullanmışlardır. Moleküler karakterizasyon için, 16S rRNA gen hedefli 8 F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' ve 1392 R (5' ACGGGCGGTGTGTAC 3') primer çifti ile PCR uygulamışlardır. PCR ürünlerini jelden izole ederek sekans uygulamış, sonuçlarını doğrulamışlardır.

Çalışmada spesifiteyi belirleyebilmek için *Paenibacillus alvei* III3 DT-1A, *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842T, *Paenibacillus macerans* BKM B-51, *Bacillus licheniformis* ATCC 8480, *Bacillus subtilis* SB305, *Bacillus megaterium* ATCC 19213 ve *Bacillus pumilus* ATCC 7061, ve *Escherichia coli* suşlarını da çalışmaya dahil etmişler, DNA ekstraksiyonunu takiben PL2-Fw (5' CGGGAGACGCCAGGTTAG 3') ve PL2-Rev (5' TTCTTCCTTGGCAACAGAGC 3') primerleri ile real-time PCR yöntemi,

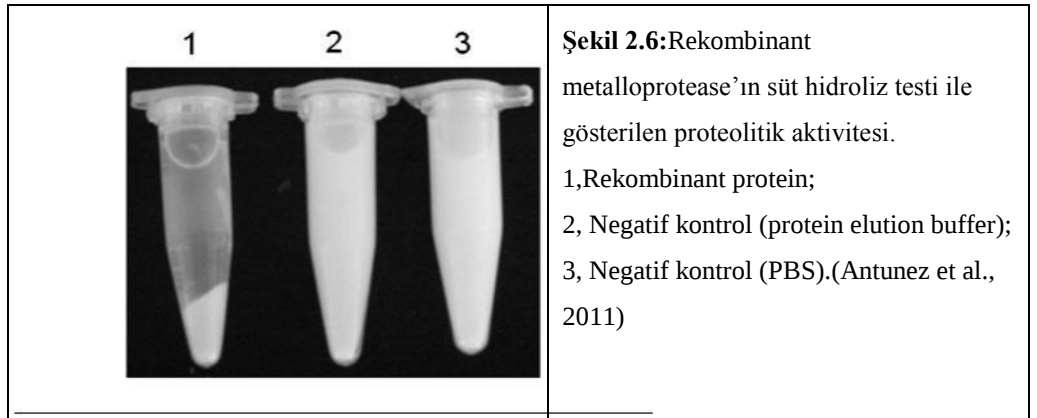
ayrıca bütün suşlara epifluoresan mikroskopi ve akım sitometrisi metotlarını uygulamışlardır.

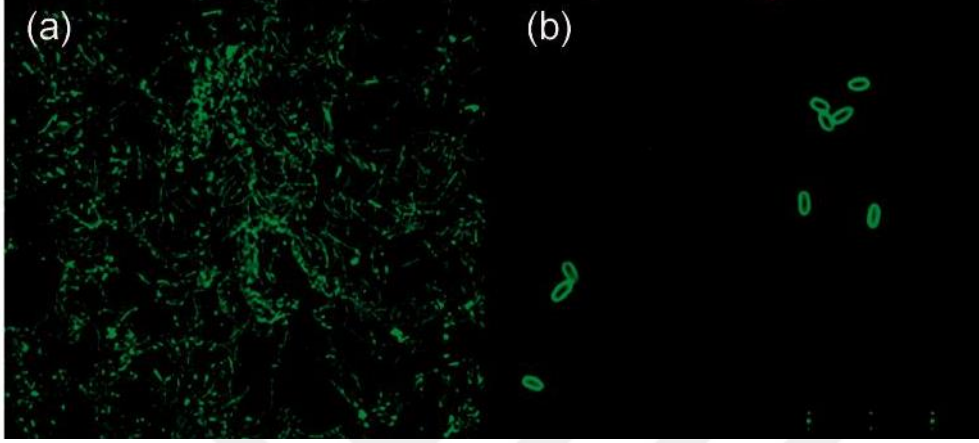
Araştırmacılar, çalışmaları sonucunda real-time PCR yönteminin hızlı, 2 spor/örnek hassasiyette ve yanlış pozitif sonuç vermeyen bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (Martinez et al., 2010).

Bir diğer çalışmada araştırmacılar (Chagas et al., 2010), , daha önceden optimize edilmiş olan klasik PCR yöntemlerindeki bazı zayıflıkları giderebilmek ve daha hızlı sonuç alabilmek için real time PCR yöntemi üzerine çalışmışlardır. Çalışmalarında 16S rDNA içinden GenBank tarafından tanımlanan X60619 sekansından 74 bp'lik bir amplikonu hedefleyen bir primer çifti (*Pltr-F* ve *Pltr-R*) ve SYBR Green probu kullanmışlardır. Araştırmacılar, yöntemin *P.larvae* için %100 spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada yöntemin tespit limitini, örnek başına 6 pg DNA olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

Floresan ile teşhis alnında çalışmalar yapan araştırmacılar (Antunez et al., 2011-2), *P. larvae*'nin metalloproteinaz üretmesi ve bunun da patojenik indikatörlerden görülmesinden hareketle, Uruguay'da izole edilen 50 suşta, metalloproteinaz gen bölgesini üretmiş, klonlamış, saflaştırmış ve rekombinant proteini elde etmişlerdir. Elde edilen ürün fareye inoküle edilip, anti-serum elde etmişler, serumun spesifitesi tespit edip, FITC ile konjuge etmişlerdir. Elde ettikleri spesifik konjugatı, Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) ve immunfluoresan analizlerde kullanmışlardır.





Şekil 2.7: *P. larvae* vejetatif bakterileri (a) ve sporlarında (b) immunfloresans ile konfokal mikroskopide metalloprotease belirlenmesi. (Antunez et al., 2011)

Araştırmacılar, konjugatın kültürlerde kullanılabileceğini, ancak *Photorhabdus luminescens* gibi diğer böcek patojenleri ve Gram (-) etkenlerde de saptanabileceğini bildirmişlerdir (Antunez et al., 2011-2).

2.3.4 Tiplendirme, karakterizasyon ve ileri düzey moleküler çalışmalar

P. larvae subsp. *larvae* suşlarının moleküler tiplendirmesi üzerine çalışan araştırmacılar (Alippi et al., 2002), içinde 17 adet *P.l.* subsp *larvae*, 5 adet *P.l.* subsp *pulvifaciens* olan toplam 86 suş üzerinde RFLP yöntemi ile çalışmışlar, *P.l.* subsp *larvae*, ile *P.l.* subsp *pulvifaciens* arasında % 90 benzerlik tespit etmişlerdir (Alippi et al., 2002).

Peters ve arkadaşlarınca (2006), 54 aralıktaki 80 bal ve 32 yavrulu petek örneğinden 2003 ve 2004'te tespit edilen (Güneydoğu North Rhine – Westphalia) 176 suş, rep-PCR ile BOX-AIR ve MBO REP-1 primerleri ile çalışılarak; AB, Ab, A6, ab ve a6 genotiplerinin saptandığı bildirilmiştir (Peters et al., 2006).

P. larvae genotiplerinin patojenitesi üzerine çalışan araştırmacı (Genersch 2010), çalıştığı dört ERIC tipinden LT₁₀₀ değeri baz alınarak yapılan

değerlendirmede, ERIC II ve ERIC IV'ün daha patojen olduğunu saptadığını bildirmiştir. ERIC III ve ERIC IV tiplerinin sahada çok fazla izole edilemediğini, bu nedenle ERIC I ve ERIC II tiplerinin ana patojenler olarak kabul edilebileceğini bildirmiştir.

Tür	<i>Paenibacillus larvae</i>			
Eski alt türler	<i>P. l. larvae</i>		<i>P. l. pulvifaciens</i>	
ERIC genotipi	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
AYÇ semptomları, Patojenite	Evet	Evet	Evet	Evet
^{LT} 100	12 gün	7 gün	7 gün	7 gün
Kötü tabiatlı hastalık gelişimi	Evet	Evet	Henüz belirlenmedi	Henüz belirlenmedi
Pigmentli koloni morfolojisi	Hayır	Evet	Evet	Hayır
CSA'da hemoliz	Hayır	Hayır	Evet	Evet
Mannitol fermentasyonu	Hayır	Evet	Evet	Evet
Salisin fermentasyonu	Evet	Hayır	Hayır	Hayır

Tablo 2.9: *P. larvae* genotiplerinin ERIC I, II, III, ve IV karakteristikleri (Genersch 2010)

Pigment oluşturmeyen ERIC I'in en önemli patojen olduğunu, pigment oluşturan ERIC II'nin koloni pigmentasyonu nedeniyle hatalı olarak teşhis edilebildiğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar ayrıca, AYÇ'nin Dünya'daki yayılışının anlaşılabilmesi için, universal primerlerle tüm suşların çalışılmasının hedeflenmesi gerektiği tezlerini araştırmacılarla paylaşmışlardır.

Dingman ve arkadaşları, farklı kaynaklardan elde edip, identifiye ettikleri *P. larvae* suşlarına, T7, Spb, 16S-Reg2 ve 23S-Reg-10 oligonükleotid primerleri kullanarak sekans analizlerini yapmış, 3TS-PCR fingerprint profillerini çıkarmışlardır. Araştırmacılar, tartışma kısmında, universal primerlerin sadece saf kültürlerde eşsiz bir DNA fingerprint verdiğini belirtmişlerdir (Dingman et al., 2012).

Bulgaristan'daki *P. larvae* suşlarının moleküler tiplendirmesi konusunda çalışan araştırmacılar, klinik semptom gösteren kolonilerden izole edilen 96 saha suşu, NBIMCC 8478 referens suşu ve bal örneklerinden saptadıkları 20 suş ile çalışmışlardır. Araştırmacılar, moleküler tiplendirme için BOX-AIR, MBO REP

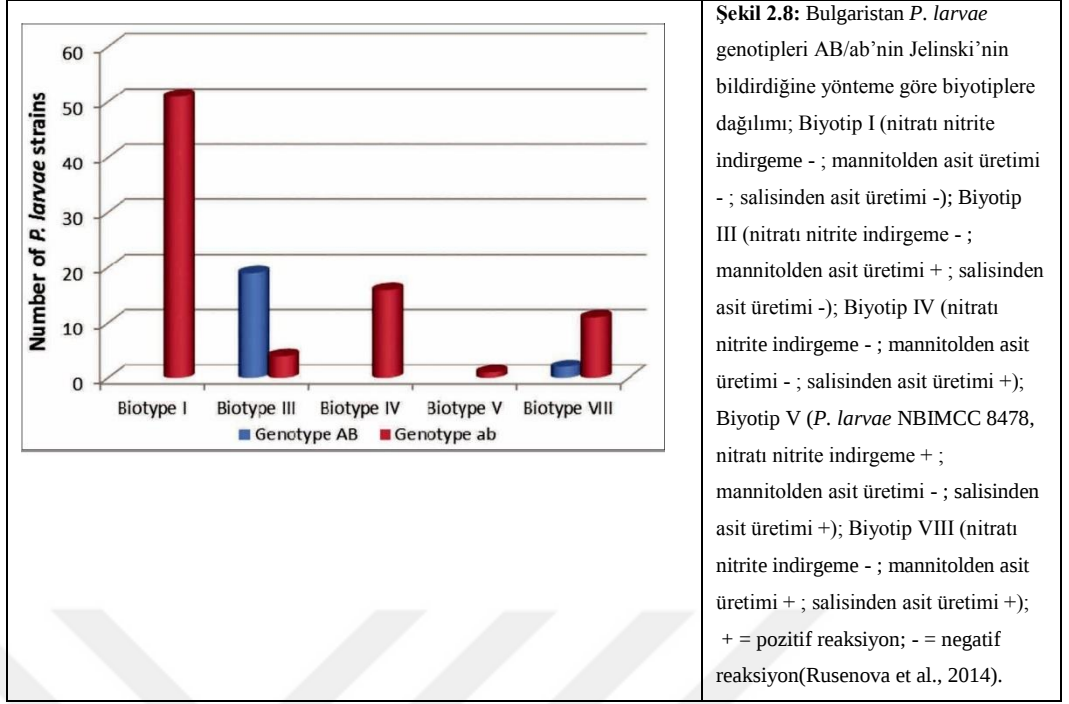
1, EIC I R, ERIC 2 primerlerini kullanmışlardır. Sonuçta Bulgaristan'da ab ve AB olmak üzere iki genotip saptamışlar, ERIC I ve ERIC II tiplerinin varlığını belirlemişler, ancak ERIC III ve ERIC IV için kullandıkları yöntemin yetersiz kaldığını bildirmişlerdir (Rusenova et al., 2013).

Arılık	Bölge	İzolat sayısı	Genotip
1	NC	12	ab
2	NC	18	ab (16)/AB (2)
3	NW	7	ab
4	SC	8	AB
5	SC	3	ab
6	SC	10	AB
7	SE	5	ab
8	SE	4	ab
9	SE	1	AB
10	SE	4	ab
11	SE	12	ab
12	SE	8	ab
13	SW	4	ab
Toplam		96	ab (75)/AB (21)
%			78.1 ve 21.9

Tablo 2.10: Bulgar arılıklarında *P. larvae* genotiplerinin dağılımı (Rusenova et al., 2013).

NC: Kuzey-orta, NW: Kuzey-batı, SC: Güney-orta, SE: Güney-doğu, SW: Güney-batı

Rusenova ve arkadaşları bir diğer çalışmalarında, Bulgaristan'da izole ettikleri 103 suş ve NBIMCC 8478 referens suşu ile rep-PCR protokolünde BOX A1R ve MOB REP1 primerleri kullanmış ve AB ve ab genotiplerine ait biyotipler olduklarını saptadıklarını bildirmişlerdir (Rusenova et al., 2014).



Yukarıdaki kaynaklarda, AY  hastalığının arıcılık sektörü için ne kadar önemli bir hastalık olduğu, hastalığın tabiatı, yayılımı, mücadele yolları ve korunması ile ilgili çalışmalardan örnekler verilmiştir. Bal arıları için bu kadar tehlike arz eden hastalıkta, hastalığın vereceği zararı azaltmanın en önemli yollarından biri, etkeni mümkün olduğunca hızlı, güvenilir ve kesin bir şekilde teşhis etmektir.

Dünya'nın çeşitli yerlerinde pek çok araştırmacı, bu amaçla çeşitli araştırmalar yapmış ve halen yapmaktadırlar. An itibarıyla, teşhiste saha örneklerinden kültür yöntemi, konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemlerinin her üçünün birlikte bir metot karşılaştırma çalışması olarak gerçekleştirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Ülkemiz, hayvan hastalıkları ile mücadele konusunda resmi olarak OIE veri ve direktiflerini esas almaktadır. 2008 yılında değiştirilen (OIE Terrestrial Manual 2016 Chapter 2.2.2) direktiflerde, ilk defa moleküler yöntemler önerilmiştir. Kaynakta kültür yöntemi detaylıca anlatılmış, moleküler yöntemler için kültüre edilmiş bakteriden ve şüpheli materyalden moleküler çalışmalar için DNA ekstrasyonu ile ilgili farklı yöntemlerin kullanılabileceği bildirilmiş, DNA ekstraksiyonu sonrası konvansiyonel PCR ve nested PCR önerilmiştir.

2016 yılında güncellenen direktifte real-time PCR yöntemi ile ilgili bir öneri ilk defa yer almış, ancak Konvansiyonel ve nested PCR gibi, primer çifti ve prob sekansı açık olarak tavsiye edilmemiştir. Çalışmamızın  ıkış noktası, tüm

özellikleriyle aynı olan saha örneklerinde kültür yöntemi, konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemlerinin her üçünü de uygulanacağı bir metot karşılaştırması yaparak, teşhis konusunda araştırmacılara, mevcut imkanlar ve altyapı dahilinde kendilerine en uygun yöntemi seçmelerinde yardımcı olmaktadır.



3.MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan örnekler

Çalışmamızda kullanılan larvalı petek, ergin arı ve petekli bal örnekleri, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından aynı dönemde yürütülen, TAGEM/HS/09/12/03/152 proje kodu ile desteklenen “Ege Bölgesi İllerinde Önemli Arı Hastalıklarının Yaygınlığının Araştırılması” projesi kapsamında alınmıştır. Kovanlar açılarak arılar ve larvalı peteklerden, genellikle yavrulama dönemi olan ilkbahar ve sonbahar aylarında, iller (Muğla, Aydın, İzmir, Denizli, Manisa, Kütahya ve Uşak) ve bu illere bağlı ilçelere gidilerek, her işletmeden yavrulu petek, ballı petek ile örnek çeşitliliğini arttırmak ve klinik olarak önemli olan farklı örneklerle de çalışılabilme imkanını irdelemek için az sayıdaki ergin arı, ve kabartılmış petek örnekleri de çalışmaya dahil edildi. Seçilen kolonide varsa olabildiğince çok ölü larva veya rengi bozulmuş petek gözü, mümkün olduğunca az bal içeren yavrulu petekler arasından alınan örnekler ve ballı petekler gevşekçe kağıda sarılmış olarak ve mukavva kutular içinde laboratuvara getirildi. Örnekler toplanırken seçilen kolonide; kovan önünden canlı ergin ve ölü ergin arılardan en az 300 arı örneği toplandı. Örnekleme sırasında ayrı ayrı 500-1000 ml’lik kavanozlara konan arı örnekleri, larvalı ve ballı peteklerin bulunduğu kutuların üzerlerine gerekli bilgiler yazılıp oda sıcaklığında, aynı gün içinde Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü’ne ulaştırıldı.

Alınan 394 örnekten anamnez, örnek miktarı, klinik görünüm gibi hususlar göz önüne alınarak muhtemel AYÇ hastalığı saptanma potansiyeli olan örneklerden 96 adedinin seçilmesi ile gerçekleştirildi. Ege Bölgesi illerinin (Muğla, Aydın, İzmir, Denizli, Manisa, Kütahya ve Uşak) Arı Yetiştiricileri Birlikleri, Bakanlık İl ve İlçe Müdürlükleri işbirliği ile materyal temin edildi. Çalışma için kullanılacak örnekler, laboratuvara ulaşır ulaşmaz konvansiyonel kültür metodu ile incelendi, daha sonra moleküler çalışmalar için etiketlendi ve -40°C’de muhafaza altına alındı. Numune toplama sürecinde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı il ve ilçe müdürlüklerince AYÇ klinik muayenesi için Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü’ne gönderilen örnekler de çalışmaya dâhil

edildi. Örnekler toplam 3 partide sınıflandırılıp işleme alındı. Numunelerin etiketlerindeki temel bilgiler Tablo 3.1’de verilmiştir.

