



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-D-2014-0001

**İZMİR İLİNDE BULUNAN KÜMESLERDE
MYCOPLASMA SYNOVIAE VARLIĞININ MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Gülsüm (DOĞAN) KOYUNCU

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA

AYDIN - 2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-D-2014-0001**

**İZMİR İLİNDE BULUNAN KÜMESLERDE
MYCOPLASMA SYNOVIAE VARLIĞININ MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Gülsüm (DOĞAN) KOYUNCU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN - 2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Vet. Hek. Gülsüm (DOĞAN) KOYUNCU tarafından hazırlanan “İzmir İlinde Bulunan Kümeslerde *Mycoplasma synoviae* Varlığının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı tez, 16/01/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Osman KAYA

Adnan Menderes Üniv.

2- Prof. Dr. K. Serdar DİKER

Ankara Üniv.

3- Prof. Dr. Ergün Ömer GÖKSOY

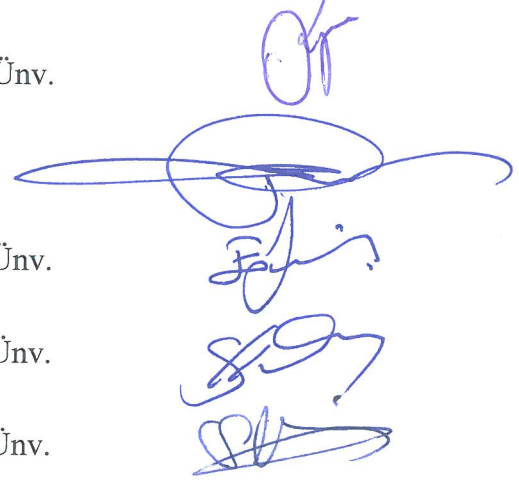
Adnan Menderes Üniv.

4- Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

Adnan Menderes Üniv.

5- Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

Adnan Menderes Üniv.



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Kanatlı hayvanlarda hastalığa neden olan çeşitli mikoplazma etkenleri bulunmaktadır. Bu etkenlerden *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae* en önemli türler olup OIE listesinde yer almaktadır. *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* vertikal bulaşması nedeniyle damızlık sürülerde ayrı bir öneme sahiptir. Tavuk ve hindi yetiştiriciliğinde damızlık stoklarının bu patojenlerden arı olması için ciddi yatırım yapılmaktadır. Damızlık stokların patojenik mikoplazmalardan arı tutulması veya bir sürüden patojenin eradikasyonu için hızlı ve güvenilir diagnostik metotlara gereksinim vardır.

Kanatlı patojen mikoplazmalarının teşhisinde; kültür, seroloji ve moleküler tabanlı testler (Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), deoksiribonükleik asit prob) kullanılmıştır. Serolojik incelemeler hala yaygın şekilde kullanılmaktadır ancak subklinik *M. synoviae* infeksiyonlarının tanısında yeterli değildir. Kültür yöntemi pahalıdır, sonuca ulaşmak uzun zaman alır ve aynı zamanda yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle günümüzde kanatlı patojenik mikoplazmaların teşhisinde rutin olarak PCR temelli testler kullanılmaktadır. VlhA hemaglutinin (HA) geni ve 16S rRNA tabanlı *M. synoviae* PCR metotları mevcuttur.

Bu çalışmada, *M. synoviae*'nın vlhA hemaglutinin geni temelli PCR metodu ile teşhisi hedeflenmiştir.

Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından VTF-12019 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tanım	1
1.2. Etiyoloji	3
1.3. Epizootiyoloji	5
1.4. Semptomlar	7
1.5. Hastalığın Teşhisi	9
1.5.1. Teşhis Teknikleri	9
1.5.2. Moleküler Yöntemlerle Teşhis	12
1.6. İmmunolojik Araştırmalar	15
1.7. Sağaltım	18
1.8. Aşılama	19
1.9. Gen Çalışmaları	22
1.10. Koruma ve Kontrol	26
2. GEREÇ ve YÖNTEM	28
2.1. Gereç	28
2.1.1. İzolasyon Örnekleri	28
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri	29
2.1.2.1. Transport Besiyeri- <i>M. synoviae</i> Broth	29
2.1.2.2. İzolasyon Besiyeri- <i>M. synoviae</i> Agar	29
2.1.3. PCR	29
2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar	29
2.1.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer A, dNTP Mix	30
2.1.3.3. Primerler	30
2.1.4. Elektroforez Cihazı	30

2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı	30
2.1.4.2. Marker	30
2.1.4.3. Etidium Bromür	29
2.1.4.4. Pozitif Kontrol	31
2.1.5. DNA Ekstraksiyon Kiti	31
2.2. Yöntem	31
2.2.1. Örneklerin Alınması	31
2.2.2. <i>Mycoplasma synoviae</i> İzolasyonu	31
2.2.3. DNA İzolasyonu	32
2.2.3.1. PCR	32
2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	33
2.2.3.3. Jelde Yürütme	34
2.2.3.4. Görüntüleme ve Değerlendirme	34
3. BULGULAR	35
3.1. İzolasyon Bulguları	35
3.2. PCR Bulguları	36
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇ	44
ÖZET	46
SUMMARY	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	55
TEŞEKKÜR	56

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Kanatlı Mikoplazmaları ve temel konakçıları	4
Çizelge 2.1.	Örnekleme yapılan kümeslerde üretim şekli, alındığı ilçe, kümes büyüklüğü, yaşı ve alınan örnek sayısı	28
Çizelge 2.2.	Çalışmada kullanılan primerler	30
Çizelge 2.3.	<i>Mycoplasma synoviae</i> . için mastermiks hazırlanma oranları	33
Çizelge 2.4.	PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	33
Çizelge 3.1.	Elde edilen izolasyon pozitif örnek sayısı ve yüzdeleri	35
Çizelge 3.2.	PCR Pozitif Örnek Sayıları ve Yüzdeleri	36

ŞEKİLLER

- Şekil 3.1. *Mycoplasma synoviae* PCR pozitif örneklerin (vlhAF ve vlhAR2 primerleri ile yapılan PCR) elektroforez görüntüsü 37

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devleti
AGP	Agar Jel Presipitasyon
bp	Base pair
CRD	Kronik Solunum Yolu İnfeksiyonu
CO ₂	Karbondioksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E. coli	Escherchia coli
ELİSA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FAT	Floresan Antikor Tekniği
HA	Hemaglutinin
HI	Hemaglutinasyon İnhibisyon
IB	İnfeksiyöz Bronşit
Ig	İmmunglobulin
ILT	İnfeksiyöz Larengotrakeitis
IRS	İntergenik Halka Bölgesi
IU	İnternasyonal Ünite
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
mg	miligram
MI	<i>Mycoplasma imitans</i>
ml	Mililitre
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NAD	Nicotinamide Adenine Dinükleotid
nm	nanometre
OİE	Uluslar arası Salgın Hastalıkları Ofisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR/RFLP	Restriksiyon enzimler aracılığıyla PCR
PPLO	Pleuro pneumonia like organizm
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SPA	Çabuk Serum Aglutinasyon
TA	Tüp Aglutinasyon

1. GİRİŞ

1.1. Tanım

Kanatlı hayvanlarda görülen solunum sistemi infeksiyonlarında önemli ekonomik kayıplar oluşur. Bu hastalık durumlarında hayvanlarda ölüm oranları yanı sıra tedavi masrafları da artmaktadır. Broylerde yüksek ıskarta oranı, damızlık ve yumurtacı sürülerde yumurta veriminde düşme, yumurta kabuk kalitesinde bozulma, kuluçka verimliliğinde azalma görülür. Tavuklarda görülen mikoplazma infeksiyonları, hem ekonomik kayıplar hem de koruma ve kontrol önlemleri açısından zor bir hastalık olarak değerlendirilir.

Bu hastalık 2008 yılında OIE listesine girmiş, ilk kez ABD’de tavuk ve hindilerde bildirilmiş ve daha sonra tüm dünya da yaygın olarak görülmüştür. Hastalığın ekonomik önemi başlangıçta genç piliç ve hindilerde synovial membranların yangılanması ile karakterize eklem lezyonları, topallık ve bunları takip eden büyümede gecikme ile ilişkili bulunmuştur (Akan M ve İzgür M, 2002).

Mikoplazmalar, çok küçük olmaları ve hücre duvarlarının bulunmaması ile diğer bakterilerden ayrılırlar. Bu özellikleri koloni morfolojilerinin sahanda yumurta şeklinde olmasını ve hücre duvarı sentezini etkileyen tüm antibiyotiklere karşı direnç göstermelerini sağlamaktadır. Mycoplasma konak spesifik olmaya eğilimlidir (Bencina ve ark 2006, Ongor ve ark 2008).

Antijenik açıdan değerlendirildiğinde; hemaglutininler, kanatlı mikoplazmalarının virulansı ve kolonizasyonunda etkisi olan çok önemli yüzey proteinleridir (Bencina D. ve ark 2002, Narat M. ve ark 1998). *M. synoviae* haemaglutininleri vlhA genleri olarak bilinen multigen ailesinin bölümleri tarafından kodlanırlar (Noormohammadi ve ark 1997, Bencina ve ark 1999).

VlhA geni *M. synoviae*’ya iki önemli ürün sağlamaktadır. Bunlardan biri N-terminal lipoprotein (MSPB), diğeri ise C-terminal hemaglutinin proteini (MSPA)’dır (Noormohammadi ve ark. 1998). Hem MSPA hem de MSPB yüzey-ekspoze proteinleridir ve yüksek frekans antijenik varyasyon gösterirler, ancak sadece MSPA eritrositlere bağlanmada etkindir (Nooroahammadi ve ark 1997-1998). Birbiri ardına gelen *M. synoviae* suşlarının analizi MSPA’nın MSPB’den antijenik açıdan daha değişken olduğunu

göstermiştir (Bencina ve ark 2002, Noormohammadi ve ark 1997-1998). *M. synoviae* izogenetik olarak üremeleri sırasında hemadsorpsiyon ve/veya hemaglutinasyon aktivitelerini kaybederler, MSPA'nın, poliklonak antiserum veya monoklonal antikolar aracılığıyla tespit edilememesi çok geniş bir antijenik varyasyona sahip olduğunu ispatlar (Bencina ve ark 1999).

M. synoviae vlhA genlerinin antijenik varyasyonunun altında yatan moleküler temel Noormohammedi ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yürütülen bir çalışma ile ispat edilmiştir (Noormohammadi ve ark 2000). Bu önemli pseudogen havuzunun (vlhA- kısmı akraba sekanslar) genom dizilim geçerliliği sebebiyle yüksek frekanslı spesifik rekombinasyon alanına geçiren tek bir suşun kabiliyetinde bulunmaktadır. Tekli tam bir vlhA geni ile komşu bir multipl pseudogen kopyasının rekombinasyonu yeni vlhA gen varyasyonunun oluşmasını sağlamaktadır.

WVU 1853 suşu üç vlhA gen varyantına sahiptir (vlhA1, vlhA4 ve vlhA5) (Noormohammadi ve ark 2000). Bu genler eşit büyüklüktedir ve vlhA bölümünün orta noktasına denk gelen 400-bp DNA segmentlerinde önemli dizilim farklılıklarının varlığı bölümsel uzunluk ve kompozisyonunu koruma eğilimde olmasına rağmen rekombinasyonun varlığının kanıtıdır (Ben Abdelmoumen ve ark 1999).

Tavuk ve hindi yetiştiriciliğinde damızlık stoklarının bu patojenlerden ari olması için ciddi yatırım yapılmaktadır. Damızlık stokların patojenik mycoplasmalardan ari tutulması veya bir sürüden patojenin eradikasyonu için hızlı ve güvenilir diagnostik metotlara gereksinim vardır.

Kanatlı patojen mikoplazmalarının teşhisinde; kültür, seroloji ve moleküler tabanlı testler (Polimeraz Zincir Reaksiyonu, deoksiribonükleik asit prob) kullanılmıştır. Serolojik incelemeler hala yaygın şekilde kullanılmaktadır, ancak subklinik *M. synoviae* infeksiyonlarının tanısında yeterli değildir (Ewing ve ark 1998, Kleven ve ark 2001). Kültür metotları pahalıdır, sonuca ulaşmak uzun zaman alır ve aynı zamanda yetersiz kalabilmektedir (Ewing ve ark 1998). Bu nedenle günümüzde kanatlı patojenik mycoplasmaların teşhisinde rutin olarak PCR temelli testler kullanılmaktadır. Vlha hemaglutinin (HA) geni ve 16S rRNA tabanlı *M. synoviae* PCR metotları mevcuttur (Bencina ve ark 2001, Hong ve ark 2004).

Bu çalışmada vIhA gen tabanlı PCR test metodu kullanılarak Ege bölgesinde belirlenen yumurtacı ve broyler sürülerinden alınan tracheal örneklerde *M. synoviae* araştırması yapılmıştır.

1.2. Etiyoloji

Mollicutes Sınıfında yer alan mikoplazmalar ilk kez 1898 yılında sığır kontagiyöz plörapnömoni ajanı olarak identifiye edilmiş, daha sonra plörapnömoni benzer organizmalar olarak isimlendirilmiştir (Davis B.D. ve ark 1973).

Kanatlı mikoplazmozisi 1926 yılında ilk önce hindilerde 1936 yılında ise tavuklarda tanımlanmıştır. Delaplane ve Stuart 1943 yılında CRD'den (Chronic Respiratory Disease) kümes hayvanlarındaki kronik solunum sistemi hastalığı olarak bahsetmiştir. Markham ve Wong (1952) ise CRD etkenini, hindilerin infeksiyöz sinusitisinden sorumlu patojen olarak belirtmişlerdir (Markham F.S. ve ark 1952). Daha sonraları ise PPLO (Pleurapneumonia-like organism) grubunun bir üyesi olarak düşünülmüş ve *Mycoplasma gallisepticum* (MG) olarak isimlendirilmiştir. *Mycoplasma synovia*'nın (MS) neden olduğu infeksiyöz sinusitis ise daha sonra tanımlanmıştır. *Mycoplasma meleagridis* (MM) hindileri ve diğer kanatlıları infekte eden, fakat tavukları infekte etmeyen mikoplazma türü olarak isimlendirilmiştir. *Mycoplasma iowae* (MI), doğal olarak tavuklarda, hindilerde ve diğer kanatlılarda ortaya çıkan bir patojen olarak bildirilmiş ve Iowa 695 suşu ilk olarak izole edimştir (Yoder 1962). Deneysel koşullar altında virulent bir infeksiyöz bronşitis virusu ile birlikte broylerlerde hava kesesi yangısı oluşturabilen *M. gallinarum* dışındaki diğer Mikoplazmalar kanatlı endüstrisini büyük ölçüde etkilemeyen az görülen patojenlerdir ve patojeniteleri düşüktür. Kanatlı hayvanlarda hastalığa neden olan farklı mikoplazma etkenleri bulunmaktadır. Bu etkenlerden MG ve MS en önemli türler olup OIE listesinde yer almaktadır (Anonim 2008).

Mollicutes sınıfının Mycoplasmatales takımında ve Mycoplasmatacea familyasında yer alan mikoplazmalar, 300–800 nm büyüklüğünde kendi kendine replike olabilen en küçük pleomorfik ve prokaryotik mikroorganizmalardır. Hücre duvarından yoksun olan bu mikroorganizmanın, sitoplazmik membranı üç tabakalı 'ünit membran' dan oluşmuştur. Orta tabakasında lipidlerin bulunduğu bu membran 70-80 angstrom kalınlığındadır. Diğer iki tabaka ise karbonhidrat ve proteinlerden meydana gelmiştir. Ünit membrandaki

karbonhidrat molekülleri komplementin fiske edilmesinde, nötralizan antikorların saptanmasında, aynı zamanda diğer suşlarla kros-reaksiyonlarda rol oynar. Mikoplazmalardan bazıları, ya direkt olarak kendilerinin oluşturdukları hastalıklarla veya daha yaygın olarak, diğer patojenlerle birlikte hastalıklara yol açarak kanatlı hayvan endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olurlar. Şimdiye kadar kanatlı hayvanlardan 23 Mikoplazma türü izole edilmiştir (Çizelge 1.1.) (Saif ve ark 2001, İzgür M., Akan M. ve ark 2002).

Çizelge 1.1. Kanatlı Mikoplazmaları ve temel konakçıları
(İzgür M., Akan M. ve ark 2002)

Mycoplasma Türü	Tip Suşu	Temel Konakçılar
<i>M. anatis</i>	1340	Ördek
<i>M. anseris</i>	1219	Kaz
<i>M. auteonis</i>	BT2G	Şahin
<i>M. cloacale</i>	383	Hindi,Kaz
<i>M. columbinasale</i>	694	Güvercin
<i>M. columbinum</i>	MMP 1	Güvercin
<i>M. columborale</i>	MMP 4	Güvercin
<i>M. corogypsi</i>	BVI	Akbaba
<i>M. falconis</i>	HTI	Doğan
<i>M. gallinaceum</i>	DD	Tavuk,Oyun kuşları
<i>M. gallinarum</i>	PG 16	Tavuk,Hindi
<i>M. gallisepticum</i>	PG 31	Tavuk, Hindi, Oyun kuşları
<i>M. gallopavonis</i>	WR 1	Hindi
<i>M. glycyphilum</i>	486	Tavuk,Oyun kuşları
<i>M. gypis</i>	BLTI	Akbaba
<i>M. imitans</i>	4229	Ördek,Kaz
<i>M. iners</i>	PG 30	Tavuk, Hindi
<i>M. iowae</i> (İ,J,N,Q,R)	695	Hindi, Tavuk
<i>M. lipofaciens</i>	R 171	Tavuk,Hindi
<i>M. meleagridis</i>	17529	Hindi
<i>M. pullorum</i>	CKK	Tavuk, Oyun kuşları
<i>M. synoviae</i>	WVU 1853	Tavuk,Hindi,Oyun kuşları

Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz olan mikroorganizma, mikroskopta genellikle, oval, halka, yüzük, kokoid, dallı, yıldız şeklinde pleomorfik olarak görülür.

Etken fakültatif anaerobtur. Gram negatif olmasına rağmen, anilin boyaları ile çok güçlü boyanır. Etkenin boyanabilmesi amacıyla Giemsa, Macchiavello, Castenada ve Stamp boyama yöntemlerinden yararlanılır (Akan M ,İzgür M 2002).

Etken; canlı ortamlardan embriyolu tavuk yumurtasında, doku kültüründe (tavuk kalbi, fibroblast vs.) ve deney hayvanlarında üreyebilir. Ayrıca, etkeni zenginleştirilmiş katı ve sıvı besi yerlerinde üretmek mümkündür. Katı besi yerlerinde ortası düğmeli, kenarları yuvarlak koloniler oluşturur. Bu koloniler besiyerine kama gibi gömülmüşlerdir. Düğme şeklindeki orta kısım yoğun granüler yapıdadır. Bu koloni görünümüleri bakterilerin L-formuna benzer. Sıvı besi yerinde oldukça zayıf bir üreme kabiliyeti gösterir (Jordan ve ark 1996).

M. synovia'nın etiyolojik özellikleri genel mikoplazma türleri ile benzerdir. DNA analizleri sonucunda *M. synoviae* suşları arasında heterojenite belirlenmiştir. Suşların virulansları ile solunum sistemi kanalına veya eklemlere karşı olan tropizmlerinde varyasyonlar bulunmaktadır. Hemen hemen bütün *M. synoviae* suşları tavuk eritrositlerini aglutine ederler. Mikoplasma etkenlerinin hücre duvarlarının bulunmaması, kimyasallara ve çevresel koşullara dirençliliği oldukça azaltır. Bu nedenle çoğu dezenfektan, etkeni inaktive eder. Hücre duvarı yapısını bozarak etkileyen antibiyotiklere tüm mikoplazmalar dirençlidir. Etken, konakçı dışında çevresel koşullara duyarlıdır. Bu durum hastalıkla ilgili kontrol programlarını oluşturulmasında dikkate alınmalıdır. Etkenin eksudat ve soğuk ortamlarda yaşama süresi uzundur. Tavuk dışkısında 1-3 gün canlı kalabilir, ortam ısısı arttıkça yaşama süresi azalır. Etken; konakçı vücudunda ise yıllarca canlılığını sürdürebilir (Jordan 1996, Akan M 2002).

1.3. Epizootiyoloji

M. synoviae'nın neden olduğu hastalık tablosunu, özellikle de, solunum sisteminde görülen hastalık formunun oluşmasında veya şiddetinin artmasında etkili olan faktörler, enfeksiyona neden olan suşun virulansı, konakçının türü ve yaşı, diğer patojenlerle birlikte aynı anda oluşan enfeksiyonlar ve hayvanları güçsüz kılan faktörler olarak sıralanır. Bunların dışında; beslenme ve havalandırma yetersizliğine bağlı olarak kümeste aşırı amonyak ve toz bulunması, ısıtma noksanlığı, aşırı kalabalık, kümes dezenfeksiyonları ve diğer stres faktörleri hayvanları duyarlı hale getirmektedir. Hindilerde *M. synoviae* ve *M. meleagridis* enfeksiyonlarının birlikte bulunması durumunda, tek başına *M. synoviae*

infeksiyonuna göre çok daha şiddetli bir koriza tablosu ortaya çıkar (Akan M., İzgür M.,2002).

Etkenin doğal konakçıları arasında, tavuk, hindi ve beç tavuğu gibi kanatlı türleri bulunur ve bunlar arasında da hastalığa en duyarlı olan tavuklardır. Tek başına *M. synoviae* tarafından oluşturulan hastalık, genellikle 4-14 haftalık tavuklarda, 10-14 haftalık hindilerde görülmektedir. Doğal infeksiyonu takiben hayvanlarda koruyucu özellikte bir immun yanıt şekillenir (Calnec 1997, Akan ve İzgür 2002).

Hastalık hem vertikal hem de lateral bulaşma gösterebilmektedir. Lateral bulaşmada; sağlıklı hayvanların hasta olanlarla teması oldukça önemlidir. Ayrıca, hayvanlar damlacık infeksiyonu şeklinde de etkeni direkt olarak alabilmektedir. Bu durumda, etken çoğunlukla solunum sistemine, yani trachea ve sinuslara lokalize olur. Aynı kümeste barındırılan duyarlı bir sürüde bu tür bulaşma çok hızlı şekillenebilir ve kümesteki hayvanların çoğunluğu hastalanır. Lateral bulaşma, indirekt olarakta şekillenir. Bu bulaşma tarzı çiftleşme ile olabildiği gibi suni tohumlama ve aşılama gibi işlemlerde kullanılan ekipman ve bunları kullanan bireyler aracılığı ile de şekillenmektedir. Aynı şekilde kontamine su ve yemlerle veya rüzgar ile taşınma sonucunda da etken bulaşabilir. Sivrisinek, bit, pire ve kene gibi vektörlerin kanında etken bulunmasına karşın, bu canlıların infeksiyon taşıyıcısı olup olmadıkları henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Akan M., İzgür M. 2002).

Vertikal bulaşma ise yumurta ile olmaktadır. Özellikle damızlık işletmelerde vertikal bulaşma çok önem taşımaktadır. Hastalıkta en önemli kayıp mikoplazma ile infekte damızlıklardan elde edilen civcivlerde performans kaybıdır. Bu bulaşma şekli; klinik belirti gösteren damızlıklarda yüksek olmasına karşın, klinik belirtilerin olmadığı kümeslerde de görülmektedir. Tavuk ve dişi hindilerin oviduktundan, horoz ve erkek hindilerinde spermalarından etken izole edilmiştir. Sürüde az sayıda infekte fakat semptom göstermeyen hayvan olsa dahi, bunların yumurtalarından çıkan birkaç civciv, hastalığın lateral bulaşmasında ayrıca önemli rol oynar. Mycoplasmalar genellikle, birbirine yakın kanatlı türleri arasında bulaşabilmektedirler. Bazı durumlar hariç konakçı spesifiktirler MS ve MG infeksiyonlarında diğer viral ve bakteriyel etkenlerle komplike olan vakalarda ekonomik kayıplar ve ölüm oranı ciddi düzeyde artar (Anonim 2008).

Mikoplazma etkenlerinin hücre duvarı olmadığından, oldukça duyarlı ve bu nedenle konakçı dışında çok kısa sürede ölecekleri düşünülmektedir. Ancak yapılan çalışmalarla, *M. gallisepticum*'un insan burun boşluğunda 24 saat ve giysilerinde 3 gün kadar yaşayabildiği saptanmıştır. Bu nedenle; çiftlikler ve sürüler arasındaki bakıcıların farklı olması, buna olanak yok ise; bakıcının infekte olmayan sürülerden, şüpheli sürülere ve daha sonra bilinen pozitif sürülere doğru iş yönünü takip etmesi sağlanmalıdır. Hastalık Newcastle ve IB ile infekte hayvanlarda çok daha şiddetli seyretmektedir. İnfeksiyonunun vücuttaki yayılması hematojen yolla olmakta ve eklem ve/veya solunum sistemi dokularının hastalığına ek olarak hayvanlarda anemi, tüm vücutta retiküler hücre proliferasyonu ve vaskülitis görülmektedir (Akan M.,İzgür M. 2002).

1.4.Semptomlar

İnfeksiyon hem tavuk hem de hindilerde sıklıkla görülür. Klinik belirtiler şekillenmeksizin hayvanlar serolojik olarak pozitif hale gelebilirler. İnfekte hayvanların ancak % 10'unda semptomları görmek mümkündür. Hastalıkta, artritik veya respiratorik formda klinik belirtiler meydana gelir (Akan M.,İzgür M. 2002).

Akut artritik formda; hayvanlarda belirgin bir depresyon, yüzde ve ibiklerde solgunluk, takatsızlık, yer değiştirememesi ve eklemlerde şişkinlik görülür. Özellikle ayak ve diz eklemleri etkilenir ve bunun sonucunda hayvanlarda topallık şekillenir. Hindilerde hasta eklemlerde şişkinlik her zaman görülmeyebilir. Buna karşın hindilerde sıklıkla göğüste su dolu kabarcıklar (breast blisters) şekillenir. Kronik olgularda ise, eklemlerde şişkinlik ile birlikte topallık gelişir fakat hayvanlarda sistemik bir bozukluk meydana gelmez (Akan M.,İzgür M. 2002).

Eklem lezyonlarından bağımsız olarak gelişen respiratorik formda ise; tavuklarda orta şiddette hırıltı ve burun akıntısı ile karakterize koriza tablosu şekillenir, hindilerde ise koriza tablosu tavuklardakine oranla daha şiddetlidir ve infraorbital sinusların şişmesi ile birlikte sinüsitis şekillenir ve sonuçta hayvanın gözleri tamamen kapanabilir. Hayvanların burun akıntılarını yok etme çabası sonucunda; kanat tüyleri genellikle altlıkla bulaşık hale gelir. Konjunktivitis şekillenir. Hasta hayvanlarda yem tüketiminin azalmasına bağlı olarak şekillenen kilo kaybıda gözlenir. Yumurta tavuklarında verim düşüklüğü, dölsüz yumurta sayısında artma (% 10'dan fazla) ve döllü yumurtalarda kabuk altı ölümler şekillenir. Broilerlerde infeksiyon daha çok 4-8 haftalık hayvanlarda görülür ve en önemli belirti;

karkas ağırlığındaki azalmadır. Morbidite büyük ölçüde değişkenlik göstermekle birlikte tavuklarda ortalama % 10 civarında ve hindilerde bundan daha da azdır (Bencia ve ark 2006).

Hasta veya ölen hayvanların nekropsileri yapıldığında, lezyonlar dikkat çekmeyecek kadar hafif olabileceği gibi, burun delikleri, trachea ve akciğerlerde aşırı mukus ve kataral eksudat birikmesi ve hava kesesi duvarında ödemle karakterize olabilir. Burun deliklerinde, bronşlarda ve hava keselerinde kazeöz bir eksudat görülebilir. Özellikle hindilerde görülen infraorbital sinüs dilatasyonu, burada biriken ve bazı olgularda yerini kazeöz materyale bırakan mukus kaynaklıdır (Akan M., İzgür M. 2002).

Hava keselerinin normal şeffaflığını kaybederek matlaştığı ve kalınlaştığı, bazı durumlarda perikartta toplanan eksudat nedeniyle kalbin göğüs kemiğine yapıştığı gözlenir. Diğer patojenler tarafından hastalık seyrinin şiddetlendirildiği olgularda, lezyonlar daha da şiddetlenir ve hastalık daha uzun süreli bir seyir izleyerek kronik bir tablo oluşturur. Özellikle, intensif koşullarda yetiştirilen 4-10 haftalık piliçlerin *E. coli* infeksiyonunda perikarditis, perihepatitis ve hava kesesi yangısı dahil, solunum sistemi hastalığı ile birlikte koliseptisemi şekillenir (Bencia ve ark 2006, Akan M. ve İzgür M. 2002).

Hastalık synovia ve eklemlerde görüldüğünde, periartiküler dokularda, özellikle de synovial membranlarda ödem ve kalınlaşma şekillenir. Başta ayak ve diz eklemleri olmak üzere tüm eklemlerde hastalık görülebilir. Bu değişiklikler, sternal bursa dahil, büyüyen ve kalınlaşan tüm bursalarda ve şişkinleşen tendo kılıflarında da meydana gelir. Başlangıçta berrak olan, sonradan şeffaflaşan ve sonuçta kremamsı bir görünüm alan eksudat şekillenir. Tavuklarda bu eksudat kazeöz bir hal alır ve genellikle kahverengi ve portakal renginde görülür. Çok şiddetli olgularda bu tip eksudatlara kafatasında ve boynun dorsal kısmında da rastlanır. Hindiler de eksudat nadiren kazeöz bir hal alır. Eklem kıkırdağında erozyonlar da şekillenir. Deneysel olarak taban yastığı yolu ile oluşturulan infeksiyon sonucunda tenosinovitis meydana gelir (Akan M., İzgür M. 2002).

Hasta bir sürüdeki hayvanların bazılarında dalak büyür, karaciğer şişkinleşir, yeşil veya koyu kırmızı bir renk alarak benekli bir görünüme döner, böbrekler de benzer bir şekilde şişkinleşir, soluk bir renk alarak benekli bir görünüme döner. Timus ve bursa

fabriciusda atrofi şekillenir. Nekropside piliçlerde synovial membranlarda ödematöz bir infiltrasyon gözlenir (Calnec 1997, Akan M., İzgür M. 2002).

1.5. Hastalığın Teşhisi

Mikoplazmaların oldukça zor üreyen mikroorganizmalar olmaları ve pasajlarla birlikte yaklaşık 3-4 hafta gibi uzun bir inkubasyon süresine ihtiyaç duymaları, kanatlı sürülerinde geçirilen diğer infeksiyonlara karşı kullanılan antibiyotiklerin mikoplazma etkenlerinin üremesini baskılaması gibi olumsuzluklar, hastalığın teşhisini zorlaştıran etkenlerdir ve bu etkenler kaynaklı teşhis konulduğunda sürünün sağaltımını ve etkili koruyucu önlemlerin alınmasında oldukça zorlu ve zahmetli bir süreçtir (Frey ve ark 1968, Esendal 2002).

Ne solunum sistemine ait klinik belirtiler ve nekropsi bulguları ve ne de eklem lezyonları hastalık için patognomik değildir. Hastalığın respiratorik formu; infeksiyöz koriza, kronik kolera, kollibasillozis gibi bakteriyel, Newcastle, IB, ILT gibi viral infeksiyonlarla karışır. Hastalığın diğer sinovitislerden (Stafilokok infeksiyonları) ayrılması için mutlaka ya izole ve identifiye edilmesi ya da serolojik tekniklerle spesifik antikörlerin varlığının gösterilmesi gereklidir (Akan M., İzgür M. 2002).

1.5.1. Teşhis Teknikleri

Klinik olarak belirti göstermeyen kanatlıların sinus eksudatlarından izole edilen izolatlar aynı zamanda klinik olarak hastalıklı kanatlıların konjunktival sinuslarından da izole edilebilir (Ferguson ve ark 2005). Ölen kanatlılarda ise eksudatlar infraorbital sinuslar ve eklem boşluklarında aspire olabılırken, örnekler nasal boşluk, infraorbital sinus, akciğer, trachea ve hava keselerinden alınabilir (Anonim 2008). Horozlardan alınan semen ve tavukların yumurta folikülleri de izolasyon materyali olarak kullanılmaktadır. Kuluçka da ise; kabukaltı ölü civcivler, kabuğu kırmış fakat çıkamamış olanlar materyal olarak laboratuvara gönderilmelidir. Serolojik teşhis ve izleme programlarının uygulandığı kümeslerden kan serumları teşhis için yeterlidir. Diğer mikoplazma infeksiyonlarında olduğu gibi *M. synoviae* izolasyonu için de özel besiyerlerinden yararlanılır (Akan M., İzgür M. 2002).

Mycoplasma gallisepticum ve *Mycoplasma synoviae* infeksiyonlarının teşhisi birincil tarama testleri ve teyit testleriyle yapılmaktadır. Mikoplazma etkenlerinin direkt

teşhisinde ve tiplendirilmesinde izolasyon ve identifikasyon, immunperoksidaz, FAT(Floresan Antikor Tekniği) ve moleküler yöntemler (PCR, PCR/RFLP), kullanılmaktadır. Yıllardan beri, kanatlı mikoplazmalarının teşhisi spesifik antikor üretimi ve mikroorganizmanın izolasyon ve identifikasyonu metotları ile yapılmaktadır (Freundt E.A. 1983). Mikoplasma infeksiyonlarında; kesin teşhis için kültür metodu kullanılmasına rağmen çok uzun zaman gerektirmesi, kontaminasyon riski antibiyotik kullanımı ve kültürün tam oluşabilmesi için mikroorganizmaların canlı olması gerekliliği bu metodun dezavantajları olarak görülmüştür. Pozitif sonuçlar genelde 4-7 gün arasında alınmasına rağmen kesin negatif sonuçlar için 30 günlük bir sürenin geçmesi gerekmektedir (Esendal 2002).