No	Örnek Türü	Köy	İlçe	Tarih
1	Larvalı petek	Sultaniye	Köyceğiz	30.11.2010
2	Larvalı petek	Merkez	Yatağan	30.11.2010
3	Larvalı petek	Merkez	Yatağan	30.11.2010
4	Larvalı petek	Ekincik	Köyceğiz	30.11.2010
5	Larvalı petek	Akçapınar	Ula	30.11.2010
6	Larvalı petek	Sakarkaya	Milas	30.11.2010
7	Larvalı petek	Sultaniye	Köyceğiz	30.11.2010
8	Larvalı petek	Şeref Köyü	Yatağan	30.11.2010
9	Larvalı petek	Merkez	Yatağan	30.11.2010
10	Larvalı petek	Çukurköy	Milas	30.11.2010
11	Larvalı petek	Çamlıca	Yatağan	30.11.2010
12	Larvalı petek	Hamitköy	Köyceğiz	30.11.2010
13	Larvalı petek	Merkez	Yatağan	30.11.2010
14	Larvalı petek	Osmaniye	Marmaris	30.11.2010
15	Larvalı petek	Orhaniye	Marmaris	30.11.2010
16	Larvalı petek	Beçin	Milas	30.11.2010
17	Larvalı petek	Merkez	Yatağan	30.11.2010
18	Larvalı petek	Bencik	Yatağan	30.11.2010
19	Larvalı petek	Sakarkaya	Milas	30.11.2010
20	Larvalı petek	Karahayıt	Milas	30.11.2010
21	Larvalı petek	Sakarkaya	Milas	30.11.2010
22	Larvalı petek	Arıcılar	Ula	30.11.2010
23	Larvalı petek	Kıyra	Ula (Eskişehir*)	30.11.2010
24	Larvalı petek	Merkez	Çine	30.11.2010
25	Larvalı petek	Kızılağaç	Ula	30.11.2010
26	Larvalı petek	Çiftlik	Ula	30.11.2010
27	Larvalı petek	Karabörtlen	Ula	30.11.2010
28	Larvalı petek	Akçalı	Milas	30.11.2010
29	Larvalı petek	Kızılyaka	Ula	30.11.2010
30	Larvalı petek	Kıyra	Ula	30.11.2010
31	Larvalı petek	Merkez	Menemen	13.04.2011
32	Larvalı petek	Merkez	Uşak	01.06.2010
33	Larvalı petek	Gölcük	Ula	30.11.2010
34	Larvalı petek	Merkez	Ulubey	13.04.2011
35	Larvalı petek	Merkez	Uşak	02.06.2010
36	Larvalı petek	Köklük	Yatağan	30.11.2010
37	Larvalı petek	Portakallık	Ula	30.11.2010
38	Larvalı petek	Kızılyaka	Ula	30.11.2010
39	Larvalı petek	Çavdar	Söke	30.11.2010
40	Larvalı petek	Yeşilköy	Söke	30.11.2010
41	Larvalı petek	Ekincik	Köyceğiz	30.11.2010
42	Larvalı petek	Kıyra	Ula	30.11.2010
43	Larvalı petek	Çukurköy	Menemen	13.04.2011
44	Larvalı petek	Alaşar	Yatağan	30.11.2010
45	Larvalı petek	Merkez	İzmir	30.11.2010
46	Larvalı petek	Sakarkaya	Milas	30.11.2010
47	Larvalı petek	Kafaca	Yatağan	30.11.2010
48	Larvalı petek	Merkez	Elazığ	13.04.2011

Tablo 3.1 Örnek Bilgileri

No	Örnek Türü	Köy	İlçe	Tarih
49	Larvalı petek	Hamitköy	Köyceğiz	30.11.2010
50	Larvalı petek	Merkez	Kütahya	13.04.2011
51	Larvalı petek	Merkez	Kütahya	13.04.2011
52	Larvalı petek	Merkez	Kütahya	13.04.2011
53	Larvalı petek	Merkez	Kütahya	13.04.2011
54	Larvalı petek	Bencik	Yatağan	30.11.2010
55	Larvalı petek	Hamitköy	Köyceğiz	30.11.2010
56	Ergin arı	Ekincik	Köyceğiz	30.11.2010
57	Larvalı petek	Ekincik	Köyceğiz	30.11.2010
58	Larvalı petek	Karahayıt	Milas	30.11.2010
59	Larvalı petek	Karahayıt	Milas	30.11.2010
60	Ergin arı	Merkez	Yatağan	30.11.2010
61	Larvalı petek	Merkez	Yatağan	30.11.2010
62	Larvalı petek	Çukurköy	Menemen	13.04.2011
63	Larvalı petek	Erbeyli	İncirliova	13.04.2011
64	Larvalı petek	Merkez	Yatağan	30.11.2010
65	Ballı petek	Merkez	Bergama	13.04.2011
66	Ergin arı	Merkez	Aydın	13.04.2011
67	Kabartılmış petek	Merkez	Menemen	13.04.2011
68	Ergin arı	Karahayıt	Milas	30.11.2010
69	Larvalı petek	Merkez	Menemen	13.04.2011
70	Larvalı petek	Merkez	Kemalpaşa	13.04.2011
71	Kabartılmış petek	Merkez	Menemen	13.04.2011
72	Larvalı petek	Merkez	Menemen	13.04.2011
73	Larvalı petek	Merkez	Köyceğiz	30.11.2010
74	Ergin arı	Meke	Muğla	13.04.2011
75	Larvalı petek	Merkez	Atça	13.04.2011
76	Larvalı petek	Merkez	Koçarlı	13.04.2011
77	Larvalı petek	Şerefler	Dalaman	30.11.2010
78	Larvalı petek	Merkez	Denizli	13.04.2011
79	Larvalı petek	Merkez	Kuşadası	13.04.2011
80	Larvalı petek	Merkez	Denizli	13.04.2011
81	Larvalı petek	Küçükkaya	Seferihisar	13.04.2011
82	Ballı petek	Merkez	Kemalpaşa	13.04.2011
83	Larvalı petek	Selimiye	Milas	13.04.2011
84	Larvalı petek	Merkez	Samsun	13.04.2011
85	Kabartılmış petek	Merkez	Samsun	13.04.2011
86	Larvalı petek	Merkez	İzmir	13.04.2011
87	Ballı petek	Merkez	İzmir	13.04.2011
88	Larvalı petek	Küçükkaya Köyü	Güzelbahçe	13.04.2011
89	Ballı petek	Merkez	İzmir	13.04.2011
90	Ergin arı	Şerefler	Dalaman	30.11.2010
91	Ergin arı	Merkez	Kuşadası	13.04.2011
92	Larvalı petek	Merkez	Denizli	13.04.2011
93	Larvalı petek	Merkez	Kuşadası	13.04.2011
94	Larvalı petek	Merkez	Seferihisar	13.04.2011
95	Larvalı petek	Mumcular	Bodrum	30.11.2010
96	Ballı petek	Belen	Menemen	13.04.2011

Tablo 3.1 Örnek Bilgileri (Devamı)

48, 84 ve 85 numaralı örnekler, Elazığ ve Samsun Veteriner Kontrol Enstitüleri tarafından çalışmaya destek olmak amacıyla gönderilmiştir.

31, 69, 82, 86, 87, 89, ve 96 numaralı örnekler yetiştirici birlikleri tarafından alınarak gönderilmiş örneklerdir.

3.1.2 Kullanılan besiyerleri

3.1.2.1 % 5 Koyun kanlı kolombiya agar

<u>İçerik</u>	<u>g/litre</u>
Pankreatik digest kazein	12
Peptik digest hayvan dokusu	5
Maya özütü	3,5
Et özütü	3
Mısır nişastası	1
Sodyum klorid	1
Agar	13,5

Hazır besi yeri tozu steril distile su ile 1 litreye tamamlanarak, karıştırılıp çözdürülmüş, pH 7,2-7,4'e ayarlanmıştır. 121°C'de 1.2 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilip, 40-50°C sıcaklığa gelince % 5 (v/v) defibrine koyun kanı eklenmiştir. Steril petrilere dağıtılıp kalite kontrolleri yapıldıktan sonra, örneklerden ilk üremelerin tespiti amacıyla genel besi yeri olarak kullanılmıştır (Hornitzky M.A.Z. and Karlovskis S., 1989)

3.1.2.2 Brain heart infusion agar

<u>İçerik</u>	<u>g/litre</u>
Beyin özütü	7,8
Dextroz	2
Disodyum fosfat	2,5
Kalp özütü	9,7
Agar	15

Hazır besi yeri steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış, karıştırılıp çözdürülmüş, pH 7,2-7,4'e ayarlanmıştır. 121°C'de 1.2 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. 40-50°C sıcaklığa gelince petrilere dağıtılıp, kalite kontrolleri yapıldıktan sonra, örneklerden ilk üremelerin tespiti amacıyla genel besi yeri olarak kullanılmıştır (de Graaf et al., 2006).

3.1.2.3 Tiaminli brain heart infusion agar

<u>İçerik</u>	<u>g/litre</u>
Beyin özütü	7,8
Dextroz	2
Disodyum fosfat	2,5
Kalp özütü	9,7
Agar	15

Hazır besi yeri steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış, karıştırılıp çözdürülmüş, pH 7,2-7,4'e ayarlanmıştır. 121°C'de 1.2 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. 40 -50°C sıcaklığa gelince 0.1g/L olacak şekilde steril Tiamin eklenmiş, petrilere dağıtılıp kalite kontrolleri yapıldıktan sonra kullanılmıştır (de Graaf et al., 2006).

3.1.2.4 Nutrient broth

<u>İçerik</u>	<u>g/litre</u>
Et özütü	1
Pepton	5
Sodyum klorit	5
Maya özütü	2

Katı bileşenler tartılarak hazırlanmış, steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış, karıştırılıp çözdürülmüş, pH 7,2-7,4'e ayarlanmıştır. 121°C'de 1.2 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilip tüplere dağıtılmış, kalite kontrolleri yapıldıktan sonra, örneklerden ilk üremelerin tespiti amacıyla genel besi yeri olarak kullanılmıştır (Gochner et al.,1973)

3.1.2.5 Nutrient agar

<u>İçerik</u>	<u>g/litre</u>
Et özütü	1
Pepton	5
Sodyum klorit	5
Maya özütü	2
Agar	15

Katı bileşenler tartılarak hazırlanmış, steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış, karıştırılıp çözdürülmüş, pH 7,2-7,4'e ayarlanmıştır. 121°C'de 1.2

atmosfer basınçta 15 dakika steril edilip 40-50°C sıcaklığa gelince petrilere dağıtılıp kalite kontrolleri yapıldıktan sonra, örneklerden ilk üremelerin tespiti amacıyla genel besi yeri olarak kullanılmıştır (Gochnauer et al.,1973)

3.1.2.6 J-broth

<u>İçerik</u>	<u>g/litre</u>
Tripton	5
Maya özütü	15
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	3

Katı bileşenler tartılarak hazırlanmış, steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış, karıştırılıp çözündürülmüştür. pH'ı 7.3-7.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. 121°C'de 1.2 atmosfer basınçta 20 dakika steril edilip, 40-50°C'ye gelince filtreden geçirilmiş %10'luk 20 ml glikoz solüsyonu eklenmiştir. İyice karıştırılıp tüplere dağıtılmış, kalite kontrolleri yapıldıktan sonra kullanılmıştır (Gordon et al., 1973)

3.1.2.7 J-agar

<u>İçerik</u>	<u>g/litre</u>
Tripton	5
Maya özütü	15
Dipotasyum hidrojen fosfat(K ₂ HPO ₄)	3
Agar	20

Katı bileşenler tartılarak hazırlanmış, steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış, karıştırılıp çözündürülmüştür. pH'ı 7,3-7,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. 121°C'de 1 atmosfer basınçta 20 dakika steril edilip, 40-50°C'ye gelince filtreden geçirilmiş %10'luk 20 ml glikoz solüsyonu eklenmiştir. İyice karıştırılıp petrilere dağıtılmış, kalite kontrolleri yapıldıktan sonra kullanılmıştır (Gordon et al., 1973)

3.1.2.8 % 5 Koyun kanlı nalidiksik asitli kolombiya agar

<u>İçerik</u>	<u>g/litre</u>
Pankreatik digest kazein	12
Peptik digest hayvan dokusu	5
Maya özütü	3.5
Et özütü	3.0
Mısır nişastası	1.0
Sodyum klorit	1
Agar	13.5

Hazır besi yeri tozu steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış, karıştırılıp çözdürülmüş, pH 7,2-7,4'e ayarlanmıştır. 121°C'de 1.2 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilip, 40 -50°C sıcaklığa gelince % 5 (v/v) defibrine koyun kanı ve 3 g/l nalidiksik asit eklenmiş, dikkatlice karıştırılmasının ardından steril petrilere dağıtılıp kalite kontrolleri yapıldıktan sonra kullanıldı (Bakonyi et al., 2003).

3.1.3. Kullanılan boyalar, kimyasallar ve tamponlar

Nalidiksik asit

3 g nalidiksik asit (Ambresco 0677-50G), 20 ml distile suda çözülmüş, 22 µ filtreyle steril edilmiş ve -20°C de stoklanmıştır. İzolasyon petrilerinde Gram (-) bakterileri baskılamak için 3 g/l olacak şekilde eklenerek kullanıldı (Bakonyi et al., 2003).

Tiamin

P. larvae üremesini aktive etmek için kullanılmıştır. Thiamine Hydrochloride - CAS 67-03-8 (Calbiochem) toz olarak, steril kabin içinde besi ortamlarına eklendi (de Graaf et al., 2006).

Nigrosin

Özellikle izole edilen mikroorganizmalarda flagella varlığının ortaya konması amacıyla, negatif boyama solüsyonu olarak kullanıldı. 10 g boya (Merck 1.15924) tartıldı, 100 ml distile su içerisine aktarıldı ve kaynar su banyosunda yarım saat tutuldu. Üzerine 0,5 ml formalin koruyucu olarak eklendi, çift katlı filtre kağıdından süzülerek kullanım için koyu renkli, ağzı sıkı kapalı şişelerde stoklandı (Arda 2000).

Hidrojen peroksit

İzole edilen mikroorganizmaların katalaz aktivitesini tespit etmek amacıyla kullanıldı. Hidrojen peroksit stok solüsyondan distile su ile % 3'lük solüsyon hazırlandı, koyu renkli şişelerde, ağzı sıkıca kapalı şekilde 2 ile 8°C arasında saklandı (Arda 2000).

Jansiyana moru

Gram boyama için kullanıldı. Gentian violet 5 g (Merck 1.01408.0100) 100 ml %96'lık etil alkol içinde eritildi, süzgeç kağıdından süzülerek koyu renkli, ağzı sıkıca kapatılmış şişelerde saklandı. Kullanım için 10 ml ana stoktan alındı, üstüne 90 ml distile su eklenerek koyu renkli boyama seti şişesinde muhafaza edildi (Arda 2000).

Lugol

Gram boyama için kullanıldı. 50 g İyot, 100 g potasyum iyodür, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Poliiyodür derişik çözeltide daha çabuk oluştuğundan iyotla potasyum iyodür bir cam petride tartıldıktan sonra beraberce porselen havanda ezildi, azar azar ilave edilen 100 ml su ile tamamen eritildi. Su ilavesi ile 1000 ml'ye tamamlanıp, sıkı kapatılmış koyu renkli şişelerde, oda ısısında saklandı (Arda 2000).

Fuksin ($C_{19}H_{17}N_3 \cdot HCl$)

Gram boyamada kullanıldı. Ana Mahlül: 10 g Fuksin (Carlo Erba 452844) 90 ml etil alkol ile karıştırılıp bir gece 37°C'lik etüvde bekletildi. Ziehl Fuksin: 100 ml ana mahlül, 50 ml % 2.5'lik asit fenik ve 850 ml distile su ile karıştırıldı. Kullanım mahlülü: 10 ml ziehl fuksin 90 ml distile su ile karıştırıldı. Kullanım solüsyonu haricindeki tüm solüsyonlar, ağzı sıkı kapalı, koyu renkli şişelerde oda ısısında saklandı. Kullanım mahlülü, ağzı sıkı kapalı, koyu renkli boyama seti şişelerinde oda ısısında muhafaza edildi (Arda 2000).

Lizis tamponu

Tris-HCl	pH 8.0	400 mM
EDTA	pH 8.0	60 mM
NaCl		150 mM
SDS		%1

Potasyum asetat tamponu

Potasyum asetat	5 M	60 ml
Glisial asetik asit		11,5 ml
Distile su		28,5 ml

Tris-borat-EDTA tamponu (TBE)

	(5x)	<u>g/litre</u>
Trisma base		54,0
Borik asit		27,5
EDTA	PH 8.0	5 M 20,0 ml

TBE, agaroz (Sigma), GelRed (Biotium, nükleik asit jel boyası), DNA marker (Fermentas, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; Fermentas, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder) ve Orange G DNA izolasyonu ve PCR sonrası ürünlerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi amacıyla kullanıldı (Kılıç vd., 2010).

PCR reaksiyon tamponu (Fermentas), $MgCl_2$ (Fermentas), dNTP (Fermentas, 100 mM), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, 500 U), 27F ve 1492R primerleri (Thermo) PCR uygulamaları sırasında kullanıldı.

DNA izolasyonu, hem konvansiyonel, hem de literatürdeki (Bakonyi et al., 2003) öneriye uygun olarak ticari bir kit ile gerçekleştirildi. (High Pure PCR Template Preparation Kit ROCHE - 11 796 828 001) Elde edilen DNA $-20^{\circ}C$ 'de saklandı.

3.1.4. Kullanılan test mikroorganizmaları

1 *Paenibacillus larvae*: Korean Collection for Type Cultures (KCTC) no:3744 ve 3563 3744 numaralı suş temin edildiği kurum tarafından, *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* olarak, 3563 numaralı suş ise *Paenibacillus larvae* subspecies *pulvificiens* olarak adlandırılmıştır. Nomenklatördeki son değişiklik sonrası her iki suş ta *Paenibacillus larvae* olarak kabul edildiğinden daha güçlü üreyen 3744 suşu ile çalışılmıştır.

2 *Paenibacillus alvei*: KCTC no:3623

3.1.5 PCR reaksiyonunda kullanılan primerler ve prob

Konvansiyonel PCR için kullanılanlar:

Primer	Primer Dizilimi	Pozisyonu
mobF	AgAAggAATTTTAAATgATAAgACg	4037-4061
mobS	gAAATggCTAACgAATTTAAgAg	4125-4147
mobA	CCgCTggCAACATAACTAC	4248-4230
mobR	gTTCCgCTggCAACATA	4251-4235
mobFL	ACAgtTTTCTTCTAACTTCTCgCTC-FL	4207-4182
mobLC	640-ATACTTTTCAAACTTTTTgCggATATTT P	4180-4152

Tablo 3.2 Konvansiyonel PCR için ilk sentezlenen 16S rRNA temelli primer ve problar

Primer ve problar çalışma için tasarlanmış ve sentezlenmiştir.

PCR Protokolü;

95°C'de 5 dakika (başlangıç denatürasyonu)	1 döngü
94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika	40 döngü
72°C'de 5 dakika (son polimerizasyon)	1 döngü

Metalloproteinaz gen bölgesi temelli primerler ve prob;

GenBank: AF111421.1 GenBank Graphics >gi|4545212|gb|AF111421.1|

Paenibacillus larvae metalloproteinase precursor, gene, partial cds

AACAACGCTTTCTGGAACGGGCAGCAAATCGTATTCAGAGACGGTGATGGAAAAACC
 TTTATTCCCTTCTCCGGAACCTGGATGTGGTAGGCCATGAATTGACTCACGGAGCTA
 CAGAACATACGGCAATTGGAATATGAGAACGAATCCGGAGCATTGAATGAATCCAT
 TTCGGATATTATCGGCAATGCGATCAAAGGCAAAGGATGGCTTATTGGAGAAGACGT
 GTATACGCCGAATATTCCGGAGGATCTCTCCGTTCCCTTAGAGGACCCAACACTTTATG
 GTCAGCCGGACCATTACAGCAATCGTTACAAAGGACCTTCGGATAACGGCGGCGTTC
 ATAC

UPL #85Probe; FAM-GACCTGGA-Tamra

F; CGTATTCAGAGACGGTGATGG tm;59

R; CGTGAGTCAATTCATGGCCTA tm;59

Denatürasyon : 95 °C

Bağlanma : 52 °C

Polimerizasyon : 72 °C

Primerler ve prob, bu çalışma için tasarlanmış ve sentezlenmiştir.

Primer	Dizilimi	Amplikon Boyutu
AFB-F	5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3'	1106 bp
AFB-R	5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'	

Tablo 3.3 16S rRNA geni temelli, konvansiyonel PCR için kullanılan primerler (Dobbelaere et al., 2001b).

b- Real-Time PCR için kullanılanlar:

Primer ve Prob	Dizilimi
Mob F	GACCTTTTCCTTCGGGGACA
Mob R	TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G
UPL 94 probe	Fam-GGAGACAG-tamra

Tablo 3.4 16S rRNA temelli real-time PCR için kullanılan primerler ve prob
(Bu çalışma için dizayn edilmiş ve UPL probu ile entegre edilmiştir)

3.1.6 Kullanılan cihazlar

Hassas Terazı (OHAUS Explorer Pro)

Vorteks (Heidolph Reax)

Santrifüj (Hettich Micro120)

Otoklav (Hirayama Hiclave HVE 50)

Işık Mikroskobu (Olympus BX50)

Steril Kabin (Labcaire BH18)

Elektforez Tankı ve Güç Kaynağı (Consort EV243)

Jel Görüntüleme Cihazı (Dual-Intensity Transilluminator)

Nanodrop Cihazı (Thermo 2000)

Gradient Termal Döngü Cihazı (Corbett Palm Cycler)

Real-time PCR Cihazı (Roche LightCycler 1,5)

Real-time PCR Cihazı (Roche LightCycler 480)

pH Metre (Testo 206)

3.2 Metot

Tüm örnekler laboratuvara gelmelerinin ardından klinik muayeneye tabi tutuldu (Şekil 3.1). Fungal üreme olmayan ve miktar olarak yeterli olan (en az 10x10 cm boyutunda larvalı, ballı ve kabartılmış petek, en az 50 ergin arı) örnekler (Şekil 3.2 ve 3.3) analizler için çalışmaya dahil edilip kültür yöntemi ile analize alındı (Şekil 3.4).