Kanatlı mikoplazmalarının izolasyon için birçok uygun kültür vasatı geliştirilmiştir. Kültür yavaş, zahmetli ve pahalı olup steril koşullar gerektirir ve yetersiz de kalabilmektedir. Etken izolasyon ve identifikasyonu; Frey's broth ve Frey's agar kullanılarak OIE manüel (Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi)'de tanımlanan mikoplasma izolasyon prosedürüne göre yapılmaktadır. MS'nin izolasyonu için besiyerlerine Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) ilave edilmesi gerekmektedir. Tüm besiyerleri temel olarak % 10-15 at, domuz veya kanatlı serumu (sterol ve kolesterol gereksinimi için), maya, glukoz, arginin ve bakteriyel inhibitörler katılarak hazırlanır. Ayrıca bakteri kontaminasyonlarını önlemek için penisilin (100-500 IU/ml) ve thallium acetate (0.25 mg/ml) da ilave edilir. Thallium acetate'ın kullanımı bazı ülkelerde yasaklı olduğundan ampisilin (1.0 mg/ml) yerine kullanılabilir. Mikoplasma izolasyonu için katı besiyeri olarak Mikoplasma agar, PPLO agar; sıvı besiyeri olarak ise Mikoplasma broth ve PPLO broth besiyerleri kullanılmaktadır. MG invitro zor ürediği için, % 10-15 hayvan serumları ilave edilen besiyerinde çok yavaş ürer ve diğer bakteri ve mantarların üremesini engellemek için ortama katılan belli antimikrobial ajanlara karşı da dirençlidir. Kültürler çok asidik veya alkalik durumlarda ölürler. *M. synoviae* özellikle asidik pH'a duyarlıdır. Üremeye % 10 CO₂'in olumlu etkisi vardır (Levisohn ve ark 2000).

MG'nin serolojik identifikasyonu üreme inhibisyon, metabolik inhibisyon, immunfloresan, agar jel presipitasyon, immunperoksidaz ve immunelektroforez gibi çeşitli yöntemlerle yapılmaktadır (Talkington ve ark 1983). Sürüleri muayene etmek için bu serolojik testler yararlıdır ancak bu testlerin spesifite ve/veya sensitiveleri zayıftır ve bireysel infekte hayvanların teşhisinden ziyade sürü taramalarında kullanıldıkları zaman

daha tatminkar sonuçlar verirler. Mikoplazmaların teşhisinde serolojik testlerden SPA, TA, HI, ELISA daha çok kullanılmaktadır Lam aglutinasyon testi hızlı, basit ve pahalı olmayan bir testtir. Mikoplazma antikorları yönünden pozitif bulunan sürülerde pozitif ya da şüpheli bulguların kültür ve/veya PCR ile doğrulanması gerekir. Çabuk Serum Aglutinasyon (SPA) testi en sık kullanılan serolojik testtir (Kleven ve ark 1988). *M. synoviae*'ya karşı elde edilen antiserumlar SPA testinde *M. gallisepticum* antijenini genellikle aglutine eder. Daha az oranda bunun terside meydana gelir. Bu çapraz reaktivite, iki mikroorganizma arasında ortak olan ve yakın zamanda varlığı gösterilmiş bulunan ortak antijenlerden kaynaklanır. Artrit formun ayırıcı tanısında benzer lezyonların oluşmasından rol oynayan Stafilokok, Pasteurella, koliform ve Salmonella cinsi bakterilerle bazı reoviruslar dikkate alınmalıdır. TA testinin uygulanması SPA'dan daha uzun süre alır fakat bu test bazı araştırmacılar tarafından SPA'ya göre daha kesin olarak değerlendirilmektedir. SPA ve TA'dan daha duyarlı olan HI testi mikro olarak uygulanır ve çoğunlukla da SPA'da pozitif reaksiyon veren serumların doğrulanması amacıyla kullanılır. Spesifik antikorların saptanması amacıyla bir infeksiyonun tanısında, ayrıca, monoklonal-antikor bloke edici ELISA tekniği ve *M. synoviae* için duyarlı ve spesifik olan ticari PCR teknikleri de kullanılmaktadır (Akan M., İzgür M. 2002).

HI testiyle IgG antikorları tespit edilir. Ancak test hastalığın girişinden 2-4 hafta sonra pozitiflik verir. Bu test SPA testine göre daha spesifik fakat daha az hassastır. ELISA testi ile de IgG'ler tespit edilmekte ve çabuk sonuç verdiği için tercih edilmektedir. Bu test kitleri infeksiyon sonrası oluşan pozitif serumları HI testinin tespit ettiği sürede tespit eder. Ticari kitlerin kalitesi iyi olmasına rağmen bazen yanlış pozitiflikler görülebilir Suşlar çabuk şekil değiştirdiği ve diğer infeksiyonlarla işbirliği geliştirebildiği için ELISA testinde de hatalar oluşmaktadır (Kleven 1998).

Bütün bunların sonucunda veteriner diagnostik laboratuvarlarında mycoplasma'nın identifikasyonu için moleküler metotlar (PCR) kullanılmaktadırlar. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile hem genetik materyalin çoğaltılması, hem de ortaya konması amaçlanmaktadır. PCR'nin temelini hedef DNA'nın spesifik deoksinekleotid primerleri ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi yardımıyla invitro koşullarda çoğaltılması oluşturmaktadır. Sonrada işaretli probalar yardımıyla 1-2 gün içinde teşhis etmek mümkün olmaktadır. Diğer testlere göre daha hızlı (30 dak.-5 saat) güvenilir, ekonomik ve çabuk örnek işleyebilecek varyasyonlara (PCR-ELISA, Real Time-PCR) sahiptir.

Hastalık yönünden temiz olduğu düşünölen bir sürüde bazı hayvanların serumları serolojik testlerde pozitif reaksiyon gösterebilir. Eđer hayvanlarda klinik belirti yoksa ve infeksiyonunun tek belirleyici bu antikorsarsa seropozitif hayvanlar bir ay sonra yeniden test edilmelidir. Bu ikinci muayenede serumlar büyük çoğunlukla negatif bulunurlar (Akan M., İzgür M. 2002).

1.5.2. Moleküler Yöntemlerle Teşhis

Mikoplazmalar yüksek derecede fenotipik varyasyon gösterirler. Pseudogenlerle hemaglutinin kodlayan vlhA geni arasındaki rekombinasyon sonucu şekillenen antijenik varyasyon MS infekte tavuklarda gecikmiş serolojik yanıtın sebebi olabilir. Mikoplazma teşhisi için kullanılan mikroorganizmaların uygun ortamda üretilmesi teknikleri zahmetli, pahalı ve zaman kaybettiricidir ve bu nedenle rutin prosedürün bir parçası olmaktan çok uzaktır. Fiorentin ve arkadaşları MS infeksiyonunun teşhisi için kullanılan farklı diagnostik prosedürler üzerine çalışmışlar ve PCR'in diğer serolojik testlerden ve kültür tekniklerinden çok daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır (Fiorentin ve ark 2003).

Kanatlılarda mikoplazma infeksiyonlarının teşhisinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), konvansiyonel bakteriyolojik ve serolojik testlerdeki olumsuzlukları aşabilen, spesifite ve sensitivitesi yüksek, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (Akan ve ark 2008, Çarlı ve Eyigör 2003, Marois ve ark 2005). Mikoplazmalar trachea, hava kesesi ve akciğer gibi etkilenen organlardan, aynı zamanda synovial, oküler ve infraorbital sinus eksudatları, trachea ve hava kesesi svablarından da tespit edilebilir MG ve MS'nin izolasyonu ve PCR metodu ile tespiti için canlı kanatlılarda tracheadan alınan svablar en uygun örnektir. Bu düşünceye karşıt olarak, yapılan bir çalışmada, direk canlı tavuklardan alınan svablardan *M. gallisepticum* tesbit edilemezken, otopsi yapılarak trachea açılıp, trachea mukazasına sürölerek alınan svabların hepsinden *M. gallisepticum* izole edildiği bildirilmiştir (Nascimeto E.R 1994-1998)

Kültür yada PCR için toplanan örnekler işlenmeden önce % 50 Frey's vasatına bırakılır yada tuzlu fosfat tamponlu gliserolda yada derin dondurucuda muhafaza edilir. MG, 37 °C' de Mycoplasma broth yada Mycoplasma agarda CO₂'den zengin ortamda brothların rengi değişinceye kadar, agarda koloniler gözükünceye kadar kültürü yapılır (Harasawa 2004).

MG ve MS için konvansiyonel PCR ve real time PCR tekniği kullanılmaktadır ve bu mikroorganizmaların tespiti için 16S rRNA geninin yüzey yapışma proteinlerini (mspL, pvpA, gapA, mgc-2, LP) kodlayan genleri ve hemaglutinin proteinlerini kodlayan genleri çoğaltan çok sayıda primer çifti kullanılmıştır. Son yıllarda hem bakteriyel hemde viral patojenlerin ve genlerin tespit edildiği multipleks PCR amplifikasyon teknikleri kullanılmaya başlanmıştır (Wang ve ark 1997). PCR tabanlı testlerle yapılan bazı çalışmalar ve sonuçları aşağıdaki gibidir;

2009 yılında yapılan bir çalışmada; farklı PCR-tabanlı methodlarla (örneğin; IDEXX Laboratuvarları, Genekam Bioteknoloji AG, Adiajene tarafından üretilmiş) yapılan MS suşları identifikasyonları karşılaştırılmıştır (Katarzyna Domanska ve ark 2009).

PCR tabanlı metodların sensitivite ve spesifitesi seçilen primerlerin dizilimine bağlıdır. MS identifikasyonunda kullanılan PCR metodları; çeşitli gen fragmanlarının özellikle kullanımı en popüler olan 16S rRNA amplifikasyonuna dayanmaktadır, bunun yanı sıra MS genlerinden vvhA ve intergenik halka bölgesi(IRS) ile 23S rRNA geni arasındaki fragmanlar teşhis gücünü artırmaktadır 16S rRNA, düşük düzeyde genetik varyasyonlar ile yüksek düzeyde korunmuş bir bölgedir ve bazı MS türlerinin identifikasyon ihtimalini arttırmaktadır. Diğer yandan, 16S rRNA PCR metodları, diğer mikoplazma türlerinin DNA teşhis oranlarını yükseltmektedir. Birbirine fenotipik olarak yakın olan iki mycoplasma türü *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma imitans*'da da 16S rRNA genleri birbirine çok benzerdir ve 16S rRNA genini hedefleyen primerler birbirine benzer ürünler oluşturur Bununla birlikte, *M. imitans* ördekleri, kazları ve keklikleri infekte etmektedir ve tavuklarla kıyaslandığında örneklendirmesi daha az öneme sahiptir. Saptanan bu gerçeklerden dolayı, MG ve MS genlerinde bu genin iki kopyası mevcuttur, 16S rRNA hedefli PCR iki etken içinde yüksek sensitiviteye sahiptir (Papazisi ve ark 2003).

Farklı avian mikoplazmalarının genom dizilimi; IRS olarak isimlendirilen ve 16S ile 23S rRNA arasına yerleşmiş olan ve 16S rRNA geninden türler arası varyasyonu daha fazla olan bir fragmanı ortaya çıkarmıştır. MS identifikasyonunda hedef olarak IRS'in kullanımı tanımlanmıştır. Sözü geçen bu metodlarda, identifikasyonun sonuçlarında örneklerin hazırlanış şeklinin önemi büyüktür. Ramirez ve arkadaşları tarafından uygulanan bazı DNA ekstraksiyon metodlarının DNA'nın 10-2 dilüsyonu ve 100 kere

hafifletilmiş dilüsyonlarında DNA identifikasyonuna izin verdiğini saptamışlardır (Ramirez ve ark 2006).

PCR tabanlı metotlar ile yapılan çalışmalar da pozitif sonuç düzeyleri değişkenlik gösterebilir olmasına rağmen bu testler hızlı olmaları düşük maliyetli olmaları nedeniyle çok değerlidirler. Real time PCR, PCR sonrası keşif prosedürlerini ortadan kaldırması ve testin spesifikliğini arttıran fluorogenetik problemlerin kullanımından dolayı oldukça kullanışlı görülmektedir (Katarzyna Domanska ve ark 2009).

PCR ve kısmi VlhA gen dizilimi suş identifikasyonunda faydalı olabilir Bencina ve arkadaşları (2001) tavuklardan ve hindilerden alınan örneklerde *M. synoviae* suşunun hemaglutinin (vlhA) gen kısımlarını (3' son ve 5' son) karşılaştırmıştır ve sonunda 11 farklı tip vlhA kısmı bulmuştur. Benzer bir çalışma 2004 yılında Hong ve arkadaşları tarafından yürütülmüş ve aynı türlerden 43 suş arasında 14 farklı grup izole edilmiştir.

VlhA geninin pseudogenler ile rekombinasyonu sonucu (konağın immun yanıtından kurtulmayı sağlayan mekanizma) genin sonundaki 3' noktasında önemli ayrılıklara sahiptir, ancak 5' sonuyla ilişkili korunma söz konusudur (Noormohammadi ve ark 2000). *M. synoviae* genomunda vlhA 5' bölgesi tek bir kopya sunmaktadır ve *M. synoviae*'nin klonal popülasyonlarında sıralamasında değişiklikler yoktur (Noormohammadi ve ark 2000). Bu durum *M. synoviae*'nin klonal popülasyonlarında değişebilir ve bu nedenle bireysel suşları karakterize eden korunmuş sıralar dikkate alınmamalıdır (Noormohammadi ve ark 2000). 2004 yılında Hong ve ark. tarafından değerlendirilen test kombine PCR'dır ve vlhA geninin tekrarlayan bölümleri PRR'ın dizilimi keşfedilmiş ve *M. synoviae* suşları izolasyona gerek kalmadan tiplendirilmiştir. Bununla birlikte, *M. synoviae* suşlarının subtiplendirmesinde çok etkin olan RIII bölümü (konum:343/400), dahil değildir. PRR ekleme/silme işleminden dolayı etkin bir kısımdır ve RIII bölgesi polimorfiz açısından yararlıdır (Noorhammadi ve ark 2000).

M. synoviae suşlarının nükleotid ve amino asit bölümlerinin analiz edilmesi, bu kısımların suş identifikasyonunda ve başlangıç tiplendirme metodu olarak etkinliği olduğu düşüncesini desteklemektedir. Bencina ve arkadaşları (2001) vlhA geninin 5' sonundaki polimorfizimin, *M. synoviae* izolatlarının epidemiyolojik analizlerinde etkin olduğunu belirtmiştir. İncelenen tüm suşlarda eleme/silinmeler gözlenmiştir ve patojenlik açısından ilişkili oldukları düşünülmektedir.

DNA kısımlarının analizi, *M. synoviae* suşları arasındaki filogenetik yakınlığı saptamak için kullanılır ve filogenetik düzen, hangi türlerin daha yakın ilişkili olduğunu göstermektedir. Örneğin; Bencina ve arkadaşlarının (2001) tiplendirme sisteminin kullanımı, filogenetik düzen açısından incelendiğinde, J26/85'in B11/85'e J15/85'e oranla daha yakın ilişkili olduğunu ortaya koymasına rağmen, J26/85suşu ile J15/85suşunun aynı tip'te oldukları ve B11/85'den farklı olduklarını göstermiştir. Bu tez, DNA homolojileri ile desteklenmektedir çünkü ekleme/silmeler ile J26/85 ile B11/85'in karşılaştırılmasında % 88.9 benzerlik saptanmasına rağmen ekleme/silmeler olmaksızın benzerliğin % 100 olduğu belirlenmiştir. buna karşın, J26/85 ile J15/85'in homolojileri karşılaştırıldığında ekleme/silmeler ile % 99.6 iken eklemek/silmeler olmaksızında aynı değer olduğu saptanmıştır. Hem direk swablardan hemde kültürlerden DNA ekstaksiyonu başarı ile gerçekleştirilir ve *M. synoviae* tespitinde ve suş tiplendirmesinde kullanılır (Bencina ve ark 2001).

1.6. İmmunolojik Araştırmalar

Mikoplazmalar, konak dokularında kolonize olurlar ve hem sistemik hem de lokal immün yanıtı neden olurlar, bazı zaman immünyüpresif ve otoimmün hastalıklar, mikoplazma infeksiyonlarına eşlik eder (Razin ve ark 1998).

Hücre duvarının yokluğunda, yüzey proteinlerinin asil kısımları (örneğin; lipoproteinler) ile bağlanması veya hücre membranına gömülü olması mikoplazmalar ile konakları arasında etkileşimde büyük rol oynar (Razin ve ark 1998). VlhA bol miktarda lipoprotein ihtiva etmektedir ve *M. synoviae*'nin en önemli membran immunojenidir (Bencina 2002). Post-tranlasyonel ayrılma sonucu vlhA proteininden N-terminal lipoprotein kısmı MSPB (40-50kDa) ve C-terminal kısım MSPA(50-55kDa) oluşur MSPB boyutu *M. synoviae* izolatları arasında prolince zengin vlhA bölgesine eklenmeler ve silinmelerden dolayı farklılık gösterir. Ayrıca, yaklaşık 20-30 kDa boyutundaki kesilmiş MSPB (tMSPB) formları *M. synoviae* populasyonlarında hemaglutinin fenotiplerinde ve/veya MSPB ve MSPA antijenik determinantlarında değişimlere neden olur. Triton X-114 bölünmesi ile izole edilen tMSPB formları, MSPB'nin lipid modifiyeli N terminal parçası olduğunu gösterir (Noormohammadi ve ark 1997-1998). MSPB ve tMSPB yüksek immunojeniktir ve IS'nin akut fazında hem lokal hem de sistemik antikor yanıtı sebepleri olurlar (Narat ve ark 1998).

Mikoplazmal lipoproteinler; konak hücrelerinde köprü benzeri reseptörlerle (TLR) etkileşen birleştirilmiş patojen molekül modelleri (PAMPs) olarak sınıflandırılırlar (Iqbal ve ark 2005). Lipopolisakkaritler ile birlikte lipoproteinlerin tanımlanma kabiliyeti, tavuk makrofaj ve heterofillerinde bulunan tavuk TLR2(ch TLR2) için ispat edilmiştir (Iqbal ve ark 2005). TLR2 genetik bilgi aktarımı metabolik yolunun aktivasyonu IL-1b, IL-6 ve NO'yu içeren immunomodülatör moleküler sentezinin başlamasına neden olmaktadır (Beutler ve ark 2006)

M. synoviae otoimmün bir hastalık olarak düşünülmüştür (Kleven 2003). Günümüzde, IS enfeksiyonunun süreçleri tam olarak bilinmemektedir ancak T hücreler, büyük ihtimal sitotoksik CD8'le ilişkili olabilir (Narat ve ark 1998). *M. synoviae* immün yanıtı *M. synoviae* proteinlerinden farklı spesifik antikorların varlığı vasıtasıyla ispat edilmiştir, *M. synoviae* enfeksiyonlarında hücre bağımlı immünite varlığına dair çok az bilgi mevcuttur (Kleven 2003).

Bir çalışmada, *M. synoviae* lipoproteinleri tarafından aktive edilen tavuk makrofajları araştırılmıştır. Makrofajlar, hem doğuştan immünyetede hem de spesifik antikor ve hücrelere bağımlı immün yanıtın oluşumunda önemli bir role sahiptir. Makrofajlarda reseptörlere PAMP patojenlerin bağlanması, IL-1,IL-6,IL-8 ve TNF'a gibi sitokinlerin salgılanmasını uyarılmaktadır. Bakterideki en etkili PAMP'lerden biri olan lipopolisakkaritler (LPS), hücre duvarı bulunmayan mikoplazmalarda mevcut değildir (Razin ve ark 1998). Geçmiş çalışmalar, bazı mikoplazma türlerinin proteinleri, monositler ve makrofajlar tarafından salgılanan NO'nun yanı sıra IL-1b, IL-6 ve TNF'a gibi proinflatuvar sitokinleri indükleyebildiklerini göstermektedir. Mikoplazmalar tarafından belirlenen sitokin stimülasyon mekanizmaları LPS'nin neden olduklarından farklıdır. Örneğin; *M. fermentans*'daki MALP-2, *M. salivarium*'daki FSL-1 ve *M. hyorhinis*'deki VlpA ve VlpC lipoproteinleri en aktif olanlarıdır. Lipoproteinlerin N-terminal bölümlerindeki lipid kısmı, TLR reseptörleri ile bağlanır ve sitokin sentez ve sekresyonunu stimüle edebilir (Seya ve ark 2002).

Yapılan bir çalışmada *M. synoviae* proteinleri MQ-NCSU tarafından NO'nun ve tavuk MDM'si tarafından IL-6 ve IL-1b'nin sekresyonunu uyarır. Yüksek miktarda MSPB içeren protein fraksiyonlarının çok aktif olduğu bir gerçektir, buna ilaveten incelemeler saf MSPB ve tMSPB'nin aktivitesi, özellikle bunların ULB/01/P4 suşu üzerine odaklanmıştır.

Bu suş, *M. synoviae* izolatları ile yakın ilişkili ve benzer olan bir gruba dahildir. Her iki grupta, WVU 1853 suşu ile özdeşleşmiş 50-vlhA gen bölgesi mevcut olmasına karşın, suşun MSPB'sinin PRR'ındaki 57 nükleotidini kodlayan bir tekrarında silinme mevcuttur (Bencina ve ark. 2001). Bu nedenle; suşun MSPB'si (yaklaşık 40 kDa) *M. synoviae* izolatlarının en kısa MSPB'lileri grubundadır. Ayrıca, tMSPB'lerin (20-22kDa) MSPB'nin N-terminal kısımlarını temsil ettiği bir gerçektir. MSPB'nin N-terminal amino asit bölgesi; CGDQTPAPEXT'dir (Mühlradl ve ark 1997).

Elde edilen sonuçlar hem tMSPB hem de MSPB'nin, NO, IL-6 ve IL-1b için kuvvetli birer uyarıcı olduğunu kanıtlamıştır. MSPB'nin MQ-NCSU hücrelerinde NO indüklenme kabiliyeti ile LPS'nin 100ng/ml'nin kabiliyeti benzerdir. IL-6 ile ilgili olarak, MSPB'nin aktivitesini göstermektedir. MALP-2 Nterminal lipopeptit kısımları ve FSL-etkinleştirilmiş makrofajlar ve fibroblastlar interlökinleri salgılatır (Mühlradl ve ark 1997,Into ve ark 2002).

Standart metodlarla MSPB ve tMSPB konsantrasyonu kesin olarak saptanamamaktadır ancak oldukça düşük olduğu bilinmektedir (nanomolar düzeyde). MSPB ve tMSPB NO, IL-6 ve IL-1b'nin in vitro tavuk makrofajlarında sekresyonunda kuvvetli bir uyarıcıdır (Miha Lavric 2007).

IS'nin akut fazı süresince MSPB ve tMSPB'ye karşı tavuklarda güçlü bir antikor yanıtı gelişmesine neden olduğu çok iyi bilinmesine rağmen (Narat ve ark 1998), eklem inflamasyonu ve lezyon gelişiminde bu partiküler antijenlerin rolü tam olarak bilinmemektedir. IS'de şişmiş eklem synovial membranlarında makrofaj ve lenfositler bulunmaktadır (Kleven 2003). MSPB tarafından uyarılan IL-6 ve IL-1b gibi proinflamatuvar sitokinlerin IS'nin başlangıcında aktif bir rol oynadıkları kesindir. IL-1b'nin biyolojik aktivitesi proinflamatuvar (akut fazda immun sistem yanıtının aktivasyonunu başlatan ana fonksiyon) olmasından kaynaklıdır. IL-1b; makrofajları, içinde IL-6'yı da kapsayan sitokinleri üreten T-lenfositleri gibi çeşitli hücreleri aktive eder. IL-6 ayrıca inflamatuvar bir sitokindir, bunun yanı sıra B ve T lenfositlerin aktivasyonunu içeren immun sistem etkilerinde sahiptir (Wigley ve Kaiser 2003).

MDM tarafından IL-6 ve IL-1b'nin sekresyonunun antikor yanıtın oluşumu ve *M. synoviae* kaynaklı IS'nin akut fazındaki süreçler ile ilgili olduğu kanıtlanmıştır. Etkin antikor yanıt için antijenler; B ve T lenfosit dentritik hücreleri veya makrofajlar tarafından

hazırlanır ve sisteme sunulur. Genellikle, makrofajlar mikoplazmaları, opsonizasyona (örneğin; spesifik antikor veya komplementler ile kaplanma) uğramadıkça yutamazlar (Razin ve ark 1998). Makrofajların *M. synoviae* antijenlerini nasıl sağladıkları ve geliştirdikleri hala tam olarak bilinmemektedir. İn vitro çalışmalar sonucunda kesin olan bilgi ise; MSPB'yide kapsayan *M. synoviae* hemaglutinini serbest bırakabildiği veya salgıyabildiğidir (Bencina 2002). İn vivo ortamlarda gelişen bu gibi durumlarda MSPB'nin makrofajlar tarafından işleme süreci çok daha hızlıdır. MSPB ve tMSPB'nin tavuk MDM'sinin önemli bir aktivatördür (Miha Lavric 2007).

MSPB'nin bağlanabildiği makrofaj reseptörleri hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak çalışmalar, diğer Mycoplasma türlerinin lipoproteinlerinin, örneğin MALP-2 ve FSL-1 TLR-2 reseptörleri tarafından tanındığını göstermektedir ve tavuk makrofajlarının TLR-2 benzeri reseptörlere sahip olduğu belirtilmelidir (tanıma lipoproteinleri). Tavuk makrofajlarının TLR-2-benzeri reseptörleri vasıtasıyla MSPB ve tMSPB olarak tanımlandıkları görülmektedir (Iqbal ve ark 2005).

1.7.Sağaltım

Mikoplazmalar hücre duvarından ötürü penisilin gibi antibiyotiklere dayanıklıdır; fakat tetrasiklinlere (oksitetrasiklin, klortetrasiklin), makrolid grubu antibiyotiklere (eritromisin, tilozin, spiramisin, linkomisin), kinolonlara (enrofloksasin, danofloksasin) duyarlıdır. Bu antibiyotikler içme suyu ve gıdayla verilebildiği gibi, yumurtaların antibiyotiklere batırılması şeklinde de uygulanabilir. Ancak alınacak sonuçlar, hayvanların yaşına ve sürünün mikoplazma ile beraber seyreden infeksiyonların durumuna göre değişmektedir (Nascimento ER. 1999).

Tiamulin ve enrofloksasin solunum sisteminin mukozal membranlarında ve genitouriner yollarda yüksek oranda biriken ilaçlar olduğundan sıklıkla tercih edilirler Bu antibiyotikler hazırlanma şekillerine göre, içme suyu, yem ve yumurta enjeksiyonu yöntemleri ile uygulanabilir. Kümeslerde hastalığa neden olan etkenlerin duyarlı olduğu antibiyotiklerin seçilmesi, tedavi dozunda uygulanması ve yeterli süreyle verilmesi önem taşır. Değerli grandparent damızlıklara, *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* ile mücadelede, klinik belirtilerin başlangıcında inokulasyon yolu ile antibiyotiklerin verilmesi etkili bir yöntem olabilir. Antibiyotiklerin gıda ve içme suyu ile 5 gün süreli verilmesi sonunda, infeksiyon ve yumurta ile bulaşma oranı oldukça azalmaktadır. Ancak bu uygulama

tamamen 'infeksiyondan ari' bir sürü elde etmek için yeterli değildir. Yumurtaların antibiyotiklerle muamelesi için iki yöntem kullanılır; ilki embriyolu yumurtaların inkübasyonunda, 8-11. günlerinde hava boşluğuna antibiyotiklerin injekte edilmesidir. Bu dönemde, hava kesesinin altında gelişmiş olan kan damarlarından dolayı, antibiyotik hızlı bir şekilde absorbe olarak embriyo ve yumurta sarısına ulaşır. Bir diğer yöntem ise; yumurtaları antibiyotik solusyonları içine batırmaktır. Bu işlemde iki şekilde yapılır; yumurtalar ya 37 °C'de 2-4 saat tutularak bir gün ön ısıtma işleminden geçirilir ve 15-20 dakika 5-10 °C'deki antibiyotik solusyonunda bekletilir. Bu uygulamada, oluşan negatif basınçla az miktarda antibiyotik solusyonu yumurtalara girer, ya da yumurtalar antibiyotik solusyonuna batırılarak, bir vakum uygulaması yapılır ve böylece antibiyotiğin yumurtaya girişi sağlanmış olur. Yumurtaya injeksiyona oranla bu yöntemlerin uygulanması kolay olmasına rağmen, yumurta kabuğunun geçirgenliğinin az olması nedeniyle, yeterli miktarda antibiyotik geçişini sağlamazlar (Akan M., İzgür M. 2002).

2006 yılında; Fransa'da yumurtacı hayvanlarda yapılan epidemiyolojik çalışma; yumurtacı sürülerinde *M. synoviae* infeksiyonun yüksek yaygınlığını doğrulanmıştır. İnfeksiyonun çoklu-yaş çiftliklerinde görülme sıklığı daha fazladır. İnfekte sürülerle, infekte olmayan sürüler karşılaştırıldığında yumurta üretimi düşerken, mortalite yükselir, fakat var olan farklılık istatistiksel bir değer arz etmemektedir. İnfekte sürülerden izole edilen klonların genomik profilleri oldukça homojendir, bu da bulaşmanın rotasının anlaşılmasını kolaylaştıracak bir özelliktir. Tüm izolatlar tetrasiklinler, makrolidler (eritromisin hariç) ve fluorokinolonlara duyarlıdır (Fabienne Dufour-Gesbert ve ark 2006).

1.8. Aşılama

Biyogüvenlik önlemleri ile kanatlı sürülerinde mycoplasma infeksiyonunun engellenmesinde başarısız olduğu durumlarda aşılama; *M. gallisepticum* ve *M. synoviae*'nin kontrolünde bir seçenektir. Yumurta veriminde azalmalara ve solunum infeksiyonlarına karşı korumak için ticari yumurtacılara, yine solunum infeksiyonlarına karşı korumak için broylere ve yeni nesillere infeksiyonun bulaşmasını azaltmak ve elimine etmek amacıyla damızlıklara *M. gallisepticum* aşıları yapılabilir. Cansız aşılar (bakterinler) ve canlı attenüe aşılar kanatlı sektöründe kronik solunum yolu hastalığına (CRD) neden olan *M. gallisepticum*'un kontrolünde ticari olarak etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Whithear 1996). Bununla birlikte, lezyonların şiddeti ve yumurta

verimindeki kayıp azaldığında solunum sistemini, etkenin kolonizasyonundan veya heterolog değişimlerin şekillenmesinden tam anlamı ile koruyamazlar (Whithear 1996).

İnaktif aşular, genellikle yağ emülsiyon bir adjuvan içerirler ve subkutan veya intramuskuler injeksiyon şeklinde uygulanırlar ve temiz sürülerde, canlı mikoplazma etkenlerinin girişine sebep olmadığı için önemlidir. Ayrıca bu aşular, solunum sistemi virusları (NewCastle ve IB virus) veya *E. coli* ile sinerjetik etki göstermezler, dolayısıyla, bu infeksiyonların seyrettiği kümeslerde rahatlıkla kullanılabilir. Ancak, bu aşuların immunojeniteleri düşüktür. Bu aşular infeksiyon riski olmaması ve MG tespitini etkilememesi bakımından tercih edilirler (Whithear KG. 1996).

Son günlerde, canlı attenüe aşular cansız aşuların yerine geçmektedir ve bu aşular 3 suştan köken alır, F-suşu, ts-11 ve 6/85. Bu aşular ticari olarak üretilmekte olup *M. gallisepticum* hastalığının bulaşması üzerine yüksek oranda etkili olabilmektedir, bununla beraber immun korumayı sağlama mekanizmaları hala bilinmemektedir. Ticari *M. gallisepticum* aşuları genellikle damızlık sürülerinde kullanılmasına rağmen yumurtacı sürülerde de kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Canlı MG aşuları, yumurta kayıplarını etkili bir şekilde azaltmada kullanılırlar Mevcut MG aşularının dezavantajı doğal infekte sürü ile aşılları doğru olarak tespit eden bir serolojik testin olmamasıdır (R.A.J. Nicholas ve ark 2009).

Aşılama sonrasında humoral immun yanıtın süresi kısadır ve bu nedenle immun yanıtın oluşumunda etkin bir rol oynamaz. Bununla birlikte, Feberwee ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı deneysel çalışma aşılamının *M. gallisepticum*'un yayılımını ve bulaşımını engellemediğini rapor etmiştir. Canlı aşular, kümese hastalığın girmesinde tehlikelidir. Aşılamada kullanılan F suşu, hindiler için virulenttir. Bu nedenle, bu aşuların kullanımı yakındaki hindi sürüleri için tehlike arz eder. Ayrıca, aşılanmış kanatlılar, mikoorganizmanın taşınmasına neden olur. F suşu içme suyunda veya aerosol olarak uygulanır. Bu suş; yumurta verimindeki düşüşü azaltmanın yanı sıra farklı yaş gruplarında hayvanların bulunduğu çiftliklerde endemik suşların yayılımını da engeller. Aşı suşu solunum sistemi virusları ve *E. coli* ile sinerjetik etki gösterebilir. Ancak, canlı aşular invaziv *M. gallisepticum* suşlarına karşı koruma sağlar ve solunum kanalında non-patojenik bir *M. gallisepticum* suşunun (Örneğin; F suşu) bulunması, lokal immuniteyi uyararak, patojenik suşların dereceli olarak elimine edilmesinde yardımcı olur.