Şekil 3.1 AYÇ şüpheli bir örneğe uygulanan uzama testi



Şekil 3.2 larvalı, ballı, kabartılmış ve temel petek örnekleri (Bir işletmeden gönderilmiştir)



Şekil 3.3 Fungal kontaminasyon nedeniyle çalışma dışı bırakılan bir örnek



Şekil 3.4 Ekim hazırlıkları

3.2.1 Örneklerin işleme hazırlanması ve kültür yöntemiyle analizi

3.2.1.1 Larva ve pupadan ekime hazırlık

Steril tüpe steril distile sudan 9 ml konularak üzerine 5-10 adet larva ve/veya pupa konuldu. Vorteksle süspansiyonlar hazırlanarak, tüp oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra 80°C'de, 10-15 dakika benmaride tutularak sporlanmamış *Paenibacillus larvae* ve kontamine bakteriler bertaraf edildi. Süspansiyondan yaklaşık 200 µl alınarak steril pamuklu swapla % 5 koyun kanlı kolombiya agar, brain heart infusion agar, tiaminli brain heart infusion agar, J-agar, , nutrient agar, nutrient broth ve J-broth'a ekimleri yapıldı (OIE Terrestrial Manual 2016). Kalan kısım -40°C'de saklandı.

3.2.1.2 Petekli bal ve kabartılmış petekten ekime hazırlık

Yaklaşık 10x5 cm ebatlarında örnek, steril pens ve makas kullanılarak stomacher poşeti içine alındı, üzerine yaklaşık 150 ml steril FTS ilave edildi,

cihazın orta hızında 2-3 dakika homojenize edildi. Stomacher poşetinin filtreden geçmiş kısmından steril pipet ile 50 ml'lik steril falcon tüplerine alındı. Süspansiyondan yaklaşık 200 µl alınarak steril pamuklu swapla % 5 koyun kanlı kolombiya agar, brain heart infusion agar, tiaminli brain heart infusion agar, J-agar, , nutrient agar, nutrient broth ve J-broth'a ekimleri yapıldı (OIE Terrestrial Manual 2016). Kalan kısım -40°C'de saklandı.

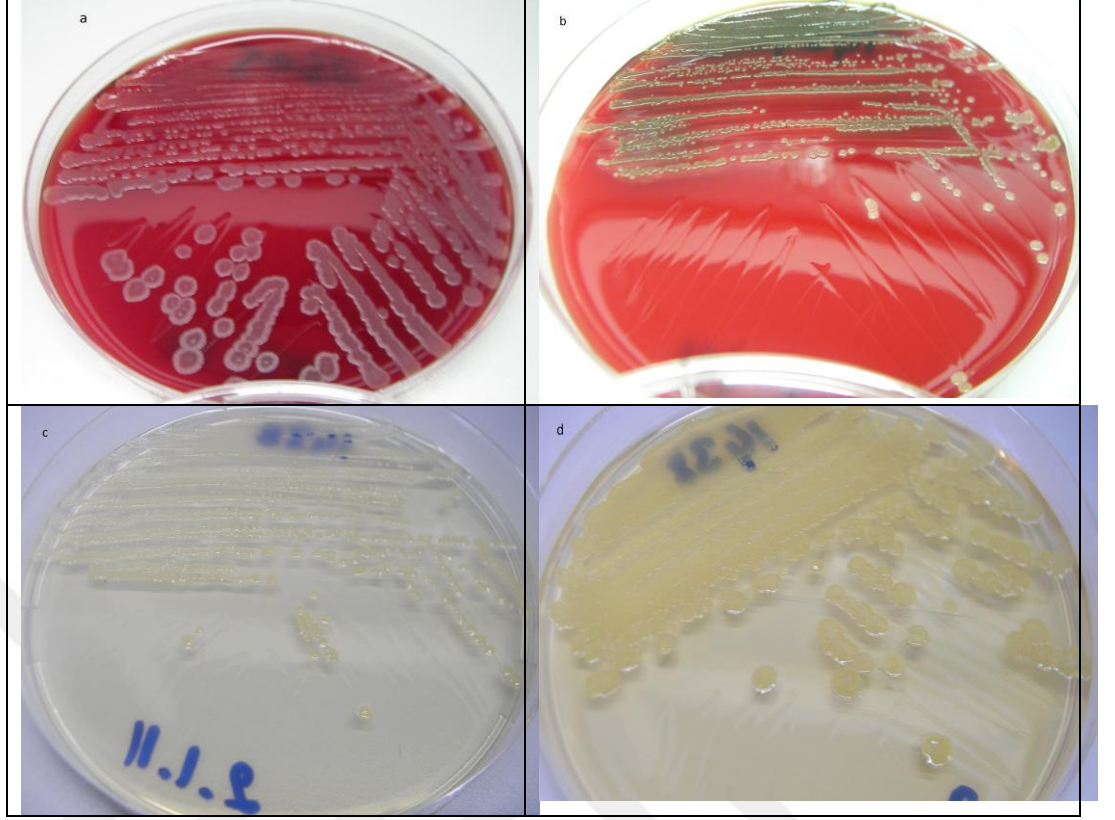
Çalışmada, hastalığın ihbar mecburiyeti olduğu için bal ticareti yapanlarca örnek vermede yaşanan problemler, menşei tam olarak bilinen süzme balın bulunamaması, arılıklarda süzme baldan ziyade petekli bal bulunabilmesi nedeniyle süzme bal ile çalışılmadı, petekli bal ile çalışıldı.

3.2.1.3 Ergin arılardan ekime hazırlık

Yaklaşık 15-20 adet arı steril havan içinde steril kum ve steril FTS eklenerek homojenize edildi. Havan içeriği stomacher poşeti içine alındı Bu işlem diğer 15-20 arı ile tekrarlandı. Stomacher poşetine 100 ml kadar steril FTS eklenip cihazın orta hızında 2-3 dakika homojenize edildi. Stomacher poşetinin filtreden geçmiş kısmından steril pipet ile 50 ml'lik steril falcon tüplerine alındı. Süspansiyondan yaklaşık 200 µl alınarak steril pamuklu swapla % 5 koyun kanlı kolombiya agar, brain heart infusion agar, tiaminli brain heart infusion agar, J-agar, , nutrient agar, nutrient broth ve J-broth'a ekimleri yapıldı (OIE Terrestrial Manual 2016). Kalan kısım -40°C'de saklandı.

3.2.2 Etken izolasyonu ve tanımlanması

% 5 koyun kanlı kolombiya agar, brain heart infusion agar, tiaminli brain heart infusion agar, J-agar, , nutrient agar, nutrient broth ve J-broth besiyerlerinde hastalık etkeninin gelişmesi için petriler 37±1°C'de % 5 CO₂'li ortamda 4-7 gün, ballı petek örnekleri 14 güne kadar inkübe edildi. Gelişen koloniler, koloni morfolojisi yönünden değerlendirildi. Gri-sarı arası renkte, düzgün kenarlı, genellikle rough koloniler şeklinde üremeler gözlemlendi.

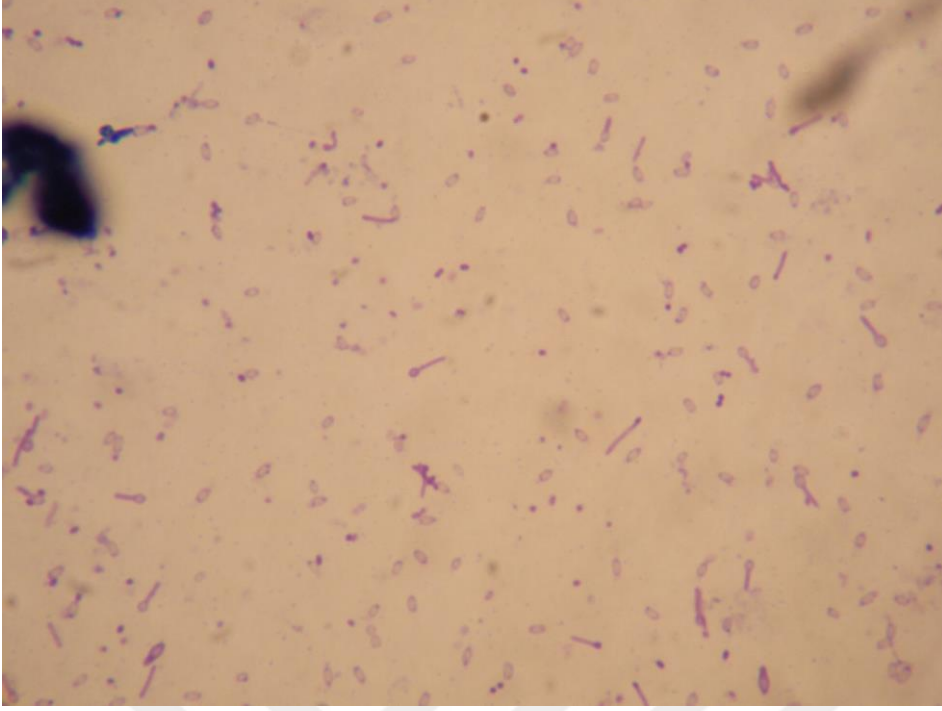


Şekil 3.5 Kolonilerin makroskobik görünimleri (a ve b % 5 koyun kanlı kolombiya agar'daki, c J-agar'daki, d nütrient agar'daki üremelerdir.)

Gram ve Nigrosin ile boyanarak bakteriyoskopik muayeneleri yapıldı.

Gram boyama Arda (2000)'e göre yapıldı. Preperat hazırlandı, kurutuldu, alevde tespit edildi. Kristal violet ile iki dakika boyandı. Boya dökülüp distile su ile yıkandı. Lügol solüsyonu ile bir dakika boyandı. Lügol solüsyonu dökülüp absolut alkol ile dekolore edildi. Distile su ile yıkanıp sulu fuksin ile bir dakika boyandı. Boya dökülüp distile su ile yıkandı, kurutulup immersiyon yağı damlatıldı, immersiyon objektifi ile muayene edildi.

Nigrosin boyama, Ramakrishnan S. and Sulochana K.N. (2012)'ye göre yapıldı. Bir damla sıvı kültür veya serum fizyolojik içine eklenmiş kültür lam üzerine yayıldı, bir damla nigrosin üzerine damlatılıp iyice yayıldı. Kurutulup kısık ışıktaki immersiyon yağı damlatılıp immersiyon objektifi ile muayene edildi.



Şekil 3.6 Saha izolatının Gram boyamasının mikroskop görüntüsü.

Şüpheli kolonilerin saf kültürleri yapılarak tanımlama için katalaz, testleri yapıldı.

Biyokimyasal Doğrulama

P. larvae

Katalaz

-

Flagella (Nigrosin)

+

Bu testler sonucunda katalaz, OIE Terrestrial Manual’da negatif veya geç ve zayıf pozitif olarak tanımlanmasına rağmen, çalışmamızda tamamı negatif olarak gözlemlendi. İzole edilen suşlar, laboratuvarlar arası metot birliğine göre *P. larvae* olarak tanımlandı. Vitek 2 Compact (Biomerieux) ile biyokimyasal parametreleri belirlendi.

Kuyucuk	Test	Kısaltma	Miktar/Kuyucuk
1	BETA-ZİLOSİDAZ	BXYL	0,0324 mg
3	L-Lizin-ARİLAMİDAZ	LysA	0,0228 mg
4	L-Aspartat ARİLAMİDAZ	AspA	0,024 mg
5	Lösin ARİLAMİDAZ	LeuA	0,0234 mg
7	Fenilalin ARİLAMİDAZ	PheA	0,0264 mg
8	L-Prolin ARİLAMİDAZ	ProA	0,0234 mg
9	BETA-GALAKTOSİDAZ	BGAL	0,036 mg
10	L-Pirolidonil-ARİLAMİDAZ	PyrA	0,018 mg
11	ALFA-GALAKTOSİDAZ	AGAL	0,036 mg
12	Alanin ARİLAMİDAZ	AlaA	0,0222 mg
13	Tirosin ARİLAMİDAZ	TyrA	0,0282 mg
14	BETA-N-ASETİL-GLUKOSAMİNİDAZ	BNAG	0,0408 mg
15	Ala-Phe-Pro ARİLAMİDAZ	APPA	0,0384 mg
18	SİKLODEKSTRİN	CDEX	0,3 mg
19	D-GALAKTOZ	dGAL	0,3 mg
21	GLİKOJEN	GLYG	0,1875 mg
22	myo-INOSİTOL	INO	0,3 mg
24	METİL-A-D-GLUKOPİRANOSİD asitleşmesi	MdG	0,3 mg
25	ELLMAN	ELLM	0,03 mg
26	METİL-D-KSİLOSİD	MdX	0,3 mg
27	ALFA-MANOSİDAZ	AMAN	0,036 mg
29	MALTOTRİOZ	MTE	0,3 mg
30	Glisin ARİLAMİDAZ	GlyA	0,012 mg
31	D-MANİTOL	dMAN	0,3 mg
32	D-MANOZ	dMNE	0,3 mg
34	D-MELEZİTOZ	dMLZ	0,3 mg
36	N-ASETİL-D-GLUKOSAMİN	NAG	0,3 mg
37	PALATİNOZ	PLE	0,3 mg
39	L-RAMNOZ	IRHA	0,3 mg
41	BETA-GLUKOSİDAZ	BGLU	0,036 mg
43	BETA-MANOZİDAZ	BMAN	0,036 mg
44	FOSFORİL KOLİN	PHC	0,0366 mg
45	PİRUVAT	PVATE	0,15 mg
46	ALFA-GLUKOSİDAZ	AGLU	0,036 mg
47	D-TAGATOZ	dTAG	0,3 mg
48	D-TREHALOZ	dTRE	0,3 mg
50	INULİN	INU	0,12 mg
53	D-GLUKOZ	dGLU	0,3 mg
54	D-RİBOZ	dRIB	0,3 mg
56	PUTRESİN asimilasyonu	PSCNa	0,201 mg
58	%6,5 NaCl'DE ÜREME	NaCl %6,5	1,95 mg
59	KANAMİSİN DİRENCİ	KAN	0,006 mg
60	OLEANDOMİSİN DİRENCİ	OLD	0,003 mg
61	ESKÜLİN hidroliz	ESC	0,0225 mg
62	TETRAZOLIUM RED	TTZ	0,0189 mg
63	POLİMİKSİN B DİRENCİ	POLYB_R	0,00093 mg

Tablo 3.5 Vitek 2 Compact BCL kit içeriği

3.2.3. Örneklerden moleküler çalışmalar için DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için ön hazırlık

Laboratuvara getirildiğinde kültür yöntemi ile incelenmiş olan örneklerin, -40°C’de saklanan kısımları oda ısısına çıkarılıp çözünmesi beklendi. Çözündükten sonra tüpler elde karıştırılıp sıvı kısımdan 1.2 ml eppendorf tüpüne alındı 12000 devirde 3 dakika santrifüj edildi, pelet iki defa santrifüjde steril PBS ile yıkandı.

Manuel DNA izolasyonu yöntemi

Manuel DNA izolasyon yöntemi için sırasıyla aşağıda belirtilen maddeler uygulanmıştır (Bakonyi et al., 2003).

1. Pellet üzerine 500 µl lizis tamponu [20mM Tris-HCl (pH:8.0), 2 mM EDTA ve % 1.2 Triton] ilave edilip, oluşan karışım homojen olana dek karıştırılmıştır. 20 mg/1 ml lizozim çözeltisi ilave edilerek 37°C’de 10 dakika bekletilmiştir.
2. 65°C’lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra 150 µl potasyum asetat tamponu ilave edilip homojenizasyon sağlanana dek karıştırılmıştır.
3. Karışım 12.000 g’de 4°C’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatantlar yeni, steril bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
4. Yeni eppendorf tüpüne aktarılan sıvının üzerine eşit hacimde izopropil alkol (2-propanol) ilave edilip, homojenizasyon sağlanana dek karıştırılmıştır.
5. Karışım 11.000 g’de 4°C’de 2 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır.
6. Örnekler üzerine 300 µl %70’lik soğuk etanol ilave edilip, 10.000 g’de 4°C’de 2 dakika santrifüjlenmiş ve etanol uçana kadar beklenilmiştir.
7. Etanol uçtuktan sonra örnekler üzerine 50 µl ultra saf su ilave edilerek süspanse edilmiş ve +4°C’ye kaldırılmıştır.

Ticari kitle DNA izolasyonu yöntemi

Roche High Pure DNA ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda tüm basamaklar uygulanarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

İşlem sonunda izole edilen DNA, Nanodrop cihazında kontrol edilerek, (Şekil 4.4) 260/280 nm oranı 1.8-2 aralığından uzak olanlar ve DNA miktarı uygun olmayanlardan uygun DNA elde edilene kadar tekrar izolasyon yapıldı. PCR çalışmaları için uygun miktarda ve kalitede elde edilen DNA içeren örnekler elution buffer içinde -20°C’de muhafaza altına alındı.

3.2.4. Konvansiyonel PCR çalışmaları

3.2.4.1 PCR optimizasyon çalışmaları

16S rRNA geni temelli PCR çalışmaları

Çalışma üç aşamalı bir metot karşılaştırması olarak düşünüldüğünden, moleküler yöntemler arasında primer ve prob farklılığından kaynaklanan yorum farklılıklarını bertaraf edebilmek için tek bir kaynaktan, aynı gen bölgesini hedefleyen primer ve prob tasarımı belirlenerek primer ve prob siparişi verildi. Sentezlenen dört primerden (BKZ Tablo 3.2) seçilen mobF ve mobR primer çifti kullanarak 214 bp’lik bir gen bölgesini amplifiye etmeyi hedefleyen 16S rRNA gen temelli bir PCR yöntemi uygulandı.

Real-time PCR cihazı olmayan laboratuarlarda kullanılabilmesi için Konvansiyonel PCR ve Real-Time PCR metotlarında aynı primerlerin kullanılıp paralel sonuçlar elde etme fikrinden vazgeçilmesinin ardından. Konvansiyonel PCR için OIE tarafından önerilen primer çifti (BKZ Tablo 3.3) ile 16S rRNA gen bölgesinden 1106 bp’lik bir ampikonu hedefleyen bir PCR protokolü uygulamaya karar verildi.

Metalloproteinaz geni temelli PCR çalışmaları

Primerler ve prob	Dizilimi
Metallo F	CGTATTCAGAGACGGTGATGG tm;59
Metallo R	CGTGAGTCAATTCATGGCCTA tm;59
UPL 85	Fam-GACCTGGA-Tamra

Tablo 3.6 Metalloproteinaz gen bölgesi hedefli primerler ve prob (Bu çalışma için dizayn edilmiş ve UPL probu ile entegre edilmiştir)

3.2.4.2 Konvansiyonel PCR yöntemi ile örneklerin değerlendirilmesi

Saflaştırılan genomik DNA'lar agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra PCR'da kalıp DNA olarak kullanıldı. Reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde ayarlanmış olan PCR prosedürünün içeriğindeki bileşenler, aşağıdaki belirtilen sırayla PCR tüpüne konuldu.

Ultra saf su	10.65 µl
Reaksiyon tamponu (10x)	2.5µl
MgCl ₂ (10mM)	3.6µl
AFB-F primeri (10 pM)	1.0µl
AFB-R primeri (10 pM)	1.0µl
dNTP (10 mM)	1.0µl
Taq DNA polimeraz (1U)	0.25 µl
Kalıp DNA	5.0µl

Uygulanan PCR'ın termal döngüsü aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

94°C'de 5 dakika (başlangıç denatürasyonu)	1 döngü
94°C'de 1 dakika, 63°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika	40 döngü
72°C'de 5 dakika (son polimerizasyon)	1 döngü

3.2.5 Real – time PCR çalışmaları

5'ATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCTGAAGCA
 ACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCCTCGACCGGTTTAGAGA
CAGACCTTTTCCTTCGGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
 GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
 CCCTTGATCTTAGTTGCAGCACGCAGAGGTGGGCACTCTAAGATGACT
 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
 CCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGGTACAACGG
 GAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTCAAAAGCCGATCTCAGTT
 CGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAA
 TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGTCTTGTACACAC
 CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTACAACACCC-3'

F; 5'-GACCTTTTCCTTCGGGGACA-3'

R; 5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'

Probe; UPL 94 Fam-5'-GGAGACAG-3'tamra

Yukarıdaki amplikon diziliminde belirtildiği gibi, reverse primer aynı bırakılıp forward primer değiştirildi, 1106 bp'lik amplikonun 137 bp'lik daha kısa bir bölgesi hedeflendi ve amplikon içine prob entegre edilerek ilk PCR çalışması ile yakın bir hedef belirlendi.