Canlı aşılardan 'F' şusu ile hazırlanmış aşilar en virulant türlerdir. Son yıllarda ts-11 ve 6-85 gibi daha az virulant aşilar geliştirilmiştir. Ts-11 *M. gallisepticum*'un Avustralya suşundan geliştirilmiş ısıya duyarlı bir mutanttır. Ts-11, F suşuna kıyasla; daha düşük bir koruma sağlar, ancak aşılama dozuna bağlı olarak uzun süreli immunitenin oluşturulmasında etkin bir aşıdır. Bu suş, göz damlası şeklinde uygulanır, tavuklarda değişken antikor yanıt şekillenmesine rağmen uzun süre devam eden bir uyarım şekillenir. ts-11 suşu respiratorik virus aşiları ile kombine edilerek güvenle kullanılabilir. 6/85 suşu ise modifiye edilmiş bir saha suşudur. Ancak bu aşilar yumurtacı tavuklar için uygundur. 6/85 suşu F suşu ile karşılaştırıldığında hem daha zayıf bir koruyucu immun yanıt oluşturur hem de daha düşük virulens ve infektiviteye sahiptir. Bu suş aerosol yolla uygulanır, aşılu kuşlarda etkisinin uzun sürmediği ve belirgin bir sistemik antikor yanıtı uyarmakta başarısız olduğu düşünülmektedir (Whithear KG. 1996).

Papazisi ve arkadaşları 2002 yılında aşağıdaki üç membran proteinine sahip olan Rhigh suşunun pasajlanmasına dayanan yeni bir attenué suş geliştirmiştir; hücrebağlayan protein GapA, hücrebağlayan ile ilişkili molekül CrmA ve ABC taşıma sisteminin bileşeni HatA. Bu suşun, GT5, hücrelere bağlı kalması imkansızdır, bu nedenle avirülettir, ancak patojenik Rlow suşu ile tavuklarda oluşan bağışıklığın koruyucu düzeyde olduğu saptanmıştır. Aşılanmış tavuklarda; serum IgG düzeyleri yükselir, IgA'nın düşük mukozal konsantrasyonları tracheal lezyonların şiddetini ve etkenin kolonizasyonunu azaltmaktadır (Papazisi ve ark 2002). Tavukların GT5 aşılması ile korunması B, CD4+ve CD8+ hücre infiltrasyon sayılarının indirgenmesi eşliğinde gerçekleşmiştir, kontrol yöntemleri ile karşılaştırıldığında da *M. gallisepticum* infeksiyonunun neden olduğu ilerleyen lenfositik inflamator yanıtta azalma dikkati çekmektedir. GT5-aşılı tavuklarda; mycoplasma spesifik antikor oluşturan hücrelerin sayısı bağışıklığın oluşmasından hemen 1 gün sonra artışa geçer (Javed ve ark 2005). Bu da şu sonucu doğurmaktadır ki; GT5 aşılalarının neden olduğu yüksek tracheal IgG yanıtı *M. gallisepticum*'un kolonizasyonunun blokasyonundan sorumludur, böylece organizma hızla eradike edilir (Javed ve ark 2005).

Isıya duyarlı bir *M. synoviae* şusu olan MS-H'nun, (Vaxsafe MS; Bioproperties, Glenorie, Avusturalya) tavuklarda güvenilirliği ve etkinliği incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Bu suş; kimyasal mutasyonlar ile üretilmiştir ve in vivo pasajlandığı zamanlarda bile virulensini geri kazanmamıştır. Aşı uygulamasından sonra hiçbir lezyon görülmemiştir ve aşı lateral bulaşmaya neden olabilmektedir. Aşının etkinlik çalışmaları

sınırlı olmasına rağmen, şuan dünyada pek çok ülkede kullanılmaktadır. Jones ve arkadaşları (2006) aşının immunité koruma süresinin 40 haftadan az olduğunu bildirmiştir. Bu gibi durumlarda, MS-H, virulansını geri kazanmadan ısı-duyarlı fenotipini yitirdiğinden, suşun attenüasyonu sadece ısı duyarlılığına bağılı değildir. MS-H canlı aşısı çoğı kez ts-11 suşu ile birlikte kullanılmaktadır (Noormohammadi ve ark 2003).

Pek çok attenüé aşının attenüasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Virulans faktörü giderilmiş olarak bilinen Knockout mutant suşların kullanımının aşılarn yararlılığının gelişiminde etkin olabileceğı düşünölmektedir. Açıkça böyle bir yaklaşıma güvenmek sadece virülens faktörlerinin identifikasyonu ile mümkün değildir ancak spesifik delesyon mutantlarının üretim metodlarının güvenilirliğinin geliştirilmesi, bu aşılarn istikrarlı ve in vivo ortamlarda virülensine yeniden kavuşma konusunda kabiliyetsiz kılacaktır (R.A.J. Nicholas ve ark 2009).

Ülkemizde ruhsatlı olmayan canlı aşılarn, Connecticut F ve ısı mutant 6/85 ve ts-11 suşlarından hazırlanmaktadır (Akan M. 2008).

1.9. Gen Çalışmaları

Mikoplazmalar kendini kopyalayabilen en küçük organizmalar olarak bilinirler. Bu durum mikoplazmaların genom boyutlarından ve hücre duvarından yoksun olmalarından kaynaklıdır. Tüm mikoplazmalar parazittir ve doğal konakları dışında uzun süre hayatta kalmaları olanaksızdır. Konakları ile mikoplazmalar arasındaki yakın ilişkinin membran proteinleri kaynaklı olduğu net bir şekilde belirlenmiştir, bu proteinlerin bazıları, konak hücreye bağlanmadan sorumludur ve konak immün yanıtının en önemli hedefidirler. Bazı mikoplazma türlerinde, değışken farklı membran proteinleri belirlenmiştir. bu proteinlerin konak immün yanıtından kaçışta bir rol oynadığı hipotezi mevcuttur (Wise 1993).

Yüzey proteinlerinin diğér mikoplazmalarda belirlenmiş rolleri olan immunité ve patogenezin yanı sıra bu antijenler adhezyon gibi bazı olaylarda önemli bir göreve sahip olabilecekleri düşünölmektedir (Forsyth ve ark 1992). *M. synoviae* hücrelerinin eritrositlere ve tavuk embriyo hücrelerine (Aldridge 1975) bağlanma kapasitesi kanıtlanmış ve tüm kanıtlar *M. synoviae* WVU-1853 farklı klonlarının kolonilerinin eritrositleri hemadsorpsiyonu ve hemaglutinin aktivitesi arasında direk bir korelasyon olduğuna işaret etmektedir. Buna ilaveten, *M. synoviae* suşlarının hamadsorbsiyon ve hemaglutinasyondaki

klonal varyasyon hem in vitro hem de pasaj sonrası in vivo olarak rapor edilmiştir (Rhoades 1985).

Mycoplasma synoviae, 45 ve 50kDa boyutlarında iki önemli membran antijenine sahiptir, MSPA ve MSPB. MSPA bir hemaglutininidir (Noormohammadi ve ark 1997). Bu antijenler; reserved-faz kromatografi yöntemi ile belirlenirler. Bu antijenlerin her ikisi de vlhA (variable lipoprotein ve hemaglutinin) adlı tek bir gen tarafından kodlanmaktadır ve muhtemelen bu iki antijen (MSPB- amino terminal fragman, MSPA- karbonil terminal fragman) gende meydana gelen post-transkripsiyonel ayrılma sonucu şekillenmiştir. Ayrılmanın 344 amino asit rezidüsünden hemen sonra meydana geldiği tespit edilmiştir (Noormohammadi ve ark 2000). Antijenleri kodlayan mesajın boyutu, transkripsiyon başlama bölgesinden (Noormohammadi ve ark 2000), tahmin edilen bitiş bölgesine denk gelen vlhA geninin transkripsiyon uzunluğuna karşılık gelmektedir (stem loop). Bu nedenle; *M. gallisepticum*'da olduğu gibi, *M. synoviae*'da da vlhA gen transkripsiyonu monosistroniktir. MSPA ve MSPB; kırmızı kan hücrelerini adsorbe edebilme kapasiteleri ve tam uzunlukları bakımından birbirinden farklılık gösteren vlhA gen ürünleridir. Bu iki klon arasında, vlhA transkript boyutları ve miktarları bakımından önemli bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır. Bunlara ek olarak, 25-30 kDa boyutlarında bir başka membran proteini MSPC, tanımlanmıştır ve bu protein antijenik olarak MSPB ile yakın ilişkili bulunmuştur ve bu proteinin MSPB proteininin kesik formu olabileceği düşünülmektedir (Noormohammadi ve ark 1997).

MSPA ve MSPB'nin her ikisinde yüzey bağlanma proteinleridir ve yüksek sıklıkla antijenik varyasyon gösterirler, ancak sadece MSPA eritrositler için bağlayıcı görev üstlenmektedir Bazı *M. synoviae* suşlarının bölüm analizleri MSPA'nın MSPB'den antijenik olarak daha fazla çeşitlilik gösterdiğine işaret eder (Noormohammadi ve ark 1997-1998). Hemaglutininler, avian mikoplazmaların virulansının belirlenmesinde ve kolonizasyonda görev alan en önemli yüzey proteinleri sayılmaktadır (Bencina 2002).

Bazı diğer mikoplazma türlerinde olduğu gibi major yüzey antijenlerinin antijenik varyantlarının *M. synoviae* infeksiyonlarının kronik seyrine önemli derecede katkıda buldukları düşünülmektedir (Behrens ve ark 1994).

Antijenleri kodlayan; vlhA geni geniş bir multigen ailenin üyesidir. Ancak sadece bir tek vlhA geni herhangi tek bir hücreyi ifade etmektedir, diğer vlhA gen veya

fragmanları transkripsiyonel olarak stabildir ve pseudogenler; gereksinim duyulan transkripsiyonel elementler olarak değerlendirilmiştir (Noormohammadi ve ark 2000). *M. synoviae* vlhA geninin bölümlerinde sıklıkla varyasyon görülebildiğine işaret etmektedir (Noormohammadi ve ark 1997-2000). *M. synoviae* vlhA proteininin antijenik değişkenliği temelinde yatan moleküler esas olan immunodominant yüzey hemagglutinineri, belirlenmiş vlhA gen bölgeleri ile vlhA pseudogene kopyalarını kaynaştıran bölge spesifik rekombinasyonlara dayandırılmıştır (Noormohammadi ve ark 2000). Bir genin yenilenme mekanizması olarak bilinen gen dönüşümü, geniş bir pseudogen rezervuarından yeni bölümlerin kuvvetlenmesi sonucunda bir basit *M. synoviae* suşundan çeşitli variantların üretimine olanak sağlar. Tek tamamlanmış vlhA geni ile çoklu pseudogen kopyaları arasındaki rekombinasyon, yeni vlhA gen varyant oluşumunu netleştirmektedir. *M. synoviae*'da vlhA antijenik varyasyonunun kontrolünün pseudogen/kodlama bölüm repertuarlarının kullanıldığı multiple gen dönüşüm olayları ile gerçekleştiği görülmektedir. Bu dönüşüm hemagglutinini kodlayan bölgenin varyasyonu için ciddi bir potansiyel oluşturmaktadır (Noormohammadi ve ark 2000).

M. synoviae WVU 1853 suşunda bu güne kadar 3 VlhA gen varyantı (vlhA1, vlhA4, and vlhA5) tespit edilmiştir (Noormohammadi ve ark 2000). Bu genler eşit büyüklüktedir ve rekombinasyon olayını işaret eden vlhA'nın orta kısmında 400-bp DNA kısmında geniş bir çeşitlilik gösterir, bölgesel varyasyon göstermesine rağmen, uzunluğunu ve kombinasyonunu koruma eğilimindedir. Tüm bunlara rağmen, çalışmadan, vlhA gen değişiklik potansiyelinin dikkat çekici düzeyde olduğu ve vlhA geninin hiçbir özelliğini kaybetmeksizin farklılaşabildiği şeklinde sonucu çıkarılmıştır (Awater Bejaoui Khiari ve ark 2010).

M. gallisepticum ve *M. imitans*'ın hemagglutinineri vlhA ile ilişkili multigen aileleri tarafından kodlanırlar (Markham ve ark 1993). *M. gallisepticum* ile *M. synoviae* arasında vlhA geninde önemli farklılıklar mevcuttur. Bu türlerde, vlhA genleri 5 farklı genomik bölümde lokalize olmuştur ve her bir genin, aktarımda etkili bir rolü olduğu görülmektedir (Markham ve ark 1993).

VlhA geni homoloğu, sadece diğer iki mikoplazma türünde saptanmıştır; *M. gallisepticum* ve *M. imitans*, ve her ikisinde kanatlı patojenidir (Markham ve ark 1999). *M.gallisepticum*'un genomik diziliminin son zamanlardaki tayini, vlhA geninin beş farklı genomik bölüme yerleşmiş olduğunu göstermektedir, *M. synoviae* WVU 1853 suşunun

genom bölümleri saptanmıştır ve *M. gallisepticum* ile karşılaştırmalı analizleri sonucunda iki etkenin; iki farklı filogenetik gruba ait olduğu ve vlhA genleri antijenik çeşitliliğini oluşturan mekanizmanında tamamen farklı olmasına rağmen iki cins arasında horizontal gen transferi olduğu kanıtlanmıştır. Hemaglutini kodlayan genler arasında horizontal gen transferi daha fazladır (Sirand-Pugnet ve ark 2007).

M. synoviae WVU 1853 suşunun hemaglutinasyon bölgesi önemli bir değişim göstermiş ve boyca önemli ölçüde indirgenmiş, daha önceden belirlenmiş vlhA genleri(vlhA1, vlhA4 ve vlhA5) ile yakın ilişkili immunodominant bir vlhA varyantı (MS2/28.1 olarak isimlendirilmiş) olduğunu göstermiştir (Noormohammed ve ark 2000).

M. synoviae genomik haritası tam olarak çizilememiştir. Ancak, *M. synoviae*'nın genomunun diğer mikoplazma türlerinden daha küçük olduğu kanıtlanmıştır. Bu tahmin, DNA genomunun SmaI tarafından parçalanması ile oluşan, 344-3 den 19-8kb'a çeşitlilik gösteren beş fragmana dayanmaktadır (Joanne L. ve ark 2005).

Genomik dizilimin önemli öğelerinden olan; tufA, recA ve rrnA genleri, *M. synoviae* genomunun 173kb bölümünde sınırlandırılmıştır (Chambaud ve ark 2001).

İki pseudogen fragmanı, ORFs 3 ve 6 vlhA pseudogen lokuslarının belirlenmesinde bir prob görevi üstlenmiştir. Bu problemler, genomda yerleşmiş tüm vlhA lokuslarını belirlemektedir. Bu probun *M. synoviae* genomunun yaklaşık 50 kb lık kısmını bağlayabileceğini göstermektedir (Noormohammadi ve ark 1998).

M. synoviae genomunun yaklaşık 114 kb. bölümünde bulunan hem belirlenmiş vlhA genleri hem de vlhA pseudogen ailesi, *M. gallisepticum* vlhA multigen (pÖGA) ailesinin dizilimine karşıtlığı ile belirlenmiştir (Papazisi ve ark 2003). *M. gallisepticum*, genomu boyunca beş farklı lokusa yayılmış genlerin çoklu kopyalarına sahiptir. Yayılımdaki farklılık, *M. synoviae*'nın hemaglutinin genindeki genetik varyasyonda farklı metodlar kullanıldığını ifade etmektedir. *M. gallisepticum*'un belirlenmesi, vlhA genlerinin kontrolü bu genler arasında yakınlık olması şartını gerektirmezken, bölge-spesifik rekombinasyona bağlı varyasyonun şekillendiği *M. synoviae*'da tüm gen ailesinin tek bir genomik bölgede hatta tek bir lokusta yerleşmiş olması gerekmektedir. vlhA gen lokusunu karakterize edebilmek için, DNA fragmanları genomik DNA bilgileri ve nukleotid dizilimleri saptanmış üç farklı *M. synoviae* WVU 1853T'dan klonlanmıştır. Sonuç olarak;

nükleotid bölümleri, belirlenmiş *vlhA* geni için bir transkripsiyonal bitiş işareti olarak tanımlanmış ve genlerin, belirlenmiş *vlhA* geninde aşağı doğru yerleşik bulunduğu saptanmıştır, ve belirlenmiş *vlhA* genlerinin (843 baz bölümü) yukarı doğru tekrarlarının ardı ardına dizilimleri *vlhA* pseudogenlerini meydana getirmektedir. Her iki *vlhA* geninin ve *vlhA* pseudogenlerinin kromozomunun aynı 160kbp bölümü ile sınırlanmış olduğu saptanmıştır (Allen ve ark 2005).

M. synoviae'nin genomik haritasının derivasyonu ve bu haritada *vlhA* lokusunun yerleşimi, organizmanın genetik varyasyonuna karışan mekanizmanın anlaşılmasında önemli bir adımdır. Bu tür çalışmalar ile, *vlhA* geninin genetik manipülasyonu yolu ile *M. synoviae* rekombinant aşularının geliştirilmesine ışık tutulacaktır (Joanne L. ve ark 2005).

1.10. Koruma ve Kontrol

Mikoplazmaların kontrolünde dünyaca önerilen sistemlerde ortak hedef *grand parent stock*'larda eradike edip, *parent stock* seviyesinde ise iyi bir biyogüvenlik sistemi ile hastalıktan ari yapıyı korumaya çalışmaktır (Anonim 1990, Anonim 1996, Gökçelik 2008). Kanatlılarda *M. gallisepticum*, *M. synoviae* ve hindilerde *M. melagridis*'in neden olduğu ve vertikal yolla bulaşan infeksiyonların önüne geçmenin başlangıç noktası damızlık sürüleri bu enfeksiyondan uzak tutmaktır. Hastalıkta en önemli kayıp mikoplazma ile infekte damızlıklardan elde edilen civcivlerde performans kaybıdır. Özellikle de vertikal bulaşmanın şekillenmesi ve damızlıkların bu infeksiyonlar yönünden ari olması gerektiği için bu iki infeksiyon etkeninin hızlı, güvenilir bir testle teşhisi neticesinde acil koruma ve kontrol önlemlerinin alınması şarttır (Akan ve ark 2008).

Broyler ve yumurtacı işletmelerde mikoplazma izleme programının oluşturulması, bu hastalığın vermiş olduğu performans kayıplarını ve ilave tedavi masraflarını azaltmada oldukça etkindir. Hastalığın tedavisinde kullanılan antibiyotikler olmakla beraber sürüdeki verim düşüklüğü ve tedavi masrafları nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olurlar. Ülkemizde koruma ve kontrol amacıyla; 1989 yılından beri "Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerinin Sağlık ve Kontrol Yönetmeliği" yürürlüğe girmiş son olarak 2007 yılında yönetmelik güncellenmiştir (Anonim 2007a, Anonim 2007b). Bu yönetmelik kapsamında damızlık sürülerin kontrolleri 16 haftalıktan itibaren başlar ve en az yılda iki kez

kontrolleri devam eder. Ülkemizde mikoplazma yönünden yapılan kontrollerde çabuk lam aglutinasyon, serum plak dilusyon, tüp aglutinasyon testi gibi tarama testleri ile taranır pozitif bulunan sürülerde sonuç nispeten spesifitesi daha yüksek ELISA ve Hemaglutinasyon inhibisyon (HI) gibi ikinci bir serolojik testle doğrulanır. Mikoplazma antikoları yönünden pozitif bulunan sürülerde pozitif ya da şüpheli bulguların PCR ile doğrulanması gerekir. Mikoplazma infeksiyonlarının varlığının belirlendiği sürülerde ise tedavi uygulanması ile performans kaybı önlenmiş olacaktır (Anonim 2007a, Anonim 2007b).

Çalışmamızın amacı; tavuk ve hindilerin intensif yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan bir patojen olan *Mycoplasma synoviae*'nin İzmir ili ilçelerindeki varlığının ispat edilmesidir. İnfeksiyonun yayılımının önlenmesi için hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaç; geleneksel olarak mycoplasma kültürleri yoluyla veya antikoların serolojik izlenmesi yoluyla yapılmıştır. Serolojik tarama yöntemi yaygın bir şekilde halen kullanılmaktadır ancak bu yöntem subklinik *M. synoviae* infeksiyonlarının teşhisinde yetersiz kalmaktadır ve sadece serokonversiyon teşhisi kapsayan monitoring programları yetersiz kalabilmektedir. (Ewing ve ark, 1998; Kleven ve ark, 2001). Etkenin kültür den teşhisi ise pahalı ve zaman alıcı olabilmesinin yanı sıra yetersiz kalabilmektedir (Ewing ve ark 1998). Bu nedenlerle patojen kanatlı mycoplasma türleri günümüzde PCR tabanlı testler ile belirlenmektedir.

Çalışmamızda; İzmir ili farklı ilçelerindeki farklı yaşta yumurtacı ve broyler kümeslerinden alınan tracheal örneklerde; *M. synoviae*'nin varlığı vlhA tabanlı PCR metodu ile belirlenmeye çalışılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırma için 2012 Kasım-Aralık aylarını kapsayan sürede, İzmir ili ilçelerinde broyler ve yumurtacı tavuklardan tekniğine uygun şekilde alınan 375 adet tracheal svap Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına % 10 CO₂'li ortam sağlanarak getirilmiştir. Araştırma materyalini oluşturan tracheal svapların; örneklenecek kümes büyüklüklerinin % 0,25'i hesaplanarak; 150 (% 40) adedi broyler kümeslerinden 225 (% 60) adedi ise ticari yumurtacı kümeslerden alınmıştır. Örneklenen kümeslerdeki kanatlıların yaşı, kümes büyüklüğü, örnek alınan ilçe ve örnek sayısı Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Örnekleme yapılan kümeslerde üretim şekli, alındığı ilçe, kümes büyüklüğü, yaşı ve alınan örnek sayısı

Örnekleme Yapılan Kanatlıların Yaşları (Hafta)	Örneklenen Kanatlı Üretim Şekli (Broyler/Yumurtacı)	Örneklemenin Yapıldığı İlçe	Örneklenen Kümes Büyüklüğü (Adet)	Alınan Örnek Sayısı (Adet)
75. hafta	Yumurtacı	Kemalpaşa	30.000	75
62. hafta	Yumurtacı	Foça	30.000	75
83. hafta	Yumurtacı	Menemen	30.000	75
38 günlük	Broyler	Urla	30.000	75
44 günlük	Broyler	Aliğa	30.000	75
TOPLAM			150.000	375

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

2.1.2.1. Transport Besiyeri–*M. synoviae* Broth

Formül	gm/litre
Bakteriyolojik Pepton	10.0
Lab-Lemco' tozu	10.0
Sodyum Klorid	5.0
Mineral Katkı	0.5
25°C'de pH 7.8 ± 0.2	

1 litre distile suda 25.5 g tozu çözdürüldü. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 50°C'ye kadar soğutulan karışıma Mycoplasma Supplement SR0059 eklendi. Hazırlanan broth deney tüplerine 5'er ml. olacak şekilde eklendi.

2.1.2.2. İzolasyon Besiyeri–*M. synoviae* Agar

Formül	gm/litre
Bakteriyolojik Pepton	10.0
Lab-Lemco tozu	10.0
Sodyum Klorid	5.0
Mineral Katkı	0.5
Agar	10.0
25°C'de pH 7.8 ± 0.2	

1 litre distile suda 25.5 g tozu çözdürüldü. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 50°C'ye kadar soğutulan karışıma Mycoplasma Supplement SR0059 eklendi. Hazırlanan agar, 20'şer ml. petrilere döküldü.

2.1.3. PCR

2.1.3.1. Kullanılan cihazlar

PCR 25 örnek kapasiteli Eppendorf Master Cycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2. MgCl₂, Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer , dNTP Mix

25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (+KCL, - MgCl₂), 10mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas®) kullanıldı.

2.1.3.3. Primerler

Mycoplasma synoviae'nin *identifikasyonu* için *VlhAF* *VlhAR* genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primerler

Primer	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Referans
<i>VlhAF</i>	5'-ATTAGCAGCTAGTGCAGTGGCC-3'	Bencina ve ark. 2001
<i>VlhAR2</i>	5'-AGTAACCGATCCGCTTAATGC-3'	Hammond ve ark.-2009

2.1.4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi VilberLourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)..... 1 g
TBE (0,5X)..... 50 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk. kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutuldu. Soğuyan karışıma 3 µl % 1'lik Ethidium Bromür ilave edildi ve karıştırıldı. Halen sıvı halde olan karışım, yükleme kuyucuklarını oluşturacak taraklar yerleştirildikten sonra jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü, 25-30 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2.1.4.2. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) kullanıldı.

2.1.4.3. Etidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1' lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanan % 2' lik agaroz jelin içerisine 3 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2.1.4.4. Pozitif Kontrol

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çalışmamızda kullanılan *Mycoplasma synoviae* standart suşlarından purifiye edilen pozitif kontrol DNA, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet AKAN'dan temin edilmiştir.

2.1.5. DNA Ekstraksiyon Kiti

DNA ekstraksiyonu amacıyla birçok mikroorganizmadan yüksek kaliteli genomik DNA'nın izolasyonu için dizayn edilmiş genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

Araştırma için 2012 Kasım-Aralık aylarını kapsayan sürede, İzmir ili ilçelerinde broyler ve yumurtacı tavuklardan tekniğine uygun şekilde 375 adet tracheal svap alındı. Alınan tracheal svaplar doğrudan Mycoplasma Broth bulunan tüplere aktarıldı. % 10 CO₂'li ortam sağlanarak 37 °C'de etüve inkubasyona bırakıldı. Alınan örnekler inkubasyon sonrasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirildi.

2.2.2. Mycoplasma synoviae İzolasyonu

Laboratuvara getirilen tracheal svap örneklerinden *Mycoplasma synoviae* etkeninin saf olarak elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için, mycoplasma broth'ta getirilen ve 7 günlük inkubasyon sonrasında Mycoplasma agara ekimleri yapılan tracheal svaplar inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon 37 °C'de 7 gün % 10 CO₂'li ortamda gerçekleştirildi.

İnkubasyon süresince üremeler takip edildi. İnkubasyon süresi sonunda üreme olan besiyerlerinde kör pasajlar yapıldı. Yapılan kör pasajlar 7 günlük inkubasyon sonucunda değerlendirildi.

2.2.3. DNA İzolasyonu

375 adet tracheal svap örneğinden izole edilen *M. synoviae* suşları belirlendi ve DNA ekstraksiyonu aşamasına geçildi. (Hammond ve ark 2009). İzole edilen suşların DNA izolasyonu genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) ile prosedüre uygun olarak yapıldı. Ayrılan DNA'lar PCR çalışmaları yapılana kadar cryo tüplerde -20 °C derin dondurucuda saklandı.

Fermentas® DNA Isolation Kit Prosedürü:

*Bir öze dolusu mikoplazma kültürü 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C'de 5 dk inkübe edildi.

*600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm.de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.

*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C'de bekletildi. 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra % 70'lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

2.2.3.1. PCR

Master Mikslerin Hazırlanışı: Araştırmamızda VlhAF ve VlhAR2 primerleri amplifikasyon için kullanılmıştır. Master miksin hazırlanması aşamasında; her iki primerde 0.5 µM, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl, 1X reaksiyon buffer, 0.5 U Taq DNA polimerase verilen oranlarda kullanılarak toplamda 50 µl hacme ulaşılmıştır (Hammond ve ark 2009). Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. *Mycoplasma synoviae*. için mastermiks hazırlanma oranları (Hammond ve ark 2009)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar (µl)
Taq Buffer 1(+KCl,- MgCl ₂) (10X)	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	5 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Primer 1 (VlhAF)-10pmol	2,5 µl
Primer 2 (VlhAR2)-10pmol	2,5 µl
Taq DNA Polimeraz (5U)	0.2 µl
ddH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır
Template DNA (200 nM)	5 µl
TOPLAM	50 µl

Mastermiksler hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 45'er µl hazırlanılan mastermiksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 5'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. *Mycoplasma synoviae* için hazırlanan mastermikslerin PCR analizlerinde kullanılan ısıl döngü ve süre diyagramı (Hammond ve ark 2009) Çizelge 2.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Hammond ve ark 2009)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	36	94°C	1 dk
Bağlanma		52°C	1 dk
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	2 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

0,2 mL tüplerde oluşturulan 50 µl' lik PCR ürünlerinin her birinden 10 µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x DNA loading dye solusyonu ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, jeldeki uygun kuyucuğa yüklendi. Markerlerin hazırlanması sırasında; 7 µl 6x DNA loading dye solusyonuna 3 µl Generuler 100 bp'den eklenir. Jeldeki ilk kuyucuklara markerlar yerleştirildi.

2.2.3.3. Jelde Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500mA akımda 30 dakika yürütüldü.

2.2.3.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

Değerlendirme aşamasında PCR analizinde; *Mycoplasma synoviae* vlhAF ve vlhAR2 primerleri için 315-327 bp aralığında bant oluşumları arandı.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

Araştırma için alınan 375 adet tracheal svap örnekleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilmiştir. Gelen örneklerin inkubasyon süresi sonrasında agara ekimleri yapılmış ve inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon periyodu sonunda agarda oluşan mycoplasma pozitif şüpheli kolonilerden kör pasaj yapılmıştır. İnkubasyon periyodu sonrasında *Mycoplasma spp.* pozitif koloniler belirlenmiştir.

Araştırmamızda yumurtacı ve broyler olmak üzere 5 farklı kümeden toplanan 375 adet tracheal svap örneğinde; 48 (% 12,8)'inde *Mycoplasma spp.* izole edilmiştir. Bu izolasyonun tamamı yumurtacı hayvanlardan alınan svaplardan gerçekleşmiştir. Broyler kümeslerinden alınan örneklerde *Mycoplasma spp.* şüpheli herhangi bir üreme şekillenmemiştir. Yumurtacı kümeslerden alınan svap örnekleri (225 adet) arasında yapılan değerlendirmede pozitif sonuç 48 iken yüzdeye vurulduğunda % 21,3 sonucu elde edilmektedir. Elde edilen izolasyon pozitif örnek sayısı ve yüzde oranları Çizelge 3.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Elde edilen izolasyon pozitif örnek sayısı ve yüzdeleri

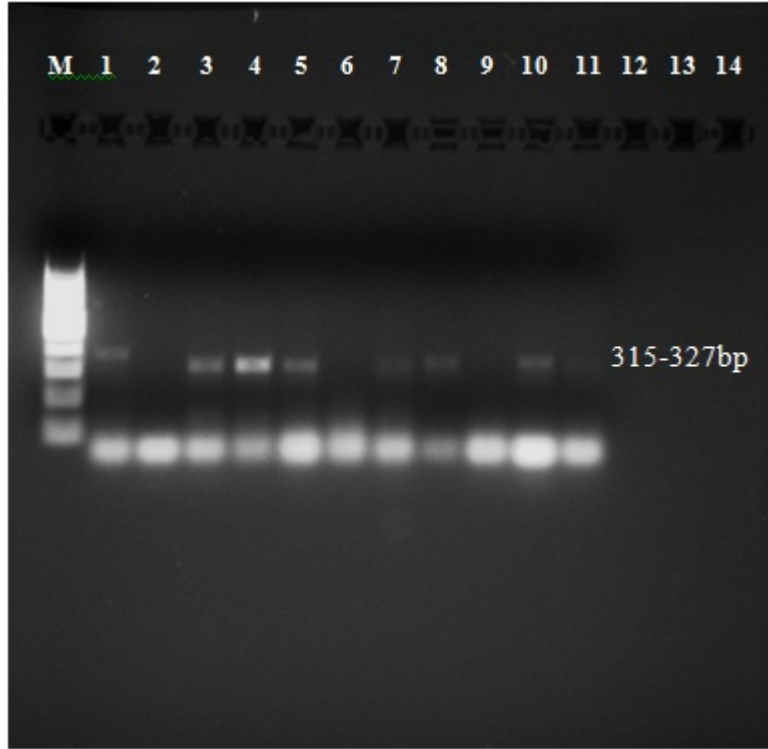
Kümesler	İzolasyon Pozitif Sayısı (adet)	İzolasyon Yüzdeleri (%)
1. Kümes- Yumurtacı	24	32
2. Kümes- Yumurtacı	22	29,3
3. Kümes- Yumurtacı	2	2,7
4. Kümes- Broyler	0	0
5. Kümes- Broyler	0	0
Toplam	48	12,8

3.2. PCR Bulguları

Bu tez çalışması ile kanatlı ve yumurtacı kümeslerde solunum yolu ve eklem infeksiyonlarına sebep olan *M. synoviae* infeksiyonlarının tanısı vlhAF ve vlhAR2 primerleri kullanılarak yapılmıştır. Araştırmamızda farklı üretim şekline sahip (yumurtacı, broyler) 5 farklı kümeisten alınan 375 tracheal svap örneğinden yapılan PCR çalışması sonucunda *M. synoviae* pozitif olarak tanımlanan örnek sayısı toplamda 12'dir. Pozitif sonuçların hepsi yumurtacı hayvan kümeslerinden alınan örneklerden elde edilmiştir. Örnek alınan broyler kümesleri *M. synoviae* yönünden negatif bulunmuştur (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. PCR pozitif örnek sayıları ve yüzdeleri

Kümesler	PCR Pozitif Sayısı (adet)	PCR Pozitif Yüzdesi (%)
<i>1.Kümes- Yumurtacı</i>	1	1.3
<i>2.Kümes- Yumurtacı</i>	5	6,7
<i>3.Kümes- Yumurtacı</i>	6	8
<i>4.Kümes- Broyler</i>	0	0
<i>5.Kümes- Broyler</i>	0	0
Toplam	12	3,2



Şekil 3.1. *Mycoplasma synoviae* PCR pozitif örneklerin (vlhAF ve vlhAR2 primerleri ile yapılan PCR) elektroforez görüntüsü **M**:100 bp DNA ladder, **1**: *Mycoplasma synoviae* pozitif kontrol, **2**: Negatif kontrol **3,4,5,7,8,10,11**. *Mycoplasma synoviae* pozitif örnekler, **6,9**: *Mycoplasma synoviae* negatif örnekler

PCR ile yapılan identifikasyonlarda hedef patojen türlerin kümes bazındaki dağılımları incelendiğinde, 1. Yumurtacı kümeden alınan 75 tracheal svap örneğinin 24'ünde *Mycoplasma spp* izole edilmiştir. Aynı kümeden alınan tüm örnekler uygulanan PCR sonucunda ise 1 adet *Mycoplasma synoviae* identifiye edilmiştir. 75 adet tracheal svabın alındığı 2. yumurtacı kümes örneklerinin identifikasyonu sonucu 22 adet *Mycoplasma spp.* pozitif sonuç elde edilirken, yapılan PCR sonucunda 5 adet *Mycoplasma synoviae* pozitif sonuç elde edilmiştir. Üçüncü yumurtacı kümeden alınan 75 tracheal svap örneğinde identifikasyon sonucu 2 adet *Mycoplasma spp.* pozitif örnek bulunurken, PCR'da 6 adet pozitif sonuç elde edilmiştir. Broyler kümeslerin her ikisinde de hem bakteriyolojik izolasyonda hem de PCR'da pozitif sonuç saptanmayan kümesler, etkenden ari bulunmuştur.