Yukarıda detayları verilen primer ve problarla, 10µl'lik final hacminde, kapillar tüpler içinde, Roche LightCycler 1.5 cihazında, LightCycler 3 programı kullanılarak uygulanan PCR'ın termal döngüsü aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

94°C'de 5 dakika (başlangıç denatürasyonu)	1 döngü
95°C'de 10 saniye, 52°C'de 10 saniye, 72°C'de 10 saniye	35 döngü
72°C'de 5 dakika (son polimerizasyon)	1 döngü

3.2.6 Sekans analizi ile çalışmanın verifikasyonu

Moleküler teşhis çalışmaları sonunda, bütçenin elverdiği, DNA miktarı ve saflığı ideale en yakın olan dört örnek DNA, PCR ürünü ve primerler çalışma verileri de eklenerek İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne gönderilerek sekans analizi hizmet olarak satın alındı.

3.2.7 Tespit limiti çalışmaları

3.2.7.1 Konvansiyonel PCR için tespit limiti çalışmaları

Tespit limiti çalışmaları için yayınlar taranmış, bir *P. larvae*'nin total kromozomunun 4,43 fg olduğunun kabul edildiği görülmüştür (Sang Hoon Han et al. 2008). Eldeki referens suştan elde edilen DNA izolatu Nanodrop 2000 cihazında ölçülmüş, 5µl'lik örnek hacmi başına 0.00000443 ng DNA olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. Bu hesaplamaların ardından örnek başına 1, 2, 3,

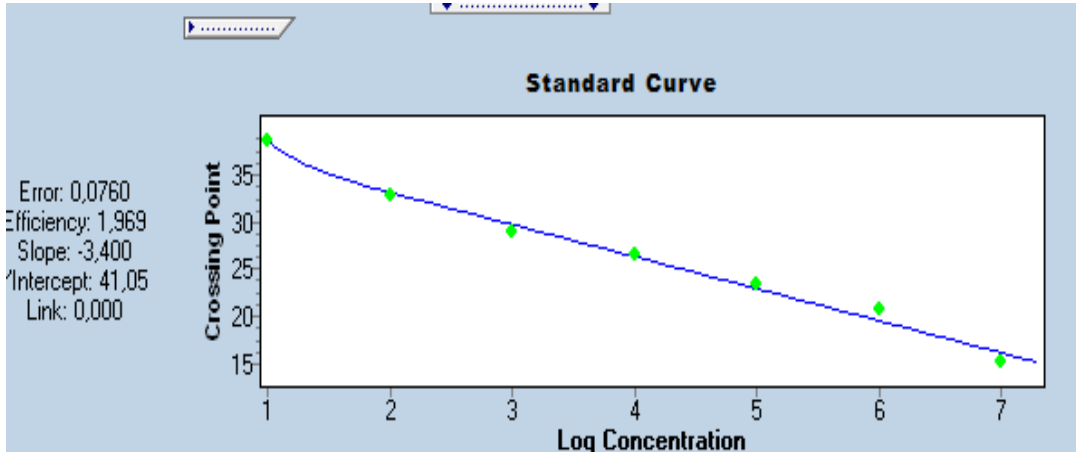
4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 bakteri DNA'sı olacak şekilde DNA izolatu PCR grade su ile sulandırılarak 5µl örnek hacmi ile PCR çalışması yapılmıştır

3.2.7.2 Real-time PCR için tespit limiti çalışmaları

Real-time PCR için tespit limiti çalışmaları, hizmet alımıyla yapılmıştır.

Standart eğrinin oluşturulması

P. larvae teşhisi için hedeflediğimiz ampikonlar, ticari kit (Promega TA Clonning Kit) kullanılarak, kit talimatlarına uygun olarak plasmidlere klonlandı. Klonlama sonrası elde edilen plasmidlerden hedef DNA 10^{10} hedef molekül/reaksiyon konsantrasyonu saptandı. 10^{10} standart plasmid seri dilüsyon yapılarak en az 7 farklı standart oluşturuldu ve standart eğri bu standartlar kullanılarak çizildi. 10^{10} standartından 10µl alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine 90 µl su ilave edilerek ve vortexlenerek 10^8 standartı oluşturuldu, bu şekilde 10^1 kopya sayısına kadar seri dilüsyon hazırlanarak standartlar oluşturuldu.



Şekil 3.7 Oluşturulan standart eğri

Primerler için optimizasyon

Öncelikle primerlere yanında gelen kullanım klavuzlarında yazan $100\mu\text{M}$ için gerekli su miktarı eklenerek $100\mu\text{M}$ 'a (yani $100\text{ pmol}/\mu\text{l}$ 'ye) sulandırıldı.

Sonra her parametre için aşağıda tek tek belirtilen ara stoklar oluşturularak çalışıldı.

Primer ara stok hazırlanışı; F ve R primerleri kullanıldı. F primerden 10 μM (100 μM 'lık ana stoktan 10 μl alınıp üzerine 90 μl su eklenerek), R primerden 10 μM (100 μM 'lık ana stoktan 10 μl alınıp üzerine 90 μl su eklenerek) ara stok oluşturuldu. Sonrasında aşağıdaki karışım hazırlandı.

F:0.5 μl

R:0.5 μl

Prob:0.2 μl

Enzim :5 μl

Su:1.8 μl

DNA: 2 μl

Cihaz protokolü ve veri analizi

Cihaz protokolü

Program	Denaturasyon	Amplifikasyon			Cooling
Parametre					
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu			Yok
Döngü	1	50			1
Hedef [$^{\circ}\text{C}$]	95	95	60	72	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Ramp.Rate [$^{\circ}\text{C}/\text{s}$]	20	20	20	20	20

Veri analizi

LightCycler 480 yazılımı, data analizini var yok ve kantitasyon için absolute quantitation second derivative analizi kullanılarak 530 kanalından belirlendi, standart eğri üzerinden her örneğin konsantrasyonu ct değerleri ile hesaplandı.

4. BULGULAR

Çalışma sonucunda; Şekil 4.1’de çeşitleri belirtilen örneklerin her üç yöntemle yapılan değerlendirme sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Tabloda sonuçları belirtilmeyen 71 örnek, her üç yöntemle de AYÇ yönünden negatif bulunmuştur.

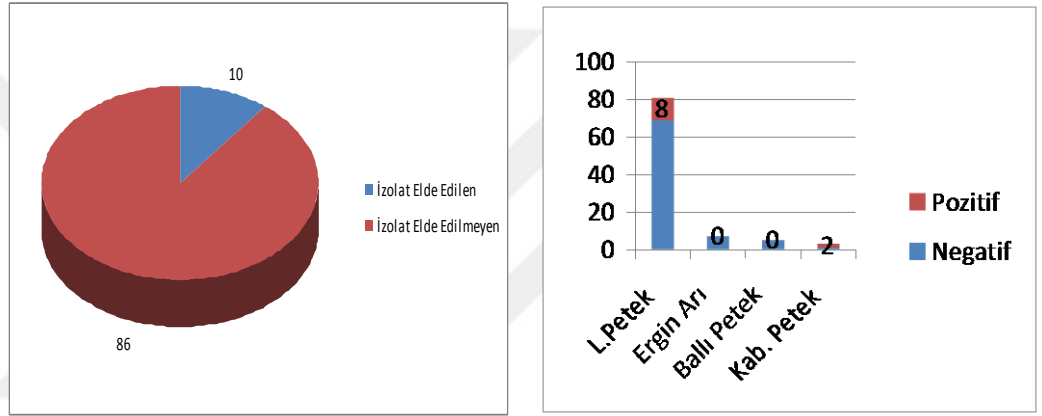
Örnek no	Kültür Sonucu	Konvansiyonel PCR Sonucu	Real-Time PCR Sonucu/ilk sinyal döngüsü
1			+ / 27
2			+ / 27
4			+ / 29
8		+	+ / 24
19			+ / 28
20		+	+ / 18
27		+	+ / 25
31	+	+	+ / 22
32	+	+	+ / 19
34	+	+	+ / 18
35	+	+	+ / 19
48	+	+	+ / 21
49		+	+ / 16
52			+ / 18
62			+ / 29
67			+ / 27
69	+	+	+ / 21
70	+	+	+ / 19
71			+ / 28
78	+	+	+ / 20
80		+	+ / 22
84	+	+	+ / 21
85	+	+	+ / 21
86		+	+ / 21
89			+ / 28

Tablo 4.1 Örneklerin Analiz Sonuçları

4.1. Kültür Yöntemi Bulguları

Toplam olarak incelenen 96 adet örnekten, konvansiyonel kültür yöntemi ile 10 örnekte pozitif sonuç alındı (Tablo 4.1). Pozitif sonuçlar, anamnez, klinik görünüm, makroskobik bulgularla uyumlu bulundu.

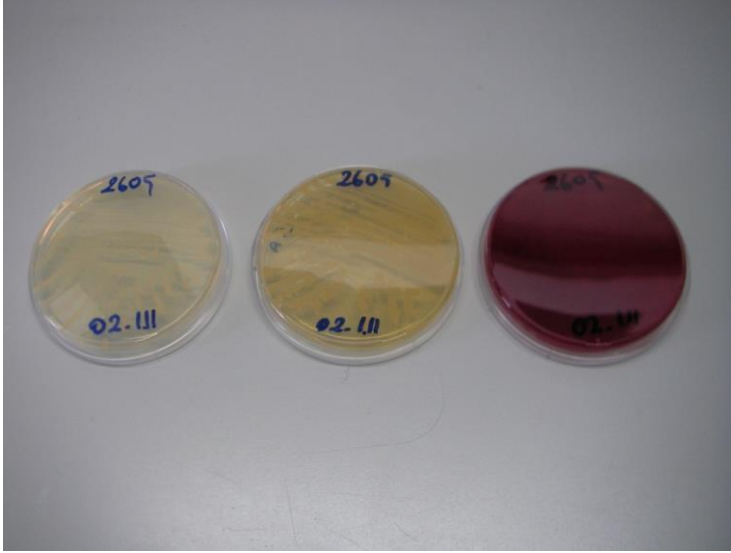
Toplam 7 adet ergin arı örneği ve ballı petek örneğinden AYÇ şüpheli suş izole edilmemiştir. Toplam 3 adet kabartılmış petek örneğinin 2 adedinden AYÇ şüpheli suş izole edilmiştir.



Şekil 4.1 Klasik kültür yöntemiyle izole edilen şüpheli kolonilerin dağılımı



Şekil 4.2 *P. larvae* referens suşunun (KCTC 3744) Kanlı Kolombiya Agardaki Görüntüsü



Şekil 4.3 *P. larvae* saha izolatının (Örnek No:31) J, Nutrient, Kanlı Kolombiya agardaki görüntüsü



Şekil 4.4 Örneklerin sıvı besiyerindeki 72 saatlik kültürlerinin görüntüsü.

Pozitif örneklerin anamnezinde, geçmiş dönemde gözlemlenen AYÇ klinik görünümü, larva ölümleri hikayesi, stres faktörlerinden herhangi birine (ani sıcaklık düşmesi, beslenme yetersizliği, nakliye gibi) maruz kalma, yakın geçmişte komşu arıliklarda AYÇ belirtileri gösteren kolonilerin varlığı gibi bilgilerin varlığı sonuçlarla uyumlu görüldü.

Kültür yöntemi ile izole edilen suşlardan, Gram boyama yapıp Gram (+) sporlu çomak, fakültatif anaerob, katalaz negatif suşlar üzerinde çalışmaya devam edildi. Sonrasında Vitek-2 Kompact cihazı ve bu cihazın basil (BCL) kiti ile biyokimyasal tanımlama çalışmaları yapıldı (Tablo 4.2). Biyokimyasal profillere bakıldığında, tamamının Fenilalin Arilamidaz ve Tirosin Arilamidaz pozitif, Leusin Arilamidaz, Alanin Arilamidaz,, D-Mannoz, D-Glikoz, D-Riboz, Polimiksin-B direnci yönünden de değişken oldukları gözlemlendi. Diğer biyokimyasal parametreler yönünden, tamamı negatif olarak saptandı. Cihazın otomatik tanımlama sisteminin suşları *Bacillus smithii* olarak adlandırdığı görüldü. Yapılan araştırmalarda, *B. smithii*'nin hemoliz pozitif ve katalaz pozitif olduğu, elde edilen *P. larvae* izolatlarının ise hemoliz ve katalaz negatif veya çok zayıf pozitif olduğu belirlendi. Mevcut veriler ışığında Vitek-2 Kompact cihazının direkt identifikasyon için kullanımının uygun olmadığı gözlemlendi. İdentifikasyon sonucu yerine biyokimyasal test verileri kullanıldı.

Test	3558	86	85	78	70	69	35	34	31
BXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LysA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LeuA	(+)	-	-	(-)	-	-	+	-	(-)
PheA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ProA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PyrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AlaA	-	(+)	-	+	-	+	+	-	+
TyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BNAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDEX	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MdG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ELLM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MdX	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GlyA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dMNE	+	-	+	+	-	-	(-)	+	-
dMLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVATE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dTAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dTRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dGLU	-	-	+	+	-	-	+	+	-
dRIB	-	-	(+)	(+)	-	-	-	+	-
PSCNa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl %6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OLD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TTZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POLYB_R	-	+	-	-	-	-	-	(-)	-

Tablo 4.2 Elde Edilen Suşların Biyokimyasal Profilleri*

Numaralar, izolatların örnek numaralarıdır.

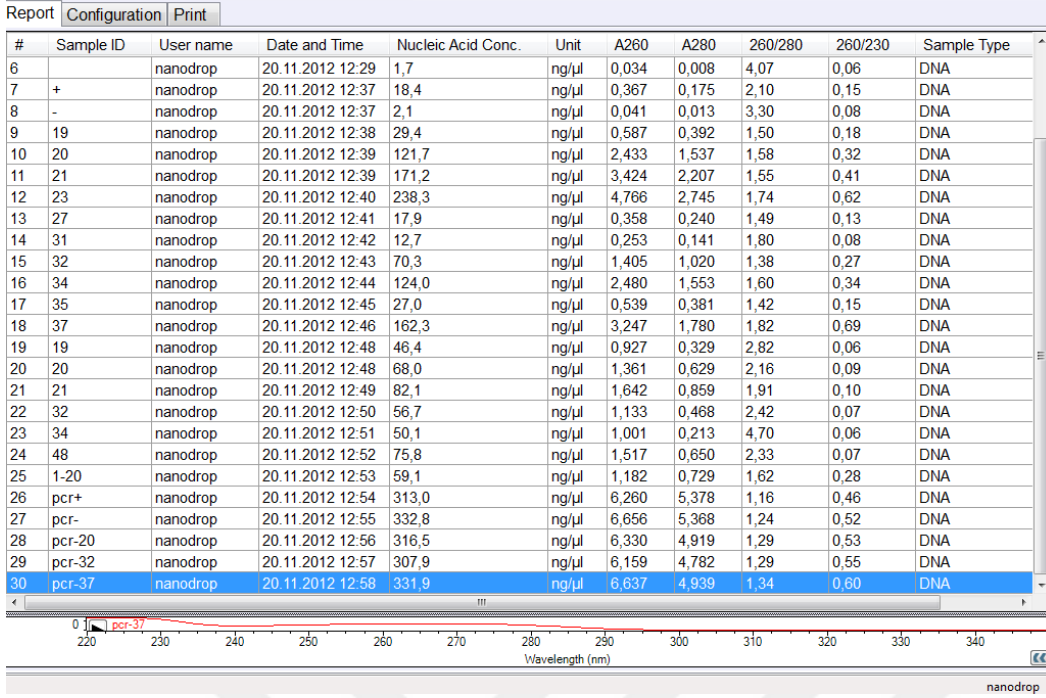
*Biyokimyasal test detayları için BKZ Tablo 3.5

Klinik görünüm ve makroskopik bulgulara (koku, ölü larvaların görünümü, uzama testinde 2.5 santimetrenin üzerinde uzama gibi) AYÇ yönünden müspet olarak değerlendirilen bazı örneklerde, kültür sonuçları ile pozitif sonuç elde edilemedi.

4.2 Konvansiyonel PCR Yöntemi Bulguları

4.2.1 DNA ekstraksiyonu

Moleküler çalışmalar için DNA ekstraksiyonu çalışmalarında, manuel ve ticari kitle DNA izolasyon yöntemleri kullanıldı. Manuel DNA izolasyon yöntemi ile DNA eldesinde stabil sonuçlar elde edilemedi. Manuel yöntemle ilk çalışılan 22 larvalı petek örneği, bir pozitif ve bir negatif kontrol suşuyla yapılan DNA ekstraksiyonunda sadece 18 örnekte DNA izolasyonu yapılabilirken 6 örnekte DNA izolasyonu yapılamadı. Ticari kitle DNA izolasyonu yönteminde, kitin kullanım kılavuzunda bakteriler için 10µm/örnek Tris-HCl talimatı olmasına rağmen, spordan DNA ekstraksiyonunda stabiliteyi sağlamak için, bu aşamada modifikasyon yapılarak 20 mg/ml stoktan 200 µl/örnek olacak şekilde Lizozim kullanımı ile hem klinik örneklerde, hem de referens suşlarda daha iyi ve stabil sonuçlar alındı. Elde edilen örnek DNA'ları, NanoDrop 2000c Spectrophotometer'de DNA miktar ve saflıkları yönünden ölçüldü (Şekil 4.4) ve ileriki çalışmalar için - 20°C'de saklandı.



Şekil 4.5 Örneklerden izole edilen DNA'ların bir kısmının Nanodrop cihazındaki ölçüm sonuçları

4.2.2 Primerler ve konvansiyonel PCR

Çalışma başlangıcında, primerlerin, hedefledikleri farklı gen bölgelerinin yöntemin spesifitesini etkilememesi için aynı primer çifti ile hem konvansiyonel PCR hem de bu primerler ile kombine edilecek bir prob ile real-time PCR çalışması düşünüldü. Bu amaç için 16S rRNA gen bölgesi hedefli 4 primer ve 2 prob kullanıldı (BKZ Tablo 3.6).

Yöntem sonuçlarında 25 örnek pozitif olarak değerlendirilmesine rağmen, kültür yöntemi ile müspet olarak tespit edilen 4 örnekte 16S rRNA gen bölgesi hedefli spesifik bantlar görülmedi. Bu örnekler için, yapılan optimizasyon çalışmalarına rağmen sonuç değişmedi. Real-Time PCR yöntemi uygulanmak istediğinde ise sonuç alınamadı. Primer ve problemlerin saklanma koşullarından kaynaklı bir problem yaşanmış olabileceği düşüncesi ile tekrar prob siparişi verilip, primerin spesifitesi tekrar sorgulandı. Konvansiyonel PCR yönteminin Real-Time yöntemi ile uyumlu olması için aynı primerler ve yeni sentezlenecek problemler ile devam etme kararı alındı. Yeniden sentezlenen problemler geldiğinde yöntem tekrar uygulandı ancak Real-Time PCR uygulamasında yine sonuç alınamadı.

Gerek yöntemin olumlu sonuç vermemesi gerekse kültür yöntemi ile çelişkili alınan sonuçlar nedeniyle primer ve prob tasarımlarının değiştirilmesine karar verildi. Bu defa 16S rRNA yerine metalloproteinase gen bölgesi hedefli bir primer tasarımına karar verildi. Bu geni çoğaltmayı hedef alan mpF ve mpR primerleri ile konvansiyonel PCR ve Real-Time PCR yapıldı. Konvansiyonel PCR ile 13 örnek pozitif olarak belirlendi ancak, kültür yöntemi ile pozitif olarak saptanan iki örnek, bu primerler ile pozitif olarak saptanamadı. Hemen ardından yapılan Real-Time PCR uygulamasında stabil pozitif sonuç elde edilemedi.

Çalışmada girilen darboğazın aşılabilmesi için PCR ve Real-Time PCR için aynı primerleri kullanma fikrinden vazgeçildi. Uluslararası otoritelerce kabul edilen (OIE Terrestrial Manual 2008) 16S rRNA gen bölgesi hedefli, 1106 bp'lik bir amplikonu hedefleyen AFB-F ve AFB-R primerleri ile devam etme kararı alındı.