İdentifikasyonda; PCR ile bakteriyolojik izolasyon yöntemleri karşılaştırıldığında ise; 1. Kümeste bakteriyolojik izolasyon sonucu *Mycoplasma spp.* pozitif olan 1 adet örneğin PCR sonucunda da pozitif sonuç verdiği, 2. Kümeste; PCR pozitif sonuç veren 5 adet örneğin ise 3 adedinin *Mycoplasma spp.* pozitif, diğer 2 adedinin ise bakteriyolojik izolasyon sonucu negatif olduğu, 3. Kümeste ise PCR pozitif sonuç veren 6 örneğin, 2

adedinin bakteriyolojik izolasyon sonucu *Mycoplasma spp.* pozitif, 4 adedinin ise bakteriyolojik izolasyon sonucu negatif olduğu saptanmıştır.

4. TARTIŞMA

Mycoplasma synoviae, entansif yetiştiricilikte ekonomik kayıplara neden olan tavuk ve hindilerin bir patojenidir. İnfeksiyon çoğunlukla subklinik üst solunum yolu hastalığı olarak meydana çıkar. Bazen MS infeksiyöz sinovitise neden olabilir. Ayrıca ekonomik açıdan da yumurta üretimini, büyümeyi, ve kuluçka değerlerini düşürmesi bakımından önemli olabilmektedir. Aerosakkulitis ve artrit lezyonları nedeniyle karkas kalite ve miktarını etkilemektedir (Kleven 1997). Avian mikoplazmozisi yumurta aracılığıyla vertikal, hasta veya hassas hayvanlara direkt kontakt yolu ile horizontal olarak bulaşabilmektedir. İndirekt bulaşmada; insanlar, yabani kuşlar, içme suyu, çöpler veya yem materyalleri ile oluşan bulaşma ortamdaki mikoplazma olası sürekliliğini sağlayarak MS salgınlarında önemli bir rol oynar (Marrois C. ve ark 2000).

Tüm dünyada ve Türkiye’de; damızlık sürülerin, mycoplasmosisin vertikal bulaşması ve yarattığı ekonomik kayıp nedeniyle ari olmaları istenir. Ancak özellikle ülkemizde *M. synoviae* etkeni yok sayılarak CRD etkeni *M. gallisepticum* olarak varsayılmaktadır. *M. synoviae*, *M. gallisepticum*’un gölgesinde kalmış ve bu nedenle üzerine çok çalışma yapılmamış epidemiyolojik ve immunolojik olarak gizliliğini korumakta olan bir etken olduğundan çalışmamız *M. synoviae* etkeni üzerine yapılandırılmıştır. Ülkemizde 2007 yılı yayınlanan Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği Uygulama Talimatı içinde damızlıkların *M. synoviae* ve *M. gallisepticum*’dan ari olması gerekliliği ve gerekliliğin devamlılığı için izlenmesi gereken identifikasyon yöntem ve yolları açıklanmıştır.

Mikoplazmaların oldukça zor üreyen mikroorganizmalar olmaları ve pasajlarla birlikte yaklaşık 3-4 hafta gibi uzun bir inkubasyon süresine ihtiyaç duymaları, kanatlı sürülerinde geçirilen diğer infeksiyonlara karşı kullanılan antibiyotiklerin mikoplazma etkenlerinin üremesini baskılaması gibi olumsuzluklar, teşhis konulduğunda sürünün sağaltımını ve etkili koruyucu önlemlerin alınmasını engellenmektedir (Frey ve ark 1968, Esendal 2002). MS tanısında; güvenilir, hızlı diagnosa infeksiyonun yayılmasını engellemek için ihtiyaç duyulmaktadır ve bu antikörlerin serolojik incelenmesi ve mycoplasmanın kültürü ile elde edilebilmektedir. Serolojik yöntemler hala yaygın şekilde kullanılmakta olmasının yanı sıra subklinik *M. synoviae* infeksiyonlarının tanısında ve

sadece serokonversiyon saptama temeline dayalı monitoring programlarında yetersiz kalabilir (Ewing ve ark 1998, Kleven ve ark 2001). Kültür; pahalı yavaş ve etkisizdir. (Ewing ve ark 1998) Bu nedenlerle günümüzde avian mikoplazmozisi rutin teşhisinde PCR tabanlı testler kullanılmaktadır. Bazı PCR'lar 16S rRNA genine dayalı iken (Garcia ve ark 1996, Lauerman ve ark 1993), bazıları kurum içi (Lauerman 1998), bazıları ise ticari üretim kitleridir. *M. synoviae* PCR testleri aynı zamanda vlhA hemaglutinin geni(HA) temeline dayalıdır.(Bencina ve ark 2001, Hong ve ark 2004). Ben Abdelmoumen Mardassi ve arkadaşları (2005) *M. synoviae*'nın tespitinde Dünya çapında *M. synoviae* ile ilgili moleküler yöntemlerle teşhis konusunda yapılan çalışmaların çoğu PCR testlerinin karşılaştırılması şeklindedir.

PCR metodlarının kullanımı üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur (Garcia ve ark 1996, Lauerman ve ark 1993, Lauerman 1998, Bencina ve ark 2001; Hong ve ark 2004, Ben Abdelmoumen Mardassi ve ark 2005, Ramirez ve ark 2006, Jeffery ve ark 2007). Bu çalışmaların dördü hemaglutinini kodlayan vlhA genini hedef almaktadır (Bencina ve ark 2001, Hong ve ark 2004, Ben Abdelmoumen Mardassi ve ark 2005, Jeffery ve ark 2007). Hong ve arkadaşları (2004) RIII bölgesini hedef alarak PRR bölgesi ile bir PCR tanımladılar. Hammond ve arkadaşları (2009) tarafından yürütülen çalışmada; kullanılan vlhAR2 RIII bölgesini içeren korunmuş bölgenin 3' kısmını hedef almaktadır. Bu yeni revers DNA ile bilinen 21 izolata ilaveten 9 adet izolat identifiye edilmiştir. Bu durum diğer 9 izolat ta dahil olmak üzere 22 avian mikoplazma türü ile reaksiyon oluşturmayarak ve çalışmada DNA ekstraksiyonu sırasında 11 svapta hiçbir nonspesifik bant oluşturmayarak ispat etmiştir (Pettersson ve ark 2000). VlhAR2 geninin klinik kullanım duyarlılığı ve spesifitesi yüksektir. Aynı çalışmada; *M. synoviae*'nın teşhisinde kullanılan dört PCR metodu karşılaştırıldığında vlhAF- vlhAR2 tabanlı PCR'ın az miktardaki DNA'nın belirlenmesine olanak vererek, en sfesifiği olduğu saptanmıştır. PCR ve kısmi vlhA gen dizilimi suş identifikasyonunda kullanışlı olabilecektir. Bu konu ile ilgili; Bencina ve arkadaşları (2001) tavuk ve hindilerden elde edilen 30 *M. synoviae* suşunun vlhA geni kısımlarını karşılaştırmış ve 11 farklı vlhA kısmı ortaya koyarken Hong ve arkadaşları (2004) yaptığı çalışmada aynı türlerden elde edilen 43 suşta 14 farklı grup tespit etmiştir. Her iki çalışmada da suşlar çoğunlukla ABD ve Slovenya'dan alınmıştır.

VlhA genini hedefleyen duplex PCR ile *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* etkenlerini; *M. syoviae*'nın tek iplikçik konformasyonu sayesinde birbirinden ayırmışlardır

(Jeffery ve ark 2007). Hammond ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları PCR çalışmaları ile vlhA primer kombinasyonları arasında duyarlılık açısından karşılaştırma yapmışlardır. Bu çalışmalar sırasında; vlhAF–vlhAR1 primer kombinasyonunun kullanımı ile yaptıkları PCR sonucu üç adet *M. synoviae* izolatının (B27/00, B142/02 and B154/02) 621 bp’de beklenen ürünü vermediğini ancak aynı çalışmanın vlhAF-vlhAR2 primer kombinasyonu ile tekrarlandığında tüm örneklerde beklenen ürün oluşumunun gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Amplifikasyon sonucu çıkan ürünün boyutu 315 ve 372bp’dir. VlhAF–vlhAR2 tabanlı PCR sadece *M. synoviae* kalıp ampikonun üretilmesinde ve diğer 22 avian mikoplazma türünün PCR ürünlerini zayıflatmada oldukça spesifikdir.

Son yıllarda yapılan PCR çalışmalarının çoğu ise vlhA tabanlı PCR çalışmaları olup, genin hangi kısmının temel alınmasının daha iyi sonuç vereceği üzerinedir. Bu nedenlerle çalışmamızda; *M. synoviae*’nın moleküler yöntemlerle identifikasyonunda Hammond’un çalışmasındaki primer kombinasyonu (vlhAF-vlhAR2) kullanılmıştır.

Dünya çağında yapılan çalışmaların bazıları incelendiğinde; Kaliforniya’da serum ve yumurta sarısı örnekleri test edilmiş ve MG prevalansı güney Kaliforniya’da % 73 merkez Kaliforniya’da % 3, MS prevalansı ise güney Kaliforniya’da % 91 merkez Kaliforniyada % 32 olarak belirlenmiştir (Mohammed ve ark 1985). Bu çalışmada da görüldüğü gibi bölgelerde MS yoğunluğu MG yoğunluğundan fazla olabilmektedir.

Marois ve arkadaşları (2000) deneysel ve doğal infekte kanatlıların yem, içme suyu, tüy ve kümes tozlarından aldıkları svap örneklerinden bakteriyoloji ve PCR ile yaptıkları *M. synoviae* taramasında; inceledikleri 96 adet deneysel infekte kanatlılarda bakteriyoloji ile 10/96, PCR ile 46/96 *M. synoviae* pozitiflik tespit ederken, doğal infekte kanatlılarda bakteriyoloji ve PCR ile sırasıyla, 7/28 ve 17/28 ranında *M. synoviae* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen diğer önemli kritik nokta ise kümeden küme bulaşmada en uzun mesafeyi katedebilen etkenin *M. synoviae* olduğudur. Bu yayılımda; hava, insanlar, rodent, böcek vb. vektörler önemli rol oynamaktadır. MS infekte çevresel örneklerin çeşitliliği *M. synoviae*’nın yüksek yayılım kapasitesini kanıtlamaktadır. Heidelberg ve arkadaşları (1997) bakteriyoloji ile düşük pozitifitenin tespit edilmesini *Mycoplasma spp.*’nin nazlı üreyen mikroorganizma olmasına veya svap örneklerinde canlı fakat kültürleri yapılamayan bir durumda bulunmalarına dayandırmışlardır. Ayrıca kanatlı sürülerinde geçirilen diğer nfeksiyonlara karşı kullanılan antibiyotiklerin mikoplazma

etkenlerinin üremesini baskılaması, etken izolasyonunu engelleyen faktörlerden biridir (Frey ve ark 1968).

Çalışmamızda da yukarıdaki incelemeler ile paralel olarak PCR metodunda pozitif sonuç veren bazı örneklerden yapılan kültür incelemelerinde pozitif sonuç elde edilmediği gözlenmiştir. 1. Kümeste bakteriyolojik izolasyon sonucu *Mycoplasma spp.* pozitif olan 1 adet örneğin PCR sonucunda da pozitif sonuç verdiği, 2. Kümeste; PCR pozitif sonuç veren 5 adet örneğin ise 3 adedinin *Mycoplasma spp.* pozitif, diğer 2 adedinin ise bakteriyolojik izolasyon sonucu negatif olduğu, 3. Kümeste ise PCR pozitif sonuç veren 6 örneğin, 2 adedinin bakteriyolojik izolasyon sonucu *Mycoplasma spp.* pozitif, 4 adedinin ise bakteriyolojik izolasyon sonucu negatif olduğu saptanmıştır.

Ülkemizde Veteriner Kontrol Arastırma Enstitülerinde tanısı konan hastalıklar arasında yaklaşık % 19'luk bir oranla CRD'nin ilk sırada olduğunu bildirilmiş, 33 işletmede yaptığı serolojik incelemelerde LAT testi ile 20 (% 60)'sinin HI testi ile ise 6 (% 18)'sinin pozitif sonuc verdiği tespit edilmiştir (Güler 1992).

Türkiye'de tavuklarda mikoplazma yaygınlığı ile ilgili çalışmalar sınırlı düzeydedir. Akan ve ark. (2008), yapmış oldukları serolojik ve moleküler incelemede 43 broyler damızlık işletmesinin % 16.3'ünü MG pozitif, % 20.9 MS pozitif olarak saptamışlardır. Bunun dışında hastalığı direkt ve indirekt yöntemlerle varlığını saptayan çalışmalar da bulunmaktadır (Çarlı ve Eyigör 2003).

2008 yılında yapılan bir çalışmada; yumurtacı kümeslerde *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* varlığının PCR ile belirlenmesi amacıyla, 365 svap 15 farklı kümeden alınmıştır. Svaplar her kümede; canlı trachea, ölü trachea, akciğer , hava kesesi, eklem sıvısından 5'er adet toplamda 25 adet olacak şekilde alınmış ve kültür sonucunda sadece trachea svaplarında 3 pozitiflik elde edilmiştir. Bunların tümünün MG pozitif olduğu saptanmıştır. Kültürde MS pozitif örnek bulunmamıştır. PCR sonuçlarında ise 9 adet (% 2.46) MG pozitiflik 3 adet (% 0.82) MS pozitiflik saptanmıştır (Gürbüz,2008).

Farklı bir çalışma olarak ülkemizde; 2008 yılında Gebze'de mikoplazma türlerinin tanısında optik biyosensör tasarımı ile ilgili bir çalışma yürütülmüş ve sonucunda geliştirilen SPR temelli DNA biyosensörü mikoplazma genomik DNA'sının belirlenmesinde yeterli duyarlılıkta olmadığı saptanmıştır (İnanç Burcu, 2008).

2009 yılında Merkez ve Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitülerinin ortaklaşa yaptığı çalışma; damızlık tavuk işletmelerinde mikoplazma identifikasyonu üzerinedir. Çalışmanın sonucunda; damızlık işletmelerin tamamı *M. gallisepticum* yönünden negatif bulunmuştur. 37 damızlık işletmesinin 3 (% 8.1)'ünde *M. synoviae* pozitif bulunmuştur. Ayrıca bakteriyolojik kültür yöntemleri ile hem *M. gallisepticum* hem de *M. synovia* yönünden ekimler yapılmış sadece 1 (% 2.5) işletmenin 2 kümesinden *M. synoviae* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ve etken izolasyonu karşılaştırıldığında ise; PCR ile pozitif bulunan işletmelerin sadece % 33.4'ünde etken izolasyonu yapılabilmektedir (Asiye Dakman ve ark 2009).

Çalışmamızda kullanılan vlhA tabanlı PCR sonuçları incelendiğinde; yumurtacı kümeslerden alınan 225 örnekten 12 adedinde (% 5.3) pozitif sonuç elde edilmiştir. 150 örneğin alındığı broyler kümeslerinden yapılan identifikasyonda ise hiç üreme görülmemiş, örnekleme yapılan sürülerin *M. synoviae* yönünden ari oldukları saptanmıştır. Çalışmamızda; test edilen 375 örneğin % 3.2'sinde *M. synoviae* izole edilmiştir.

Araştırmamız İzmir ili ve çevresinde *M. synoviae*'nin identifikasyonu ve vlhA geni varlığının PCR ile araştırıldığı ilk çalışmadır ve *M. synoviae* varlığı hakkında bilgi vermektedir.

5. SONUÇ

İzmir ili ve çevresinde bulunan yumurtacı ve broyler kümeslerinden 375 tracheal svap örneği *M. synoviae*'nin identifikasyonu amacıyla toplanmış ve toplanan bu örnekler PCR metodu ile değerlendirilmiştir.

Araştırmamızda; hemaglutinasyonda görevli vlhA genini (vlhAF, vlhAR2) hedefleyen PCR metodu kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda; alınan tracheal svapların 12 adedinde (% 3.2) vlhA geni saptanmıştır ve bu örnekler *M. synoviae* pozitif olarak belirlenmiştir. *M. synoviae* pozitif tüm örnekler yumurtacı kümeslerden alınmıştır. Broiler kümeslerinden alınan örneklerde *M. synoviae* identifiye edilememiştir. Buda örnekleme yapılan broiler kümeslerinin etken açısından ari olduğunu gösterir.

Elde edilen pozitiflik oranının yumurtacı kümesler açısından dağılımı incelendiğinde; 1.küme 1 adet (% 1.3), 2. küme 5 adet (% 6.7), 3. küme ise 6 adet (% 8) oranında olduğu gözlenmiştir.