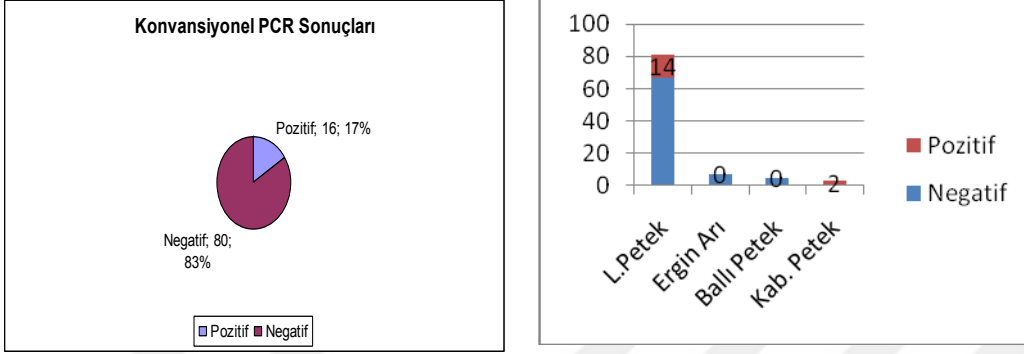
Konvansiyonel PCR uygulamaları için OIE tarafından refere edilen, 1106 bp'lik bir 16S rDNA gen bölgesi amplifikasyonunu hedefleyen primer çifti ile en uygun ve stabil sonuçlar alındı.

Materyal ve metot bölümünde de belirtildiği gibi, stabil sonuçlar alınan gen bölgesi üzerinde çalışmanın devamı amacıyla, reverse primer aynı bırakılıp forward primer değiştirildi, 1106 bp'lik amplikonun 137 bp'lik daha kısa bir bölgesi hedeflendi ve amplikon içine prob entegre edilerek konvansiyonel PCR çalışması ile yakın bir hedef belirlendi.

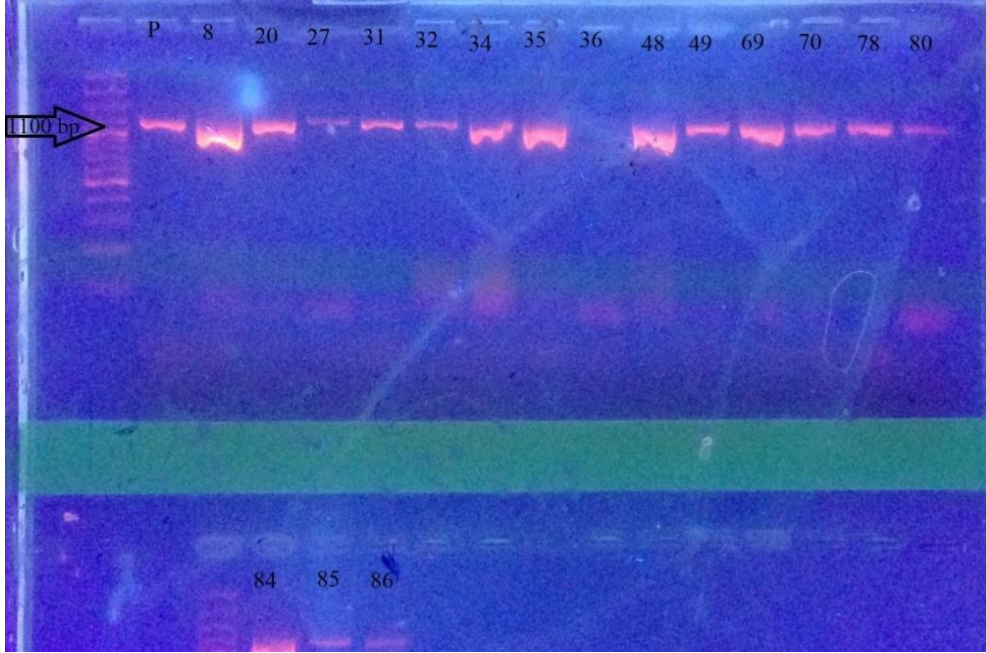
4.2.3 Konvansiyonel PCR bulguları

Yöntemin optimize edilmesinin ardından yapılan konvansiyonel PCR çalışmalarında, kültür yöntemi ile AYÇ yönünden pozitif olarak değerlendirilen 31, 32, 34, 35, 48, 69, 70, 78, 84 ve 85 numaralı örneklerin hepsinde 16S rRNA gen bölgesini hedefleyen AFB-F AFB-R primer çifti ile pozitif sonuç saptandı. Bu örneklerin yanı sıra, kültür yöntemi ile AYÇ yönünden negatif olarak değerlendirilen 8, 20, 27 ve 49 numaralı örneklerde de pozitiflik saptandı. Özellikle 20 ve 49 numaralı örneklerin muayenelerinde klinik olarak AYÇ

yönünden pozitif olarak değerlendirilmesine rağmen kültür yöntemi ile negatif, konvansiyonel PCR yöntemi ile pozitif olarak sonuç vermesi dikkate değer bulundu.



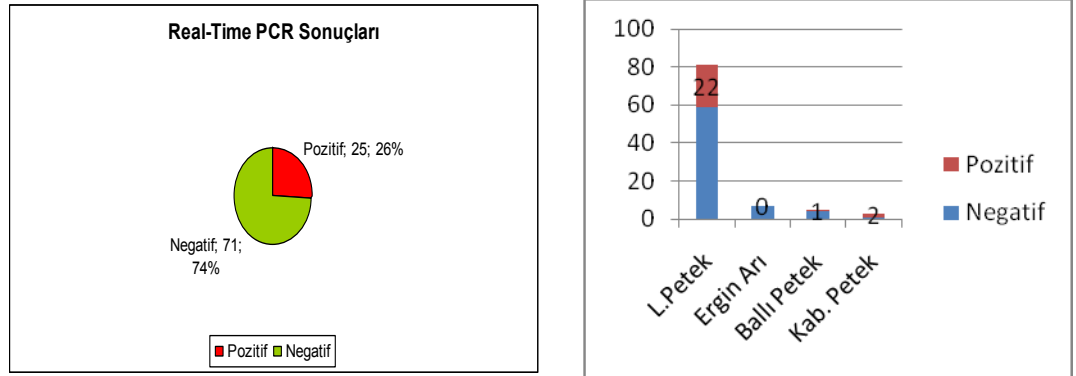
Şekil 4.6 Konvansiyonel PCR Bulguları



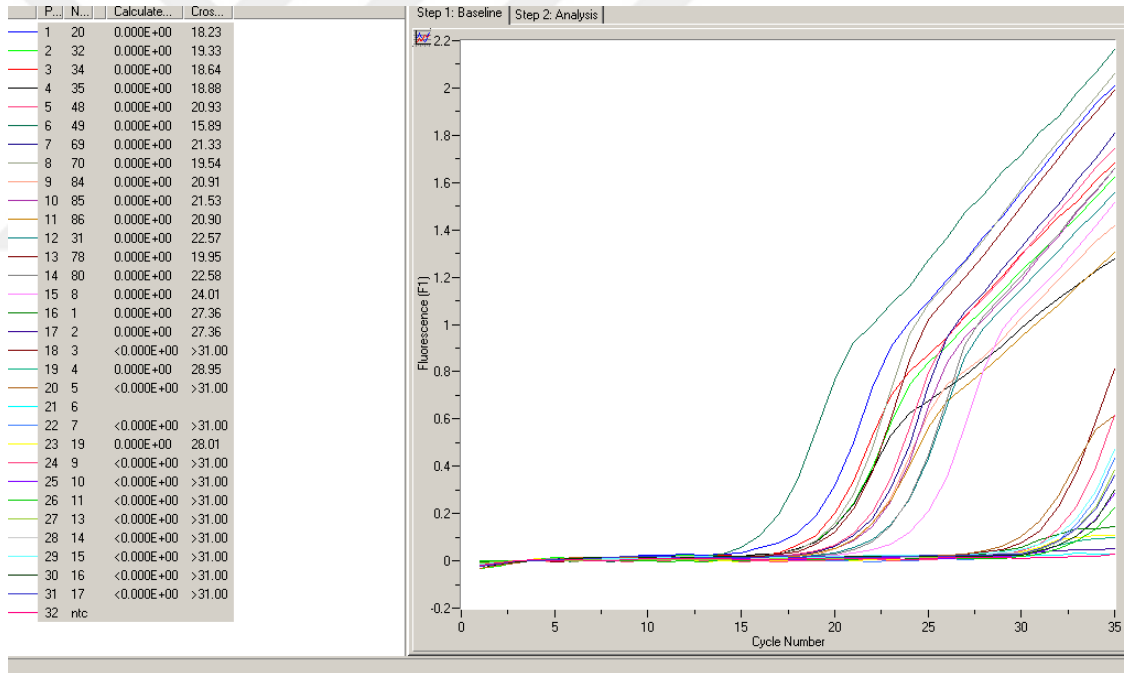
Şekil 4.7 Konvansiyonel PCR Yönteminde Jel Elektroforezi Sonrası Pozitif Örneklerin Görüntüsü

Ladder yanındaki kuyucuk pozitif, 36 numaralı örnek, negatif olarak kullanılmıştır.

4.3 Real – time PCR bulguları



Şekil 4.8 Real-Time PCR Bulguları



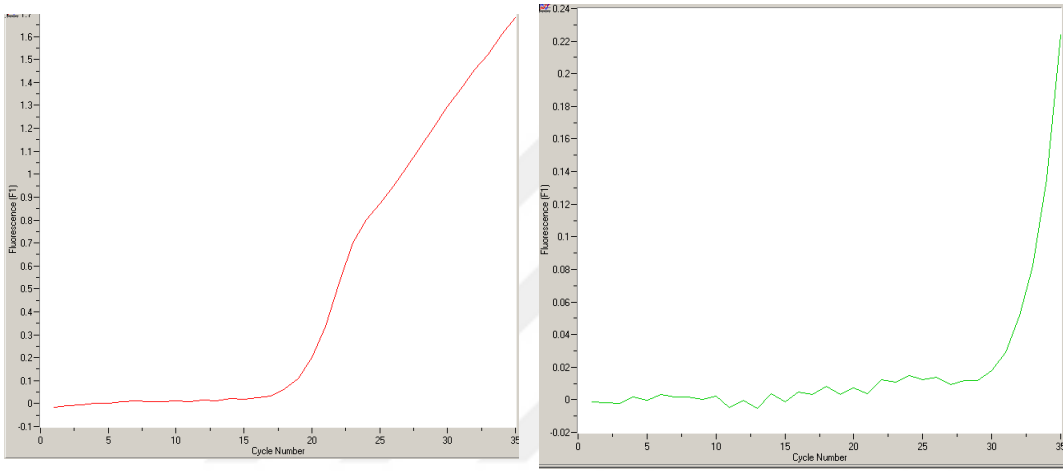
Şekil 4.9 Real-Time PCR Yöntemi İle Yapılan Çalışmanın Görüntüsü

Yukarıdaki şekilde görülen ilk 15 örnek, konvansiyonel PCR yöntemi ile AYÇ yönünden pozitif olarak belirlenmiş örneklerdi ve tamamında 25. döngüden önce floresan ışıma tespit edildi. Örneklerin floresan değerlerine tek tek bakıldığında (Şekil 4.7);

Pozitif örneklerde, 30. döngüye kadar saptanmaya başlayan, doğrusal ilerleyen bir floresan değeri eğrisi gözlemlendi.

Negatif örneklerde ise 31. döngüde saptanmaya başlayan ve zigzaglar oluşturan bir floresan değeri eğrisi gözlemlendi.

Bu diyagramlara bakarak da sadece ilk sinyalin alınma döngüsüne göre değil, sinyal değerine göre de değerlendirme yapılabileceği gözlemlendi.



Şekil 4.10 Pozitif (Solda) ve Negatif (Sağda) Örneklerin Floresan Eğrileri

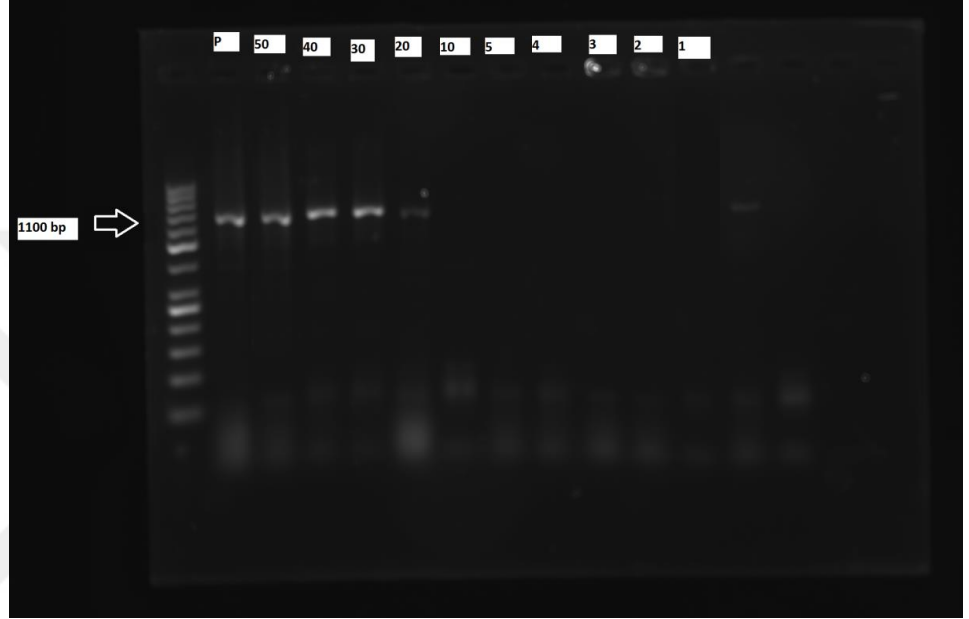
Örnekler türüne göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde; 65, 82, 87, 89 ve 96 olarak numaralandırılan 5 adet petekli bal örneğinden yalnızca 89 numaralı örnek Real-Time PCR yöntemi ile AYÇ yönünden pozitif bulundu. 56, 60, 66, 68, 74, 90 ve 91 olarak numaralandırılan 8 adet ergin arı örneklerinin hiçbirinde, hiçbir yöntemle pozitiflik saptanmadı.

4.4 Tespit Limiti Çalışmaları

4.4.1 Konvansiyonel PCR tespit limiti

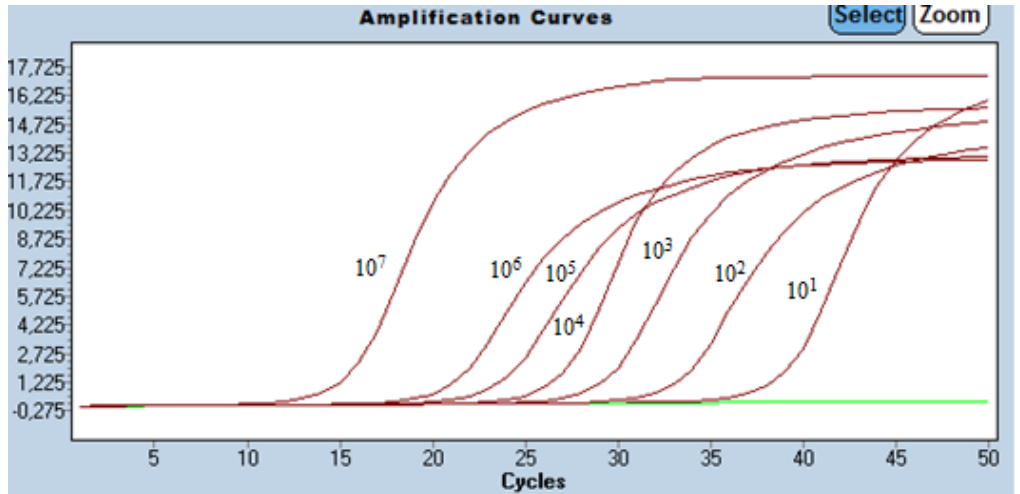
Tespit limiti çalışmaları için yapılan literatür taramasında, bir *P. larvae*'nin total kromozomunun 4,43 fg olduğu olduğunun kabul edildiği (Sang

Hoon Han et al. 2008) görüldü. Eldeki referens suştan elde edilen DNA miktarı, Nanodrop 2000 cihazında ölçüldü, 5µl'lik örnek hacmi başına 0.00000443 ng DNA olacak şekilde hesaplamalar yapıldı. Bu hesaplamaların ardından örnek başına 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 bakteri DNA'sı olacak şekilde DNA izolatu PCR grade su ile sulandırılarak 5µl örnek hacmi ile PCR çalışması yapıldı. Çalışma sonucunda tespit limiti 20 bakteri/örnek olarak belirlendi(Şekil 4.8).



Şekil 4.11 Konvansiyonel PCR tespit limiti çalışması sonucu

4.4.2 Real-time PCR tespit limiti



Şekil 4.12 LightCycler 480 cihazından alınan amplifikasyon eğrileri

Örnek	Ct değeri	Konsantrasyon	Hesaplama
10 ¹	38,73	1,00E+01	3,33E+00
10 ²	32,96	1,13E+02	3,77E+01
10 ³	29,06	1,58E+03	5,27E+02
10 ⁴	26,53	8,83E+04	2,94E+04
10 ⁵	23,37	7,49E+05	2,50E+05
10 ⁶	20,79	4,36E+06	1,45E+06
10 ⁷	15,14	4,29E+07	1,43E+07
Negatif	0	0,00E+00	0,00E+00

Tablo 4.3 Hesaplama tablosu

Elde edilen veriler ışığında, kullanılan hidroliz probuyla, yöntemin tespit limiti 10¹ bakteriyel DNA/örnek olarak hesaplandı.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı arıcılık sektöründeki önemli bir patojen olan *P. larvae*'nin saha örneklerinden farklı yöntemlerle tespitinin yapılması ve bu yöntemlerin birbirleriyle duyarlılıkları bakımından karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla kullanılan yöntemler klasik kültür, konvansiyonel PCR ve Real-Time PCR yöntemleridir.

Bu amaçla çalışmamızda Mart 2010 –Aralık 2010 tarihleri arasında Muğla, İzmir, Aydın, Uşak illerinden alınan örnekler ile Samsun ve Elazığ Veteriner Kontrol Enstitülerinden gönderilen örneklerle çalışıldı. seksenbiri larvalı petek, yedisi ergin arı, beşi ballı petek, üçü kabartılmış petek olmak üzere toplam doksanaltı adet örnek analize alındı.

5.1. Klasik Kültür Yöntemi

Çalışmamız dahilinde incelenen doksanaltı adet örnekten, konvansiyonel kültür yöntemi ile on örnekte pozitif sonuç alındı. Pozitif sonuçlar, anamnez, klinik görünüm, makroskopik bulgularla uyumlu bulundu. Kültür yöntemi ile izole edilen suşlardan, Vitek-2 Compact cihazı ve bu cihazın basil (BCL) kiti ile biyokimyasal tanımlama çalışmaları yapıldı (Bkz.Tablo 4.2). Cihazın otomatik tanımlama sisteminin suşları %94-98 olasılıkla *Bacillus smithii* olarak adlandırdığı görüldü. Yapılan araştırmalarda, *B.smithii*'nin hemoliz pozitif ve katalaz pozitif olduğu, elde edilen *P. larvae* suşlarının ise hemoliz ve katalaz negatif olduğu belirlendi. Mevcut durumda identifikasyon sonucu yerine biyokimyasal test verileri kullanıldı.

Tablo 5.1'de ayrıntıları verildiği üzere, klinik görünüm ve makroskopik bulgularda (koku, ölü larvaların görünümü, uzama testinde 2,5 santimetrenin üzerinde uzama gibi) AYÇ yönünden müspet sonuç beklenen bazı örneklerde, kültür sonuçları ile pozitif sonuç elde edilemedi. Sebebinin ampirik antibiyotik kullanımı olup olmadığının saptanması için sonraki çalışmalarda kalıntı analizlerinin de yapılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

No	Klinik Muayene	Makroskopik Görünüm	Kültür Sonucu	Konvansiyonel PCR	Real-Time PCR Sonucu / İlk + Sinyal Değeri
1	Ş	Ş			+ / 27
2					+ / 27
4					+ / 29
8		Ş		+	+ / 24
19					+ / 28
20		Ş		+	+ / 18
27				+	+ / 25
31	Ş	Ş	+	+	+ / 22
32	Ş	Ş	+	+	+ / 19
34	Ş	Ş	+	+	+ / 18
35	Ş	Ş	+	+	+ / 19
48	P	P	+	+	+ / 21
49	Ş	Ş		+	+ / 16
52					+ / 18
62					+ / 29
67					+ / 27
69		Ş	+	+	+ / 21
70	Ş	Ş	+	+	+ / 19
71					+ / 28
72	Ş	Ş			
77	Ş	Ş			
78	Ş	Ş	+	+	+ / 20
80	Ş	Ş		+	+ / 22
82	Ş	Ş			
84	Ş	Ş	+	+	+ / 21
85	Ş	Ş	+	+	+ / 21
86	Ş	Ş		+	+ / 21
89	Ş	Ş			+ / 28

Tablo 5.1 Örneklerin Muayene Bulguları (Ş: Şüpheli, P: Pozitif)

Benzer bir çalışmada araştırmacıların (Kılıç vd., 2010) çalışmalarında, izolasyon sonrası yalnızca indol, katalaz, voges-proskauer, metil red ve nitrat indirgeme testlerini yaptıkları gözlemlendi. Araştırmacılar, pratikte 80°C’de 10 dakikalık ısıtma işlemi sonrası kültürlerde hemoliz özelliği, koloni morfolojisi, katalaz testi, gram ve nigrosin boyamalar ile yapılan identifikasyonu yeterli bulduklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar saptandı.

Kültür yöntemi çalışmalarında kontrol suşu olarak kullanılması öngörülen ve United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service (USDA-ARS)’den temin edilen B 3555 numaralı *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*, ve B 3685 numaralı *Paenibacillus larvae* subspecies *pulvificiens*, B 383 ve 385 numaralı *Paenibacillus alvei* suşları, laboratuvarımıza ulaştıktan sonra üremedikleri için kullanılamadı.

Örneklerin kültür yöntemi ile muayenesinde, bakanlığımızın Metot Birliği Kitabı esas alındı. Şüpheli larva materyallerinin ekime hazırlığı, kitapta belirtildiği şekilde yapıldı (**OIE Terrestrial Manual 2008**). Kitapçıkta ve kaynaklarda petekli bal örneklerinin ekime hazırlanması ile ilgili açık bir yöntem bulunamadığı için, örneklerde stomacher homojenizasyonu uygulandı, daha sonra elde edilen sıvı kısımdan ekim yapıldı (Gillard M., et al 2008, Iurlina M.O. ve Fritz R., 2005). Ergin arıların ekime hazırlanması aşamasında, etil alkol içerisinde parçalama (OIE Terrestrial Manual 2008) öngörülmesine rağmen, gerek etkenin stabilitesi ile ilgili çalışmalarda etkenin çevresel şartlardan etkilenebileceği belirtildiğinden, gerekse etkenin sporlarının ergin arı sindirim sisteminden daha yüksek oranda dışarı çıkarılabileceği tahmin edildiğinden steril havanda ezme, ardından stomacher homojenizasyonunun (Gillard M., et al 2008, Iurlina M.O. ve Fritz R., 2005) daha verimli olacağı düşünülerek bu yöntem uygulandı. Her iki yöntem paralel uygulandığında stomacher ile sindirim sistemi florasının sıvı kısma daha iyi aktarıldığı gözlemlendi.

Bu yöntem uygulanırken özellikle dikkat edilmesi gereken noktanın, steril çalışıp çevresel kontaminasyonu engellemek olduğu gözlemlendi. Aksi takdirde, özellikle aynı zaman dilimi içinde çok sayıda örnek çalışıldığında, örnekler arası ve çevresel kontaminasyon riskinin çok yüksek olduğu gözlemlendi.

Etkenin izolasyonu için laboratuvarlarımızda proje aşamasında öngörülen ortamlar, mevzuattaki son değişiklikle birlikte revize edildi. Çalışmalarımızda etkenin en iyi J-Agar ve Kolombiya Agar'da üreyebildiği saptandı. Bu bulgularımız literatür bilgileri ile (Antunez et al., 2007, Govan et al., 1999, Hornitzky and Nicholls 1993, Kılıç vd., 2010, Martínez et al., 2010) uyumlu bulundu. Ancak yapılan bazı çalışmalarda daha çok MYPG ve PLA agar (De Graaf et al., 2001, Iurlina and Fritz 2005, Lindström et al., 2008) tercih edildiği gözlemlendi.

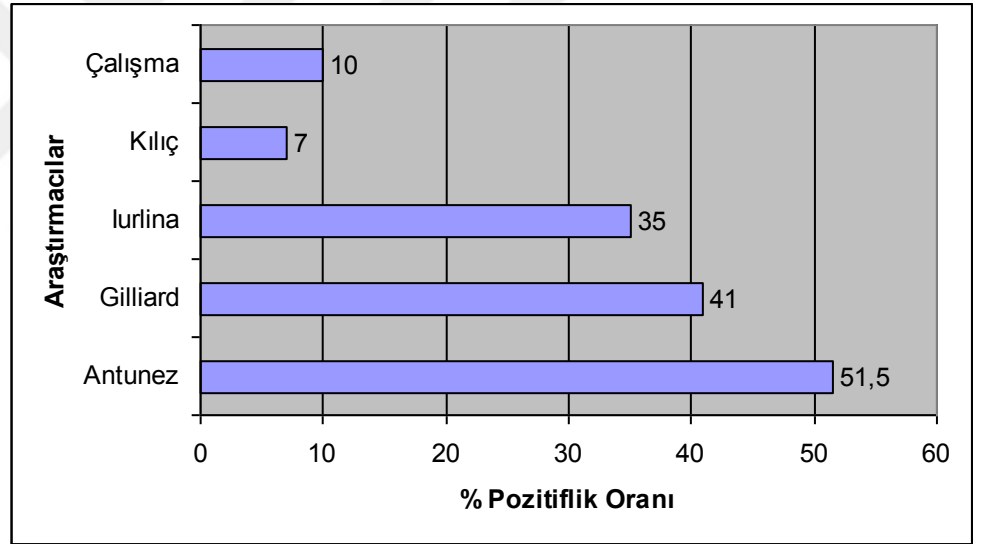
Mevcut mevzuatta etkenin teşhisi için altı adet katı (%5 koyun kanlı kolombiya agar, J agar, Nutrient agar, Brain Heart Infusion agar, Tiaminli Brain Heart Infusion agar), iki adet sıvı (Nutrient broth ve J broth) olmak üzere toplam sekiz vasat ile çalışılması öngörülmektedir. Bu besi yerlerine ekimi takiben, klinik örneklerde 2 - 4 gün, bal örneklerinde ise 14 güne kadar % 5 ile 10 arası CO₂'li ortamda 37 ± 1°C'de sporların vejetatif forma geçip üreyebilmesi için inkübasyon önerilmektedir. Yaptığımız laboratuvar çalışmalarında, %5 koyun kanlı kolombiya agar, J agar ve J broth kullanılmasının gerekli üremeyi belirleyebilmek ve teşhise gidebilmek için yeterli olduğu değerlendirildi. Besi yerlerinde üreyen kolonilerin değerlendirmesindeki katalaz testi ve nigrosin boyama testi verileri, literatür ile (OIE Terrestrial Manual 2008) uyumlu bulundu.

Klinik örneklerin kültür yöntemi ile incelenmesi sonrasında biyokimyasal karakterizasyonu ve identifikasyonunda, özellikle kullanılan metotta yayınlarla önemli farklılıklar gözlemlendi.

Biyokimyasal karakterizasyon ile ilgili temel farkın, karakterizasyon için kullanılan metottan kaynaklandığı saptandı. Kültür yönteminde elde ettikleri biyokimyasal sonuçlara yayınlarında yer veren bazı araştırmacılar (Kilwinski et al 2004), (Neuendorf et al., 2004), (de Graaf et al., 2006), (Genersch et al., 2006), bu işlem için BioLog sistemini, bazı araştırmacılar (Genersch et al., 2006), API 50CH ve API 20E tercih etmişlerdir. Abd Al-fattah ve arkadaşları ise (Abd Al-Fattah et al., 2009) izolasyonun ardından katalaz, amilaz, nitrat redüksiyonu, jelatinaz, kazeinaz, Voges-Proskauer ve holst süt testini manuel olarak uygulamışlardır. Kullanılan kitlerin içeriğinin karşılaştırılmasında, kullandığımız VITEK II Kompakt cihazının basil kiti ile farklı bir profilde olduğu saptandı.

Çalışmamızın kültür yöntemi kısmının gerçekleştirildiği BVKE Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda biyokimyasal identifikasyon için mevcut bulunan VITEK II Kompakt cihazı ve bu cihazın basil kiti biyokimyasal veriler için kullanıldı. Cihazın alt yapısı ve yazılımında *P. larvae*'yı tanımlamak için tanımlı bilgiler olmadığı saptandı. (Verilerin kullanımı ile ilgili kısım materyal ve metot kısmında 3.2.2 başlığı altında detaylı bir şekilde açıklanmıştır.) Çalışmamızın, *P. larvae*'nın VITEK II Kompakt cihazı ile elde edilen biyokimyasal test verilerinin bu denli detaylı olarak verilmesi ile ilgili ulaşılabilen ilk çalışma olması da önemli bir veri olarak değerlendirildi.

Bal ve ergin arı örneklerinden kültür metodu ile elde edilen sonuçlardaki pozitiflik oranları, Şekil 5.1'de ayrıntıları verildiği üzere, literatürlerdeki sonuçlardan farklı bulundu. (Antunez K. et al 2004, Iurlina M.O. ve Fritz R., 2005, Gilliard et al., 2008)



Şekil 5.1 Pozitiflik Oranları Karşılaştırılması

Bulgulardaki bu uyumsuzluğun, çalışmaya dahil edilebilen örnek sayısının az olması, örnekleme döneminde kolonilerin oldukça güçlü ve hijyen davranışlarıyla hastalıklara karşı dayanıklı olması ve genel olarak AYÇ insidensinin farklı olması ile ilgili olduğu düşünüldü. Çalışmamız bir metot karşılaştırma çalışması olarak düşünüldüğünden, hedefler arasında yaygınlığın veya pozitiflik oranının saptanması olmadığından, bu veriler sadece genel bilgi olarak değerlendirildi.

Örneklemede pozitif örneklerle zorlukla ulaşmadaki bir başka sebep te hastalıkla mücadelede uygulanan mevzuat olarak gözlemlendi. Yürürlükteki

mevzuatta, AYÇ ihbarı mecburi bir hastalıktır. Şüpheli bir durumda, en yakın Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne örnek gönderilmesi, sonuç AYÇ yönünden pozitif olarak değerlendirilirse hastalıklı kovanların tazminatsız imhası ve 2 aylık kordon ve karantina tedbirlerinin uygulanması emredilmektedir.

http://www.tarim.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Talimatlar/gkgm/balarilarinin_amerika_nyavru_curugu_hast_mucadele_koruma_talimati.pdf (Erişim tarihi 18.08.2017)

Mevcut durumda arıcılar, yaşayacakları maddi kayıpları ve hastalık çıkışında uğrayacakları itibar kaybını düşünerek şüpheli vakaları resmi kurumlardan gizlemektedirler. Bu durum, özellikle gezginci arıcılık yapılan ve kovanların birbirlerine çok yakın konumlandırıldığı arılıklarda hastalığın yayılımı yönünden çok tehlikeli olarak değerlendirildi.

5.2 DNA İzolasyon Çalışmaları

Moleküler çalışmalar için DNA ekstraksiyonu çalışmalarında, manuel ve ticari kitle DNA izolasyon yöntemleri kullanıldı. Yaptığımız denemelerde, bakteri kültürlerinde olumlu sonuçlar alınan konvansiyonel DNA ekstraksiyon yöntemi örneklerde kullanıldı, ancak DNA miktarı ve saflığı açısından sağlıklı sonuçlar alınamadı, dolayısı ile moleküler çalışmalarda sağlıklı sonuçlar elde edilemedi. Bu bulgunun konvansiyonel yöntemlerin örnekteki PCR inhibitörlerini bertaraf edememesinden, sporun dışına çıkartılan DNA materyalinin zarar görmesinden ya da spor içindeki DNA materyalini sporun dışına çıkartmada yeterince etkili olmadığından kaynaklandığı düşünüldü.

Ticari kitle DNA izolasyonu yönteminde, kitin kullanım kılavuzunda bakteriler için 10µm Tris-HCl talimatı olmasına rağmen, bu aşamada Lizozim kullanımı ile daha iyi ve stabil sonuçlar alındı.

Benzeri bir çalışmada araştırmacılar (Bakonyi et al 2003), moleküler çalışmalar için DNA izolasyonunda;

a-Kimyasallar ile konvansiyonel izolasyon,

b-Dondurup çözme yöntemi ile izolasyon ve

c-Lizozim ve Proteinaz K kullanımını da içeren ticari bir kit ile izolasyon olmak üzere üç farklı yöntem ile bakteri kültürü, kontamine bal, polen, balmumu ve larvalı petek materyallerinden DNA izolasyonu gerçekleştirmişler, en iyi sonucu Lizozim ve Proteinaz K kullanımını da içeren ticari kitle aldıklarını

belirtmişlerdir. Araştırmacılarla benzer olarak, çalışmamızda da DNA izolasyonunda Lizozim ve Proteinaz K kullanımını da içeren ticari bir kit ile DNA izolasyonunun en iyi sonuçları verdiği gözlemlendi. Diğer DNA izolasyonu metotlarından, DNA'yı spor dışına çıkaramama veya DNA'ya hasar verme gibi nedenlerle stabil sonuçlar alınamadığı değerlendirildi.

5.3. Konvansiyonel PCR Çalışmaları

Konvansiyonel PCR uygulamaları için OIE tarafından refere edilen, 1106 bp'lık bir 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonunu hedefleyen primer çifti ile en uygun ve başarılı sonuçlar alındı.

Yöntemin optimize edilmesinin ardından yapılan konvansiyonel PCR çalışmalarında, kültür yöntemi ile AYÇ yönünden pozitif olarak değerlendirilen 31, 32, 34, 35, 48, 69, 70, 78, 84 ve 85 numaralı örneklerin hepsinde pozitif sonuç saptandı. Bu örneklerin yanı sıra, kültür yöntemi ile AYÇ yönünden negatif olarak değerlendirilen 8, 20, 27, 49, 80 ve 86 numaralı örneklerde de pozitiflik saptandı. Özellikle 20 ve 49 numaralı örneklerin muayenelerinde klinik olarak AYÇ yönünden pozitif olarak değerlendirilmesine rağmen kültür yöntemi ile negatif, konvansiyonel PCR yöntemi ile pozitif olarak sonuç vermesi dikkate değer bulundu. Bu bulguların, muhtemelen arıcılar tarafından ampirik olarak, yasak olmasına rağmen örnekleme esnasında gözlemlenen antibiyotik kullanımına bağlı olarak şekillendiği değerlendirildi.

Materyal ve metot kısmında da belirtildiği üzere daha önce kullanılan 16S rRNA ve metalloproteinase gen bölgesi hedefli diğer primerler ile, klasik yöntemle pozitif bulunan 48, 70 ve 84 numaralı örneklerde pozitif sonuç alınamazken kullanılan son primerler ile pozitif sonuç alınabildi. Benzeri çalışmalarda durumu açıklayabilecek muhtemel nedenler konusunda herhangi bir bilgiye ulaşılamadı. Olası nedenlerin, yetersiz primer spesifitesi veya örneklerdeki belirlenemeyen bir PCR inhibitörü olabileceği tahmin edildi.

Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada araştırmacılar; (Kılıç et al 2010) kültür ve konvansiyonel PCR yöntemleri ile çalışmıştır. Araştırmacıların çalışmalarında materyal ve metotlarında belirttikleri 237 bp'lık bir gen bölgesinin

amplifikasyonunu hedefleyen primer çifti ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlara ulaşılamadı. Elde edilen farklı sonuçlarda, çalışma kurgusu ve örneklemede, çalışmamızda saha materyaliyle, diğer çalışmada ise elde edilen kültür izolatlarının kullanımının ön görülmesinin rol oynadığı düşünüldü. Geçmiş çalışmada araştırmacıların, petek materyalinin tamamından değil, sadece hastalıktan şüpheli larvadan örnekleme yaparak çalıştıkları gözlemlendi. Çalışmamızda şüpheli petek örneğinin tamamından yapılan örnekleme ile sonuçların farklı olduğu değerlendirildi.

Çalışmamızda, konvansiyonel PCR çalışmalarının optimizasyonu aşamasında, diğer araştırmacıların (Bakonyi et al 2003) verileri ile benzer şekilde metalloproteinase gen bölgesi temel alınarak gerçekleştirilen PCR çalışmalarından başarılı ve verimli sonuçlar alınamadı. Muhtemel neden olarak, yetersiz primer spesifitesi veya örneklerde belirlenemeyen bir PCR inhibitörü olabileceği düşünüldü.

Moleküler teşhis yöntemleri üzerine çalışmalar başta daha çok kültür yöntemi ile saptanan kolonilerin kesin teşhisi temeline dayanmakta (Alippi et al-2004, Bakonyi et al-2003, D'Alessandro et al-2007, Dobbelaere et al 2001, Govan et al 1999, Lauro et al-2003, Piccini et al 2002) iken, çalışmamız sonucunda elde edilen veriler, uygun bir DNA ekstraksiyon yöntemi ile direkt olarak materyalden de moleküler teşhis yöntemleri ile çalışılabileceği yönünde saptamalarda bulunan araştırmacıların (Kılıç et al 2010, Lauro et al 2003) bulgularıyla uyumlu bulundu.

Konvansiyonel PCR yönteminde kullanılabilecek primer dizilimleri ile ilgili geçmişte yapılmış çok çeşitli yayınlar mevcuttur. Belli başlı bazı çalışmalarda;

Govan ve arkadaşları (Govan et al 1999) ve Abd Al-Fattah ve arkadaşları (Abd Al-Fattah et al 2009) 16S rRNA temelli bir dizayn ile 973 bp'lik bir ampliconu hedefleyen bir primer çifti ile çalışmışlardır. Piccini ve arkadaşları, (Piccini et al 2002) 16S rRNA temelli bir dizayn ile 700 bp'lik bir ampliconu hedefleyen bir primer çifti ile çalışmışlardır. Bakonyi ve arkadaşları, (Bakonyi et al 2003) 16S rRNA ve metalloproteinaz gen bölgeleri temelli, hedefledikleri amplicon büyüklükleri 155, 237, 242, 342, 374, 451, 695, 739 ve 971 bp olan 9 farklı primer çiftiyle çalışmışlardır. Bu çalışmadaki 237 bp'lik ampliconu

hedefleyen primer çifti, Kılıç ve arkadaşlarınca da (Kılıç et al 2010) kullanılmıştır. Dobbeleare ve arkadaşları, (Dobbeleare et al 2003) taksonomide alt tür ayrımı kalktıktan sonra OIE tarafında refere edilen (OIE Terrestrial Manual 2008 ve 2016) 16S rRNA temelli 1106 bp'lik bir amplikonu hedefleyen primer çiftinin kullanımını önermişlerdir. Lauro ve arkadaşları, (Lauro et al 2003) 969bp'lik eksternal, 572 bp'lik internal 16S rRNA temelli amplikonu hedefleyen, taksonomide alt tür ayrımı kalktıktan sonra OIE tarafında refere edilen (OIE Terrestrial Manual 2008 ve 2016) bir touch-down nested PCR önermişlerdir. Alippi ve arkadaşları, (Alippi et al 2004) ERIC PCR ile 550 bp'lik bir amplikonu hedefleyen 5'-ACAAACACTGGACCCGATCTAC-3' ve 5'-CCGCCTTCTTCATATCTCCC-3', diziliminde KAT 1 ve KAT 2 primer çifti ile çalışmışlardır.

Bu çalışmaların geneline bakıldığında, tüm araştırmacıların, laboratuvar tecrübelerine ve altyapılarına uygun, 16S rRNA veya metalloproteinaz genlerini hedefleyen, farklı primerler ile çalıştıkları gözlemlendi. Bu çalışmalardaki veriler ışığında başlanan konvansiyonel PCR çalışmalarımız, ülke olarak, enfektif hayvan hastalıklarında resmi otorite olarak kabul edilen OIE tarafından 2008 yılında taksonomideki son değişiklikler, spesifite ve sensitivite düzeylerine göre revize edilen kılavuzun (OIE Terrestrial Manual 2008) AYÇ teşhisindeki moleküler metotlardan 1106 bp'lik bir amplikonu hedefleyen konvansiyonel PCR ve 969 bp'lik eksternal, 572 bp'lik internal amplikonu hedefleyen nested PCR yöntemlerini refere etmesiyle bu yönde değiştirildi.

Konvansiyonel PCR yöntemi ile yapılan çalışmalarda, spesifitesi kabul görmüş (OIE Terrestrial Manual 2008 ve 2016) 1106 bp'lik bir amplikonu hedefleyen 16S rRNA temelli AFB-F ve AFB-R primer çiftinin, oldukça iyi sonuçlar verdiği belirlendi. Bu primer çifti tasarımının tek eksikliği, Real-Time PCR yöntemi çalışmaları ve prob tasarımı için çok büyük bir amplikonu hedeflemesi, bu nedenle Real-Time PCR yöntemi ile yapılması öngörülen çalışmalarında kullanımının uygun olmaması olarak görüldü.

Çalışma için farklı miktarlarda $MgCl_2$ konsantrasyonları önerilmesine (Alippi et al 2004, Bakonyi et al 2003, D'Alessandro et al 2007, Dobbeleare et al 2001, Govan et al 1999, Iurlina ve Fritz 2005, Lauro et al 2003, Piccini et al 2002) rağmen, çalışmamızda kullandığımız bileşenlerle, bu miktarların karşılaştırmalı

olarak gerçekleştirilen uygulamalarında, en sağlıklı sonuçlar, 3.6 mM konsantrasyonla elde edildi. Bu farklı değerlerin PCR için kullanılan komponentlerin içerikleri ve optimizasyonları ile ilgili olabileceği değerlendirildi.

5.4 Real-Time PCR Çalışmasının Sonuçları

Real-time PCR yönteminin optimizasyon çalışmaları aşamasında, materyal ve metot bölümünde de belirtildiği gibi, konvansiyonel PCR yönteminde başarılı sonuçlar alınan gen bölgesi üzerinde çalışmanın devamı amaçlandı. Bu amaçla reverse primer aynı bırakılıp forward primer değiştirilip, 1106 bp'lik amplikonun 137 bp'lik daha kısa bir bölgesi hedeflendi. Amplikon içine prob entegre edilerek konvansiyonel PCR çalışması ile yakın bir hedef belirlendi.

Tez yayına hazırlandığı tarihte, Real-Time PCR için halen uluslar arası otoritelerce genel kabul görmüş bir metot ve primer-prob tasarımı bulunmadığı saptanmıştır.

Çalışmamızda uygulanan yöntem ve tasarlanan primerler ile prob oldukça iyi sonuçlar verdiği saptandı. Bu yöntemin, şüpheli saha materyallerinden kültür ve izolasyon gerekmeksizin direkt olarak teşhis için kullanıma uygun olduğu değerlendirildi.

Yayınlarına ulaşabildiğimiz araştırmacılardan;

Sang Hoon Han ve arkadaşlarınca (Sang Hoon Han et al 2008) 16S rRNA temelli, 233 bp'lik bir gen bölgesini hedefleyen bir primer çifti ve SYBR green ile işaretli bir prob kullanarak, kültüre edilmiş suşların identifikasyonunda oldukça hızlı ve güvenilir sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacıların yaptıkları çalışmadaki amaçlarından önemli birinin de taşınabilir bir Real-Time PCR ünitesi ile sahada çok hızlı olarak teşhis sonucu almak olduğu gözlemlendi. Araştırmacılar çalışmalarında bu amaca ulaştıklarını bildirdilerse de yöntemin ve kullanılan Real-Time PCR ünitesinin verifikasyonu konusunda uluslararası otoritelerin onayı ile ilgili bir referansa rastlanamadı.

Chagas ve arkadaşları (Chagas et al 2010) ise 16S rDNA temelli bir gen bölgesinden 74 bp'lik bir amplikonu hedefleyen primer çifti ve SYBR green ile işaretli bir prob kullanarak, kültüre edilmiş suşların identifikasyonunda oldukça güvenilir sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. Bu yöntemin de şüpheli saha materyallerinden direkt teşhis için kullanılması ile ilgili veri bulunamadı.

Yöntemin mevcut hali ile laboratuvar teşhisinde, uygun altyapıya sahip laboratuvarlarda, fenotipik identifikasyona alternatif hızlı bir identifikasyon seçeneği olabileceği değerlendirildi.

5.5 Tespit Limiti Çalışmalarının Sonuçları

Yaptığımız çalışmalar sonucunda; Konvansiyonel PCR yöntemi için tespit limiti 20 bakteri/örnek olarak belirlendi. (BKZ Şekil 4.8) Elde ettiğimiz sonuçlar, Govan ve arkadaşlarınca yapılan çalışmadaki (Govan et al 1999) 50 cfu/ml ve Piccini ve arkadaşlarınca yapılan çalışmadaki (Govan et al 2002) 32 cfu/ml tespit limitlerinden düşük, Bakonyi ve arkadaşlarınca (Bakonyi et al 2003) yapılan çalışmadaki 3.2-33.8 cfu/örnek tespit limiti ile benzer bulundu.

Real-Time PCR çalışmalarımız sonucunda saptadığımız 10 bakteriyel DNA/örnek tespit limiti sonuçları ise Sang-Hoon Han ve arkadaşlarınca yapılan çalışmadaki (Sang-Hoon Han et al 2008) 11.3 bakteriyel DNA/örnek verisi ile benzer, Martinez ve arkadaşlarınca yapılan çalışmadaki (Martinez et al 2010) 2 bakteriyel DNA/örnek verisinden yüksek bulundu. Bu farklılığın kullanılan primerlerin spesifitesinden veya Real-Time PCR yönteminde kullanılan protokol ve komponentlerinden kaynaklanmış olabileceği değerlendirildi.

5.6 Yöntemlerin Genel Değerlendirilmesi

Çalışma ulaşılabilen yayınlar içinde, konvansiyonel kültür yöntemi, konvansiyonel PCR yöntemi ve Real-Time PCR yöntemlerinin kültüre edilmiş koloniler yerine direkt olarak saha örneklerinden çalışıldığı ilk 3'lü metod karşılaştırma çalışması olma özelliğini taşımaktadır. Tez yayına hazırlandığı zaman itibarıyla benzeri bir çalışmaya ulaşamadı.

Çalışmamıza benzer bir kapsama, Bakonyi ve arkadaşlarının çalışmasında rastlandı (Bakonyi et al 2003). Araştırmacılar, kontamine ballarda izolasyon, biyokimyasal karakterizasyon ve konvansiyonel PCR yöntemleri ile çalışmışlardır.

Çalışma kurgularını kültüre ettikleri suşlar üzerinden yürütmeleri, biyokimyasal tiplendirmeyi BioLog sistem ile yapmaları, çalışmamızla önemli farklar arz etmektedir.

Çalışma başında belirlenen, “Aynı örnekler üzerinde uygulayarak, teşhis metotları arasındaki duyarlılık, özgüllük, hız, güvenilirlik, maliyet gibi kriterleri” ortaya koyma hedefine ulaşıldı.

5.7 Teşhis Süreleri ve Maliyet Analizi

Yöntem	Besi Yeri	DNA İzolasyonu	Diğer Sarflar	Toplam	Süre
Kültür	12 TL	-	1 TL	13 TL	8 gün
Konv. PCR	-	10 TL	5 TL	15 TL	6 saat
Real-Time	-	10 TL	15 TL	25 TL	3 saat

Tablo 5.2 Yöntemler ve Maliyetleri (TL)

5.8 Yöntemlerin Birlikte Değerlendirilmesi

Her üç yöntemin de bir arada değerlendirilmesi sonucu, her birinin kendine has artıları ve eksileri olduğu gözlemlendi.

Kültür yöntemi, diğer yöntemlere göre daha az maliyetli ve etkenin enfektif gücünü ortaya koyması yönünden üstün bulundu. Kültür yönteminin en önemli dezavantajları ise, teşhisin uzun sürmesi ve bilinçsiz olarak antibiyotik kullanılmış örneklerde yanlış sonuç vermesi olarak saptandı.

Konvansiyonel PCR yöntemi, maliyet olarak kültür yönteminden daha yüksek, Real-Time PCR yönteminden ise daha düşük maliyetli olarak değerlendirildi. Yöntemde maliyeti arttıran en önemli unsur, saha materyalinden yapılan örneklemede güvenilir sonuç almak için yüksek maliyetli ticari DNA ekstraksiyon kitlerinin kullanımının gerekliliği olarak saptandı. Uluslararası otoritelerce kabul edilmiş sonuçları, kalite yönetimi ve akreditasyonda da sorunsuzca kullanılabilecek düzeyde değerlendirildi. Yöntem, örneğin laboratuvara gelmesinden 6 saat sonra sonuçlandırılabilmesi, dolayısıyla örneğin laboratuvara geldiği gün veya ertesi gün sonucun raporlanabilmesine imkan tanıdığından, teşhis süresi olarak da başarılı bulundu.

Real-Time PCR yönteminin, çalıştığımız yöntemler içinde en yüksek maliyete sahip olduğu belirlendi. Kullanılan sarfların, probun ve enzimin maliyeti arttıran en önemli unsurlar olduğu saptandı. Yöntem, uygulanan metotlar arasında en hızlı ve hassas yöntem olarak öne çıktı. Real-Time PCR yöntemi ile örnek laboratuvara geldiği gün sonucun raporlanmasının mümkün olabileceği saptandı. Yöntem, yüksek maliyetine rağmen, altyapısı uygun laboratuvarlarda, oldukça düşük tespit limiti ve hızı nedeniyle tercih edilebilecek bir teşhis metodu olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada kullanılan moleküler yöntemler ile sayıca çok daha fazla örnekle, hızlı ve ekonomik olarak etkenin taraması gerçekleştirilebilmesi, bu sayede etken ile mücadelede ve etkenin yaygınlığının araştırılmasına yönelik çalışmalarda önemli kazanımlar sağlanabilmesi mümkün görüldü.

Yürürlükteki mevzuata göre AYÇ, ihbarı mecburi, tespiti halinde saptandığı kolonilerin imhası gereken bir hastalıktır. Bu mücadele esasları tamamıyla kültür yöntemi ile etkenin teşhisi esasına dayanmaktadır. Çalışmamız bulguları ve temel moleküler teşhis bilgilerine göre bu yaklaşım, doğru bir yaklaşım olarak değerlendirildi. Zira moleküler yöntemlerle tespit edilen etkenin ölü veya canlı olup olmadığı belirsizdir. Özellikle sterilizasyon işlemi uygulanmış temel petek kullanılan kolonilerde, örnekleme bu peteği de içeren kısımdan yapıldıysa, moleküler yöntemlerle tespit edilen etkene göre yönetmelik hükümlerinin uygulanmasının oldukça hatalı bir yaklaşım olacağı değerlendirildi. Buna karşın moleküler yöntemler, hız ve hassaslık üstünlükleriyle etkenin yaygınlığının araştırılmasında oldukça etkin olarak kullanılma potansiyeline sahip görüldü.

Moleküler yöntemler, hastalığın teşhisinde hızlı sonuç verebilmek için oldukça kullanışlı bulundu. Gelen örneklerin, moleküler yöntemlerle incelenmesinin ardından, sonuç menfi ise kolaylıkla menfi olarak değerlendirilebileceği, moleküler yöntemlerle müspet bulunan örneklerde ise ikinci aşama olarak konvansiyonel kültür yöntemi uygulanıp, etkenin ölü veya canlı olup olmadığının araştırılması gerektiği saptandı.

Muayenesi istenen materyalin çeşidine göre de sonuçların farklı yorumlanması zorunluluğu saptandı. Hastalığın klinik belirtilerini gösteren larva

ve larvalı petek örneklerinde moleküler yöntemlerle saptanan pozitifliğin, pozitif olarak kabul edilebileceği değerlendirildi, zira örnek toplama çalışmalarımız sırasında yapılan tespitler ve görüşmelerden anlaşıldığı üzere, arıcılarca bilinçsizce antibiyotik kullanıldığı ve kullanılan antibiyotiğin etkenin kültür yöntemi ile muayenesinde sağlıklı sonuç almayı engellediği gözlemlendi. Bu saptamalarımız, yasal prosedür içinde karmaşaya yol açabilecek değerlendirmelere sebep olabilir, zira ülkemizde AYÇ hastalığı tedavisinde ve arıcılıkta yasal olarak antibiyotik kullanımı men edilmiştir. Mevcut durumda, arı yetiştiricilerinin ampirik olarak antibiyotik kullanmaları ve bu kullanımın teşhis sürecine etkileri konusunda bir veri ya da talimat bulunmadığı gözlemlendi.

Muayenesi istenen örnek, ruhsatlı işletmelerden alınan temel petek örneği ise, moleküler yöntemlerle saptanan pozitif sonucun, balmumunun temin edildiği kaynaktan gelebileceği, muhtemelen yapılan sterilizasyon sonrası saptanan etkenin enfektif gücü olmayabileceğinden mutlaka kültür yöntemi ile doğrulanması gerekliliği saptandı.

Piyasada ticari olarak satılan süzme bal ve polen ile tarama çalışması yapmak mevzuat açısından oldukça sıkıntılı olarak değerlendirildi. Pozitiflik saptandığında bakanlığımız taşra teşkilatınca hastalık çıkışının yapılması, bal ve polenin kaynağının belirlenmesi, kordon-karantina ve imha prosedürlerinin doğru bir şekilde uygulanmasının çok zor olduğu gözlemlendi. Bu teknik nedenlerden dolayı çalışma planlanırken süzme bal ile çalışma planları, örnekleme yaptığımız arılıklardan temin edilen kaynağı belli petek bal ile değiştirilmek durumunda kalındı.

6. ÖNERİLER

Kültür yöntemi ile etkenin tespitinde tek engel olarak görülen antibiyotik kalıntısı handikabının belirlenebilmesi için, klinik olarak hastalık belirtilerini gösteren, moleküler yöntemlerle pozitiflik saptanan ancak kültür yöntemi ile etkenin tespit edilemediği örneklerde, kullanılması muhtemel antibiyotik kalıntılarına yönelik daha az sayıda örnekle de olsa bir çalışmanın yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Ruhsatlı olarak temel petek üretimi yapan işletmelerden yapılacak örnekleme, aynı zamanda sektör için bir gösterge kabul edilebilir. Bu işletmelerin farklı kaynaklardan alıp, işleyerek piyasaya sunduğu temel peteklerden konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle yapılacak bir tarama çalışmasının hastalığın yaygınlığının tespiti için de kullanışlı bir veri olacağı gözlemlendi.

Yasal mevzuat gereğince, AYÇ hastalığı için, hangi kovandan elde edildiği kesin olarak saptanamayan bal ve polenlerden tarama çalışması yapılması sıkıntılıdır. AYÇ hastalığı yönünden müspet bulunan örneklerin mihrakında mücadele talimatı gereği alınması gereken tedbirler ve yapılması gereken işlemler yapılamayacaktır. Bu konuda yapılabilecek herhangi bir yasal düzenleme önerisi bulunmamaktadır. İleriki dönemlerde, yasal mevzuatta yapılabilecek değişikliklerle süzme bal ve polen örneklerinden yapılacak bir tarama çalışmasının hastalığın yaygınlığı ile ilgili oldukça faydalı veriler sağlayacağı düşünülmektedir.

Konvansiyonel PCR çalışmaları için kullandığımız, OIE tarafından da refere edilmiş olan yöntemin, kullanıldığı şekliyle oldukça sağlıklı sonuçlar verdiği saptandı. Mevcut taksonomi ve akreditasyonlar düşünüldüğünde, sonuçların güvenilirliği yönünden metot önerilir.

Konvansiyonel PCR yöntemi özellikle kültüre edilmiş suştan değil de, saha materyalinden çalışılacaksa, yöntemin verimliliği açısından, DNA izolasyonu için, Lizozim ve Proteinaz K kullanımını da içeren ticari bir kit kullanımı önerilir.

Real-Time PCR yöntemi için hali hazırda resmi otoritelerce valide edilmiş bir metot bulunmamaktadır. Bu çalışmada kullandığımız metot, iyi bir DNA

izolasyonu ardından oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Bu konuda çalışacak araştırmacıların kullandığımız metodu dikkate almaları önerilir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abd Al-Fattah M. A., El-Awady M. Ibrahim G. M. and Barakat O. S.,** 2010, Microbiological and molecular diagnosis of American foulbrood in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies *Arab J. Biotech.*, Vol. 13, No. (1) January: 1-12.
- Adjlane N., Haddad N. and Kechih S.,** 2014, Comparative Study Between Techniques for the Diagnosis of American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in Honeybee Colony; *Journal of Animal and Veterinary Advances* 13 (16): 970-973
- Akmaz, Ö.,** 2001, Adana yöresinde amerikan yavru çürüklüğü hastalığının yaygınlığı. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 32 (1-2): 55-60.
- Alippi A.M., Lopez A.C. and Aguilar O.M.,** 2002, Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the Cause of American Foulbrood of Honeybees, by Using PCR and Restriction Fragment Analysis of Genes Encoding 16S rRNA: *Applied and Environmental Microbiology*, July P. 3655–3660
- Alippi A.M., Lopez A.C. and Aguilar O.M.,** 2004, A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 25–33
- Alippi A. M., Albo G. N., Reynaldi F. J., De Giust M. R.,** 2005, In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin, *Veterinary Microbiology* 109 47–55
- Alippi A. M., Reynaldi F. J.,** 2006, Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources *Journal of Invertebrate Pathology* 91 141–146

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Alippi A. M., Lopez A. C., Reynaldi F. J., Grasso D. H., Aguilar M. O.,** 2007, Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees *Veterinary Microbiology* 125 290–303
- Anon.,** 2001, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, GKGM, Bal Arılarının Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığına Karşı Korunma Ve Mücadele Yönetmeliği. *R.Gazete*: 21.12.2011-28149.
- Antunez K. D'Alessandro B., Piccini C., Corbella E. and Zunino P.,** 2004, *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: A nationwide survey. *Journal of Invertebrate Pathology* 86 56–58
- Antunez K., Piccini C. , Castro-Sowinski S., Rosado A.S., Seldin L., Zunino P.,** 2007, Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates, *Veterinary Microbiology* 124 178–183
- Antunez K., Harriet J., Gende L., Maggi M., Eguaras M., Zunino P.,** 2008, Efficiency of natural propolis extract in the control of American Foulbrood, *Veterinary Microbiology* 131 324–331
- Antunez K., Anido M., Arredondo D., Evans J. D., Zunino P.,** 2011a, *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection, *Veterinary Microbiology* 147 83–89
- Antunez K., Arredondo D., Anido M. and Zunino P.,** 2011b, Metalloprotease production by *Paenibacillus larvae* during the infection of honeybee larvae, *Microbiology* 157, 1474-1480
- Arbia A., Babbay B.,** 2011, Management Strategies of Honey Bee Diseases, *Journal of Entomology* 8 (1): 1-15
- Arda M.,** 2000, Temel Mikrobiyoloji
- Ash C., Priest F.G., Collins M.D.,** 1994, Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test, *Antonie van Leeuwenhoek* Volume 64, Issue 3-4 253-260. p

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aydın, N., Bülbül, H., Bıyıkoglu, G., Yaralı, C., Yavuz, M.K., 1999, Kovanlardan ve tüketime sunulan bal örneklerinden *Paenibacillus larvae*'nin izolasyonu, *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 10; 1, 93-100.
- Bakonyi T., Derakhshifar I., Grabensteiner E., and Nowotny N., 2003, Development and Evaluation of PCR Assays for the Detection of *Paenibacillus larvae* in Honey Samples: Comparison with Isolation and Biochemical Characterization, *Applied and Environmental Microbiology*, Mar., p. 1504–151
- Bastos E. M. A.F., Simone M., Jorge D. M., Soares A. E. E., Spivak M., 2008, In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*, *Journal of Invertebrate Pathology* 97 273–281
- Behrens D., Forsgren E., Fries I. And Moritz R. F. A., 2010, Lethal infection thresholds of *Paenibacillus larvae* for honeybee drone and worker larvae (*Apis mellifera*), *Environmental Microbiology* 12(10), 2838–2845
- Beims H., Wittmann J., Bunk B., Spröer C., Rohde C., Günther G., Rohde M., von der Ohe W., Steinert M., 2015, Characterization of *Paenibacillus larvae* directed bacteriophage HB10c2 and evaluation of its application in honey bee larvae suffering from American Foulbrood, *Appl. Environ. Microbiol.* June 10.1128/AEM.00804-15
- Bilikova K., Popova M., Trusheva B. and Bankova V., 2013, New anti-*Paenibacillus larvae* substances purified from propolis, *Apidologie, Volume 44, Issue 3, 278-285 p*
- Boligon A. A., de Brum T.F., Zadra M., Piana M., Alvez C.F., Fausto F.P., Barboza V.S., Vaucher R.A., Santos R.C.V., Athayde M.L., 2013, Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*, *Journal of Invertebrate Pathology* 112 105–107
- Borum, E., Ülgen, M., Aydın, L., Özakin, C., 2010, Bursa'da Bal Arılarında Görülen Yavru Çürüklüğü Hastalıklarının İncelenmesi. IV. Uluslararası Katılımlı Marmara Arıcılık Kongresi 2-4 Aralık 2010.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chan Q., Comman R.S., Birol I., Liao N.Y., Chan S.K., Docking T.R., Jackman S.D., Taylor G.A., Jones S., de Graaf D., Evans J.D., Foster L.J.,** 2011, Updated genome assembly and annotation of *Paenibacillus larvae*, the agent of American foulbrood disease of honey bees, *BMC Genomics*, 12:450
- Chagas S. S., Vaucher R. A. and Brandelli A.,** 2010, Detection of *Paenibacillus larvae* by Real-Time PCR, *Acta Scientiae Veterinariae*. 38(3): 251-256,
- Chow V. Nong G., John F.J., Rice J.D., Dickstein E., Chertkov O., Bruce D., Detter C., Brettin T., Han J., Woyke T., Pitluck S., Nolan M., Pati A., Martin J., Copeland A., Land M.L., Goodwin L., Jones J.B., Ingram L.O., Shanmugam K.T., Preston J.F.,** 2012, Complete genome sequence of *Paenibacillus* sp. strain JDR-2, *Standards in Genomic Sciences* 6:1-10
- Cecottia R., CarpanaE., Falchero L., Paoletti R., and Tava A.,** 2012, Determination of the Volatile Fraction of *Polygonum bistorta* L. at Different Growing Stages and Evaluation of Its Antimicrobial Activity against Two Major Honeybee (*Apis mellifera*) Pathogens, *Chemistry & Biodiversity*–Vol.9
- Çakmak İ., Aydın L., Güleğen A.E.,** 2003, Güney Marmara bölgesinde balarısı zararlı ve hastalıkları, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 3, 33-35. p
- D'Alessandro B., Antunez K., Piccini C., Zunino P.,** 2007, DNA extraction and PCR detection of *Paenibacillus larvae* spores from naturally contaminated honey and bees using spore-decoating and freeze-thawing techniques, *World Journal of Microbiological Biotechnology* 23:593–597
- de Graaf D.C., Vandekerchove D., Dobbelaere W., Peeters J.E. & Jacobs F.J.,** 2001, Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie*, 32, 587–599.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- de Graaf D.C., Alippi A.M., Brown M., Evans J.D., Feldlaufer M., Gregorc A., Hornitzky M. Pernal S.F., Schuch D.M.T., Titera D., Tomkies V. and Ritter W.,** 2006a, Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols, *Letters in Applied Microbiology* 43 583–590
- de Graaf D. C. De Vos P. Heyndrickx, M. Van Drakken S. Peiren N. Jakobs F.J.,** 2006b, Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: An obstacle for AFB diagnosis, *Journal of Invertebrate Pathology* 91 115–123
- De Guzman Z. M. Cervancia C.R., Dimasuay K.G.B., Tolentino M.M., Abrera G.B., Cobar M.L.C., Fajardo A.C., Sabino N.G., Manila-Fajardo A.C., Feliciano C.P.,** 2011, Radiation inactivation of *Paenibacillus larvae* and sterilization of American Foul Brood (AFB) infected hives using Co-60 gamma rays *Applied Radiation and Isotopes* 69 1374–1379
- Dingman D. W.,** 2012, *Paenibacillus larvae* 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions: DNA fingerprinting and characterization, *Journal of Invertebrate Pathology* 110 352–358
- Djukic M., Brzuszkiewicz E., Fünfhaus A., Voss J., Gollnow K., Poppinga L., Liesegang H., Gonzalez E. G., Genersch E., Daniel R.,** 2014, How to Kill the Honey Bee Larva: Genomic Potential and Virulence Mechanisms of *Paenibacillus larvae* *PLOS ONE March Volume 9 Issue 3 e90914*
- Dobbelaere W., de Graaf D.C., Reybroeck W., Desmedt E., Peeters J.E. and Jacobs F.J.,** 2001a, Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 212-216
- Dobbelaere W., De Graaf D. C., Peeters J. E. Jacobs F. J.,** 2001b, Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR, *Apidologie* 32 363–370

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Evans J. D.**, 2004, Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, *Journal of Invertebrate Pathology* 85 105–111
- Evans J.D.**, 2006, Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease, *Journal of Invertebrate Pathology* 93 135–139
- Evans J. D. and Schwarz R. S.** (2011) Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health Trends in Microbiology December, Vol. 19, No. 12 p: 617-620
- Fernández N. J., Gende L. B. and Eguaras M. J.**, 2010, Advances in *Paenibacillus larvae* and American foulbrood monitoring in honey bee colonies from Argentinean apiaries, *Journal of Apicultural Research* 49(3): 287-289
- Flesar J., Havlik J., Kloucek P., Rada V., Titera D., Bednar M., Stropnický M., Kokoska L.**, 2010, In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees, *Veterinary Microbiology* 145 129–133
- Forsgren, E., Stevanovic, J., Fries, I.**, 2007, Variability in Germination and in Temperature and Storage Resistance Among *Paenibacillus larvae* Genotypes, *Veterinary Microbiology* 3918 1-8p
- Forsgren E., Stevanovic J., Fries I.**, 2008, Resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes Variability in germination and in temperature and storage. *Veterinary Microbiology* 129 342–349
- Forsgren E., Olofsson T. C., Vásquez A. and Fries I.**, 2010, Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae, *Apidologie* Volume 41, Number 1
- Fries I., Lindströma A., Korpela S.**, 2006, Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*), *Veterinary Microbiology* 114 269–274

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Garrido-Bailón E., Higes M., Martínez-Salvador A., Antúnez K., Botías C., Meana A., Prieto L. and Martín-Hernández R.,** 2013, The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay, *Microbial Biotechnology*
- Genersch E., Ashiralieva A. and Fries I.,** 2005, Strain- and Genotype-Specific Differences in Virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a Bacterial Pathogen Causing American Foulbrood Disease in Honeybees, *Applied and Environmental Microbiology*, Nov., p. 7551–7555
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Jochen Kilwinski J., and Fries, I.,** 2006, Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 501–511p
- Genersch E.,** 2010, American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*, *Journal of Invertebrate Pathology* 103 S10–S19
- Gillard M., Charriere J.D., Belloy L.,** 2008, Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis, *Journal of Invertebrate Pathology* 99 92–95
- Gochnauer T.A. and Corner J.,** 1987, Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *Journal of Apiculture Research*, 13, 264–267.
- Gonzalez E. G., Poppinga L., Fünfhaus A., Hertlein G., Hedtke K., Jakubowska A., Genersch E.,** 2014a, *Paenibacillus larvae* Chitin-Degrading Protein PlCBP49 Is a Key Virulence Factor in American Foulbrood of Honey Bees, *PLOS Pathogens* July Volume 10 Issue 7 e1004284

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gonzalez E. G., Müller S., Hertlein G., Heid N., Süssmuth R. D. & Genersch E.,** 2014b, Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*, *Microbiology Open*; 3(5): 642–656
- Gordon, R. E., W. C. Haynes, and C. H. Pang.,** 1973, The genus *Bacillus*. Agricultural Handbook no. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington, D. C.
- Govan V. A., Allsopp M. H., Davison S.,** 1999, A PCR Detection Method for Rapid Identification of *Paenibacillus larvae*, *Applied and Environmental Microbiology*, May, p. 2243-2245, Vol. 65, No. 5
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, A., Ali N., and Berkeley, R.C. W.,** 1996, Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of *P. larvae*, with Emended Descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, *International Journal Of Systematic Bacteriology* (Jan) 270-279 p
- Hornitzky M.A.Z. & Nicholls P.J.** 1993, J-medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples, *Journal of Apiculture Ressearch*, 32 (1), 51-52.
- Iurlina M.O., Fritz R.,** 2005, Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources, *International Journal of Food Microbiology* 105 297– 304
- Jaouani, M.S. Abbassi, V. Alessandria, J. Bouraoui, R. Ben Salem, H. Kilani, R. Mansouri, L. Messadi and Cocolin L.,** 2014, High inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Listeriamonocytogenes* by *Enterococcus* isolated from different sources in Tunisia and identification of their bacteriocin genes *Letters in Applied Microbiology* 59, 17-25

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaftanoğlu, O., Kumova, H., Özkök, D.,** 1995, Türkiye’de balarısı hastalıklarının dağılımı, koloniler üzerindeki etkileri ve entegre kontrol yöntemlerinin uygulanması. TÜBİTAK, VHAG.
- Kılıç A., Şimşek H., Kalender H.,** 2010, Detection of American Foulbrood Disease (*Paenibacillus larvae*) By the PCR and Culture, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (5): 841-845
- Kilwinski J., Peters M., Ashiralieva A., Genersch E.,** 2004, Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae subsp. larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study, *Veterinary Microbiology* 104 31–42
- Kwakman P. H. S. and Zaat S. A. J.,** 2012, Antibacterial Components of Honey *IUBMB Life*, 64(1): 48–55, January
- Lauro F. M., Favaretto M., Covolo L., Rassu M., Bertoloni G.,** 2003, Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol, *International Journal of Food Microbiology* 81 195–201
- Lindström A., Korpela S., Fries I.,** 2008, The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *Journal of Invertebrate Pathology* 99 82–86
- Martínez J, Simon V, Gonzalez B, Conget P.,** 2010, A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood, *Letters in Applied Microbiology*, Jun 1;50(6):603-10. Epub 2010 Mar 19.
- Murray K.D., Aronstein K.A., de Leo’n J.H.,** 2007, Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, *Plasmid* 89–100

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Murray K. D., Aronstein K.A.,** 2008, Transformation of the Gram-positive honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, by electroporation, *Journal of Microbiological Methods* 75 325–328
- Nakamura L. K.,** 1984, *Bacillus pulvifaciens* s p . nov., norn. rev. *International Journal Of Systematic Bacteriologoy* Oct,. p. 410-413
- Neuendorf S., Hedtke K., Tangen G. and Genersch E.,** 2004, Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae subsp. larvae*, a honey bee bacterial pathogen, *Microbiology* 150, 2381–2390
- Nguyen T.M., Lee H. and Kim J.,** 2013, Selective Isolation of Actinobacteria Showing Antibacterial Activity Against *Paenibacillus larvae* from Soil Samples Collected in South Korea, *Journal of Apiculture* 28(4) 265-272
- OIE Terrestrial Manual** (2008,2016) CHAPTER 2.2.2.
- Oliveira A., Leite M., Kluskens L. D., Santos S. B., Melo L. D. R., Azeredo J.,** 2015, The First *Paenibacillus larvae* Bacteriophage Endolysin (PlyPl23) with High Potential to Control American Foulbrood *PLOS ONE* DOI:10.1371 July 13,
- Olsen P.E., Grant G.A., Nelson D.L. & Rice W.A.,** 1990, Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Microbiol.*, 36, 732–735.
- Otte E.,** 1973, Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie*, 4 (4), 331–339.
- Parvanov P., Russenova N., Dimov D.,** 2006, Control Of American Foulbrood Disease Without Antibiotic Use, *Uludag Bee Journal* p:97-103

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Peters M., Kilwinski J., Beringhoff A., Reckling D. and Genersch E., 2006,** American foulbrood of the honey bee: Occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia) *Journal of Veterinary Medicine*, B 53, 100–104
- Piccini C., D'Alessandro B., Antunez K., Zunino P., 2002,** Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 761–765
- Poppinga L., Janesch B., Fünfhaus A., Sekot G., Garcia-Gonzalez E., Hertlein G., Hedtke K., Schaffer C., Genersch E., 2012,** Identification and Functional Analysis of the S-Layer Protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the Causative Agent of American Foulbrood of Honey Bees PLoS Pathogens 1 May Volume 8 Issue 5
- Poppinga L. and Genersch E., 2015,** Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae, *Current Opinion in Insect Science*, 10: 29–36
- Qin X., Evans J.D., Aronstein K.A., Murray K.D. and Weinstock G.M., 2006,** Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, *Insect Molecular Biology* 15(5), 715–718
- Ramakrishnan S. and Sulochana K.N., 2012,** Manual of Medical Laboratory Techniques
- Reynaldi F.J., Albo G.N., Alippi A.M., 2007,** Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease of honeybees *Veterinary Microbiology* 4030
- Ritter W., 2003,** Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta*, 38, 125–130

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rusenova N., Parvanov P., Stanilova S.,** 2013, Molecular Typing of *Paenibacillus larvae* Strains Isolated from Bulgarian Apiaries Based on Repetitive Element Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR), *Current Microbiology* 66:573–577
- Rusenova N. and Parvanov P.,** 2014, Biochemical Profile of *Paenibacillus larvae* Repetitive Element Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) Genotypes in Bulgaria, *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (2): 313-316,
- Ryba S., Titera D., Haklova M., Stopka P.,** 2009, A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris, *Veterinary Microbiology* 139 193–196
- Sang-Hoon Han, Do-Bu Lee, Dong-Woo Lee, Eul-Hwan Kim, Byoung-Su Yoon,** 2008, Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB), *Journal of Invertebrate Pathology* 99 8–13
- Santos R. C. V., Alves C. F. dos Santos, Schneider T., Lopes L. Q. S., Aurich C., Vaucher J. L. G., Brandelli A., de Almeida R.,** 2012, Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species, *Journal of Invertebrate Pathology* 109 265–268
- Schäfer M. O., Ritter W., Pettis J. and Neumann P.,** 2010, Small hive beetles, *Aethina tumida*, are vectors of *Paenibacillus larvae*, *Apidologie* Volume 41, Number 1, January-February 14 – 20
- Schafer M. O., Genersch E., Fünfhaus A., Poppinga L., Formella N., Bettin B., Karger A.,** 2014, Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry, *Veterinary Microbiology* 170 291–297

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schild H.A., Fuchs S. W., Bode H. B., Grünewalda B.,** 2014, Low-Molecular-Weight Metabolites Secreted by *Paenibacillus larvae* as Potential Virulence Factors of American Foulbrood, *Applied and Environmental Microbiology* Volume 80 Number 8 p.2484–2492
- Schuch D.M.T., Madden R.H. & Sattler A.,** 2001, An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae subsp. larvae* spores in honey, *Journal of Apiculture Research*, 40 (2), 59–64.
- Shımanukı H. & Knox D.A.,** 1988, Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *American Bee Journal*, 128, 353–354
- Sıralı, R., Doğaroğlu, M.,** 2005, Trakya bōlgesi arı hastalıkları ve zararlıları üzerine anket sonuçları, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 5:71-78.
- Şahinler, N., Gül, A.,** 2005, Hatay yöresinde bulunan arıcılık işletmelerinde arı hastalıklarının araştırılması, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 5: 27-31.
- Şimşek, D.,** 2008, Muğla ili bal arılarının (*Apis mellifera* L.) mikrobiyal ve paraziter hastalıklar yönünden incelenmesi. Bilim Uzmanlığı Tezi. Hacettepe Üniversitesi.
- Titera D. and Haklova M.,** 2003, Detection method of *Paenibacillus larvae larvae* from beehive winter debris. *Apiacta*, 38, 131–133.
- White, G.F.,** 1906, The bacteria of the apiary, with spccial reference to bee diseases. Bureau of Entomology Technical Series no. 14. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Williams D. L.,** 2000, (Review) A Veterinary Approach to the European Honey Bee, *The Veterinary Journal* , 160, 61–73p
- Woodrow A.W.,** 1941, Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. *Gleanings Bee Culture*, 69, 148–151.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yalçınkaya, A.**, 2008, Hatay ve Adana Yöresindeki Bal Arılarının (*Apis mellifera*) Mikrobiyal ve Paraziter Hastalıklar Yönünden İncelenmesi, (Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi.
- Yue D., Nordhoff M., Wieler L. H. and Genersch E.**, 2008, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*), *Environmental Microbiology*, 10(6), 1612–1620
- Zeybek, H.**, 1991, Arı Hastalıkları ve Zararlıları. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Hayvan Hast. Araşt. Enst. Md., Etlik, Ankara
- IV.Uluslararası Katılımlı Marmara Arıcılık Kongresi Bildiri Özetleri**, 2010, ÇOMÜ Yayınları

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Mehmet Özden		
Doğum Yeri ve Tarihi	Turgutlu / 22.09.1973		
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi / 1996		
Doktora / Uzmanlık	Doktora (Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji)		
İhtisas konuları	Klinik Mikrobiyoloji, Kuduz, Bakteriye l arı hastalıkları		
Yabancı dili	İngilizce		
Görevi	Bakteriyoloji Bölümü / Laboratuvarı Uzmanı		
Tel	232 388 0010 / 191		
Elektronik posta	mehmet.ozden@tarim.gov.tr		
Atandığı Görevler	1997-2000 Kars İl Müdürlüğü, Veteriner Hekim 2000-2002 Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü, Veteriner Hekim 2002-2005 Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü, Canlı Aşı Üretim Laboratuvarı Şefi 2005-Bugüne kadar; Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Bakteriye l oji Bölümü		
Personelin Aldığı Eğitim vb. ile İlgili Bilgiler			
Eğitimin Konusu	Eğitimi Veren Kurum/Kuruluş/Kişi	Eğitimin Tarihi	
Kuruluş İçi Kalite Denetçisi Semineri	Elginkan Vakfı	26-27.08.2005	
Veteriner Bilgi Sistemi	Türk Vet Veteriner Bilgi sistemi	07.12.2006	
Mini API Aplikasyon Eğitimi	Biomerieux	02.02.2006	
Vitek-2 aplikasyon eğitimi	Biomerieux	02.03.2006	
Laboratuar Akreditasyonu ve Önemi Semineri	Uzman Kalite Eğitim Danışmanlık Ltd.Şti	21.04.2006	
Metod Validasyonu	Uzman Kalite Eğitim Danışmanlık Ltd.Şti	05.07.2006	
17025 - Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarları İçin Yeterlilik Şartları	Uzman Kalite Eğitim Danışmanlık Ltd.Şti	04.12.2006	
Mikrobiyolojik Analizlerde Metod Validasyonu ve Belirsizlik	Uzman Kalite Eğitim Danışmanlık Ltd.Şti	06.12.2006	
ISO 17025 Deney ve Kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartlar	EBİLTEM	29-31.05.2006	
Mikrobiyolojik Analizlerde Metot Validasyonu ve Belirsizlik Eğitimi	Uzman Kalite Eğitim Danışmanlık Ltd.Şti	06.12.2006	
Antibiyotik Kullanım Stratejileri ve Kalıntıkları	BVKAE	10-11/09/2007	

Genel Metroloji ve Kalibrasyon Eğitimi	EGE Kalmem	09-10.10.2007
Food Mikrobology Workshop	Biomerieux	18-20/11/2008
Technical Assistance for Control of Rabies Disease	KKGM- TR 503. 06/001	18-20.07.2008
Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Programı	BVKAE	29.06.2009 – 16.07.2009
Akredite laboratuvarlarda kalitenin sağlanması (İç ve Dış kontrol) Eğitimi	BVKAE	10.12.2009
Rose Bengal Testinin Uygulanması ve değerlendirilmesi	Bakteriyoloji Bölümü	18.02.2010, 10-12 ⁰⁰⁻
Laboratuvar Yönetimi	Bakteriyoloji Bölümü	04.05.2010
Arıcılık	Menemen E.T.A.E	24-28.05.2010
Yayınlar	- Eskiizmirliler, S.N, Tunalgil, S., Özden, M., Avsever, L. (2008): Bir Koyun Sürüsünde Tetanoz Olgusu. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi ,Cilt:30, sayı:44, sayfa: 39-42.	
Projeler	Beyazıt, A., Akkoca, N., Eskiizmirliler, S., Albayrak, H., Özcan, E., Özden, M., Selver, M.M., Tunalgil, S. (2012). Ege Bölgesi İllerinde Önemli Arı Hastalıklarının Yaygınlığının Araştırılması (TAGEM / HS / 09 / 12 / 03 / 152) (Yayınlanmadı).	