PCR ile elde edilen pozitif sonuçlar kültürle izolasyonda elde edilen pozitif sonuçlar ile karşılaştırıldığında ise; 1. küme konvansiyonel izolasyon sonucu *Mycoplasma spp.* pozitif olan 1 adet örneğin PCR sonucunda da pozitif sonuç verdiği, 2. küme; PCR pozitif sonuç veren 5 adet örneğin ise 3 adedinin *Mycoplasma spp.* pozitif, diğer 2 adedinin ise konvansiyonel izolasyon sonucu negatif olduğu, 3. Küme ise PCR pozitif sonuç veren 6 örneğin, 2 adedinin konvansiyonel izolasyon sonucu *Mycoplasma spp.* pozitif, 4 adedinin ise konvansiyonel izolasyon sonucu negatif olduğu görülmüştür.

Çalışma sonucunda; kültürde üreme gözlenmeyen örneklemelerin PCR ile pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. Bu sonuç ile sadece kültür ile identifikasyon sonucunda pozitif örneklerin gözden kaçırılabilmesi ve kültürle identifikasyonun diğer testlerle teyidinin gerekliliği ortaya konmuştur.

Sonuç olarak; ticari kanatlı sürülerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan *M. synoviae* etkeni, *M. gallisepticum*'un gölgesinde kalmıştır ve ülkemizde bu nedenle *M. synoviae* ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. *M. synoviae* CRD hastalığının oluşmasında etkin olmasının yanı sıra yumurta veriminde ve kalitesinde ve aynı zamanda

sinovialarda ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır. Ülkemizde kümeslerde düzgün işleyen bir monitoring sisteminin eksikliği, farklı yaşlarda hayvanların yakın mesafelerdeki kümeslerde, uygun biyogüvenlik önlemlerinin alınmaması sebebiyle mikoplazma infeksiyonları ciddiyetini önemini korumaktadır. *M. synoviae* hakkında verinin yetersiz olması nedeniyle ülkemizde araştırmaların yaygınlaştırılması önerilmektedir.

ÖZET

İzmir İlinde Bulunan Kümeslerde *Mycoplasma synoviae* Varlığının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Bu çalışmada İzmir'deki 5 farklı ticari yumurtacı ve broyler kümesinden alınan 375 tracheal svap *M. synoviae* yönünden vlhA geni tabanlı PCR yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmamızda kültürle izolasyon çalışmaları sonucu *M. synoviae* tüm örneklerin % 12.8'inde identifiye edilmiştir. Yumurtacı kümeslerde (1., 2., 3. kümes) *M. synoviae*'nin yüzde dağılımı, sırasıyla; % 32.2, % 29.3, % 2.7'dir. İki farklı broyler kümesinden alınan örneklerde ise *M. synoviae* saptanmamıştır.

Diğer yandan, vlhA tabanlı PCR ile yapılan izolasyon çalışmalarında; 375 örnekte 12 pozitif örnek saptanmıştır. Pozitif sonuçların kümes bazında dağılımına bakıldığında; 1. yumurtacı küme % 1.3 (1 adet pozitif), 2. yumurtacı küme % 6.7 (5 adet pozitif), 3. yumurtacı küme % 8 (6 adet pozitif) şeklinde bulunmuştur. Broyleler kümeslerinden alınan örnekler kültür izolasyon sonuçları ile paralellik göstermiş olup negatiftir.

Araştırmamızda, yumurtacı kümeslerinde *M. synoviae* varlığı PCR ile tespit edilmiştir. Broyleler kümeslerinden alınan örneklerden ise *M. synoviae* identifiye edilmemiştir. Çalışmamız; PCR ile identifikasyonun, kültür ile yapılandırılan hızlı ve güvenilir olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *M. synoviae*, identifikasyon, vlhA geni, PCR.

SUMMARY

Detection of *Mycoplasma synoviae* in the Region of Izmir Province by Molecular Methods

In this study; 375 tracheal swabs from five different commercial layer and broiler poultry in İzmir were examined by *vlhA* gene based PCR.

In our study; at the end of the culture; *M. synoviae* were identified at the rate of 12.8 % from whole samples. The percentage of *M. synoviae* as per layer (1st, 2nd, 3rd) is shown as follows: 32.2 %, 29.3 %, 2.7 %. *M. synoviae* has not been detected at none of two different broilers.

On the other hand; in the studies that has been done with *vlhA* based PCR 12 positive samples were detected per 375 samples. The percentage of *M. synoviae* as per layer (1st, 2nd, 3rd) is shown as follows: 1.3 % (1 positive sample), 6.7 % (5 positive samples), 8 % (6 positive samples). The samples taken from broilers had paralel results between cultured and PCR which were both negative.

In our study; *M. synoviae* was detected with PCR in layers. But at the samples taken from broilers *M. synoviae* couldn't been identified. The study showed that PCR methods is faster and more reliable than cultured.

Keywords: *M. synoviae*, identification, *vlhA* gene, PCR

KAYNAKLAR

Akan M, İzgür M. Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, 2002.

Akan M, İzgür M, Sareyyüpoğlu B, Çiftçi A, İça T. Tavuklarda Solunum Sistemi Hastalıklarının Epidemiyolojisi, AnkaraÜniv. BAP Projesi-Ankara, 2008.

Aldridge KE. Growth and cytopathology of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryo cell cultures. Infect. Immun, 1975; 12:198–204.

Allen JL, Noormohammadi AH, Browning GF. The *vlhA* loci of *Mycoplasma synoviae* are confined to a restricted region of the genome. Microbiology, 2005; 151, 935-940.

Anonim. National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. APHIS 91-55-031. USDA, Washington, DC, 1996.

Anonim. Council Directive on animal health conditions governing intra-Community trade in, and imports from third countries of, poultry and hatching eggs. Council Directive (90/539/EEC), 1990.

Anonim. Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği. 20.03.2007 Tarih ve 26468 sayılı Resmi Gazete, 2007a.

Anonim. Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği Uygulama Talimatı. 30.11.2007 Tarih ve 43 Numaralı Talimat, 2007b.

Anonim. Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*) Chapter 2.3.5 in OIE Terrestrial Manual Online. p.482, 2008.

Asiye DAKMAN, Elçin GÜNAYDIN, Mehmet Ali TÜRKYILMAZ, Metin GÜLEÇ, Mustafa COŞAR, Ümit ÖZDEMİR: Damızlık tavuk işletmelerinde tespit edilen mikoplazma infeksiyonları, Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara; Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Mikoplazma Teşhis Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye; Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 20, 27 - 34, 2009.

Awatef Béjaoui Khiari, Ibtissem Guériri, Radhia Ben Mohammed, Boutheina Ben Abdelmoumen Mardassi. 2010.Characterization Of A Variant *Vlha* Gene Of *Mycoplasma Synoviae*, Strain Wvu 1853, With A Highly Divergent Haemagglutinin Region

Behrens A, Heller M, Kirchhoff H, Yogev D, Rosengarten R. A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. Infect Immun, 1994; 62,5075–5084.

Ben Abdelmoumen B, Roy RS, Brousseau R: Cloning of *Mycoplasma synoviae* genes encoding specific antigens and their use as species-specific DNA probes. J Vet Diag Invest 1999, 11:162-169.

Ben Abdelmoumen Mardassi, B, Ben Mohamed R, Gueriri I, Boughattas S, Mlik B. Duplex PCR to differentiate between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. J. Clin. Microbiol, 2005; 43, 948–958.

Bencina D, Narat M, Dovc P, Drobnic-Valic M, Habe F, Kleven SH: The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acid sequences. FEMS Microbiol Letters 1999, 173:85-94.

Bencina D, Drobnic-Valic M, Horvat S, Narat M, Kleven SH, Dovc P. Molecular basis of the length variation in the Nterminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. FEMS Microbiol. Lett. 2001; 203, 115–123.

Bencina D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. Avian Pathol 2002; 31:535-547.

Bencia D. Mycoplasma infections. 14. WVPC Özet Kitabı, s:99-109, 2006.

Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signalling and immunity at large. Annu. Rev. Immunol. 2006,24, 353–389.

Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM. Diseases of Poultry. 10. Ed. Iowa State University Pres, Iowa, 1997.

Carli KT and Eyigor A Real – Time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea, Avian diseases, 2003;47(3), 712-717.

Chambaud I, Heilig R, Ferris S, Barbe V, Samson D, Galisson F, Moszer I, Dybvig K, Wróblewski H & other authors. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. Nucleic Acids Res :2001 29, 2145–2153.

Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB, (1973). Infecções bacterianas e micóticas. São Paulo (SP), EDART.

Delaplane JP, Stuart HO. The propagation of a virus in embryonated chicken eggs causing a chronic respiratory disease of chickens. American Journal of Veterinary Research, 1943; 4: 325-32.

Esendal ÖM. Mikoplazma infeksiyonları, In: Arda M, Minbay A, Aydın N, İzgür M, Yardımcı H, Esendal, ÖM, Erdeğer J. ve Akan M, Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan Yayınları, No, 26, Ankara;2002;79-92.

Ewing L, Cookson KC, Phillips RA, Turner KR, Kleven, SH. Experimental infection and transmissibility of *Mycoplasma synoviae* with delayed serological response in chickens. Avian Dis. 1998;42, 230–238.

Fabienne Dufour-Gesbert, Alexandra Dheilily, Corinne Marois, Isabelle Kempf, 2006. Epidemiological Study On *Mycoplasma Synoviae* Infection In Layers.

Feberwee A, Mekkes D.R, de Wit JJ, Hartman EG, Pijpers A: Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections. Avian Dis 2005, 49, 260-268.

Ferguson NM, Hepp D, Sun S, Ikuta N, Levisohn S, Garcia M. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. Microbiology, 2005; 151: 1883-1893.

Fiorentin L, Mores MA, Trevisol IM, Antunes SC, Costa LA, Soncini RA, Vieira NA. Test profiles of broiler breeder flocks housed in farms with endemic *Mycoplasma synoviae* infections. Brasil J Poult Sci, 2003; 5, 37-43.

Forsyth MH, Tourtellotte ME, Geary SJ. Localization of an immunodominant 64 kDa lipoprotein (LP 64) in the membrane of *Mycoplasma gallisepticum* and its role in cytoadherence. Mol. Microbiol, 1992; 6:2099–2106.

Freundt E.A, Razin S, Tully J.G. Culture media for classic mycoplasmas. In: The Mycoplasmas, Vol. 1, eds. Academic Press, New York, USA and London, UK: 1983, 127–135.

Frey ML, Hanson RP, Anderson DP. A Medium for the isolation of Avian Mycoplasmas. Am J Vet Res, 1968; 29, 2163-2171.

Garcia M, Jackwood, MW, Head M, Levisohn S, Kleven SH. Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. iowae* PCR amplification products. J. Vet. Diagn. Investig, 1996, 8, 56–63.

Gökçelik G. Mikoplazma infeksiyonlarının teşhisi ve serolojik izleme programlarının önemi. Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara, 2008, 6 (1), 6-11.

Güler L. Konya bölgesindeki kümes hayvanlarında serolojik yoklamalarla müspet bulunan CRD vakalarından etken izolasyon çalışmaları. Uzmanlık Tezi Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Konya, 1992.

Gürbüz E. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji A.B.D.Tavuklarda *Mycoplasma Gallisepticum* ve *Mycoplasma Synoviae* 'nın Tanısında Pzr Kullanımı, 2008.

Hammond PP, Ramirez AS, Morrow CJ, Bradbury JM: Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutininencoding gene vlhA and its value for strain typing, 2009.

Harasawa R, Pitcher DG, Ramirez AS, Bradbury JM. A putative transposase gene in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans*. Microbiology, 2004; 150: 1023-1029.

Heidelberg JF, Shahamat M, Levin M, Rahman I, Stema G, Grim C, Colwell RR. Effect of aerolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol, 1997; 63, 3585-3588.

Hong, Y, Garcia M, Leiting V, Bencina D, Dufour-Zavala L, Zaval G, Kleven SH. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. Avian Dis. 2004;48,606–616.

Into T, Fujita M, Okusawa T, Hasebe A, Morita M, Shibata K. Synergic effects of mycoplasmal lipopeptides and extracellular ATP on activation of macrophages. Infect. Immun. 2002; 70, 3586–3591.

Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. Vet. Immunol. Immunopathol, 2005; 104, 117–127.

İnanç Burcu, Belirli Mikoplazma Türlerinin Tanısına Yönelik Optik Biyosensör Tasarımı, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze ;2008.

Javed MA, Frasca S, Rood D, Cecchini K, Gladd M, Geary SJ. Correlates of immune protection in chickens vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* strain GT5 following challenge with pathogenic *M. gallisepticum* strain R(low). Infection and Immunity, 2005; 73, 5410-5419.

Jeffery N, Gasser RB, Steer PA, Noormohammadi AH Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single copy region. Microbiology 153, 2679–2688,2007.

Joanne L. Allen, Amir H. Noormohammadi and Glenn F. Browning, 2005. The *vlhA* loci of *Mycoplasma synoviae* are confined to a restricted region of the genome.

Jones JF, Whithear KG, Scott PC, Noormohammadi AH. Duration of immunity with *Mycoplasma synoviae*: comparison of the live attenuated vaccine MS-H (Vaxsafe MS) with its wild-type parent strain, 86079/7NS. Avian Diseases, 50, 228-231, 2006.

Jordan FTW, Pattison M. Poultry Diseases. 4. Ed. Saunders Company Ltd, London, 1996.

Katarzyna Domańska-Blicharz, Grzegorz Tomczyk, And Zenon Minta, Bull Vet Inst Pulawy 53, 357-360, 2009. Comparison Of Different Molecular Methods For Detection Of *Mycoplasma Synoviae*.

Kleven SH, Morrow CJ, Whithear KG. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. Avian Dis, 1988; 32: 731–741.

Kleven SH. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM (Eds.), Diseases of Poultry, 10th Edition. Iowa State Univ. Press. Ames, IA, pp. 220-228,1997.

Kleven SH. Mycoplasmosis. In DE Swayne, JR Glisson, MW Jackwood, JE Pearson, and WM Reed (eds.). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, Fourth ed. American Association of Avian Pathologists: Kennett Square, PA, 74-80, 1998.

Kleven SH, Rowland GN, Kumar MC. Poor serologic response to upper respiratory infection with *Mycoplasma synoviae* in turkeys. Avian Dis. 48, 719–723, 2001.

Kleven SH. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (Eds.), Diseases of Poultry. 11th ed. Iowa State University Press, Ames, pp. 756–766, 2003.

Lauerman LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM, Van Santen VL Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis. 37, 829–834; 1993.

Lauerman LH, Mycoplasma PCR assays. In: Lauerman LH (Ed.), Nucleic Acid Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL, pp. 41–42, 1998.

Levisohn S, Kleven SH. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). Rev Sci Tech Off Intern Epizo, 19(2): 425-442, 2000.

Markham FS, Wong SC. Pleuropneumonia-like organisms in the etiology of turkey sinusitis and chronic respiratory disease of chickens. Poultry Science, 1952; 31: 902-4.

Markham PF, Glew MD, Sykes JE, Bowden TR, Pollocks TD, Browning GF, Whithear KG, Walker ID. The organisation of the multigene family which encodes the major cell surface protein, pMGA, of *Mycoplasma gallisepticum*. FEBS Lett, 1993, 352:347-352.

Markham PF, Duffy MF, Glew MD, Browning GF. A gene family in *Mycoplasma imitans* closely related to the pMGA family of *Mycoplasma gallisepticum*. Microbiology, 1999; 145, 2095–2103.

Marois C, Oufour-Gesebert F and Kempf I Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction, Veterinary microbiology, 2000; 73, 311-318.

Marois C, Picault JP, Kobisch M, Kempf I. Experimental Evidence of Indirect Transmission of *Mycoplasma synoviae*. Vet Res, 2005; 36, 759-769.

Miha Lavric, Dusan Bencina, Sonja Kothlow, Bernd Kaspers, Mojca Narat, 2007. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1b in chicken macrophages.

Mohammed HO, Carpenter TE, Yamamoto R, McMartin DA. Prevalance of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layers in Southern and Central California. Avian Diseases, 1985; 30(3): 519-526.

Mühlradt PF, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R, Jung G, 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. J. Exp. Med. 185, 1951–1958.

Nascimento ER, Nascimento MGF, 1994. Eradication Of *Mycoplasma Gallisepticum* And *M. Synoviae* From A Chicken Flock In Brasil In: The 43th Western Poultry Disease Conference; Sacramento, Califórnia, Usa. P.58.

Nascimento ER, Nascimento MGF, Danelli MGM, Machado SL, Lignon GB, Polo PA, 1998. Comparison Of Pcr Kits For The Detection Of *Mycoplasma Gallisepticum* And *M. Synoviae* (Ms) In Ms Infected And Uninfected Chickens. In: Proceedings Of The 47^o Western Poultry Disease Conference; Sacramento, Califórnia, USA. P.84-86.

Nascimento ER, Nascimento MGF, Rodrigues OP, Mendonça GA, Lignon GB, Dias SAC, Ito JY. Avaliação de antimicrobianos no tratamento da doença respiratória crônica por *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* em frangos de corte. Brazilian Journal of Poultry Science, 1999, p.72.

Narat M, Bencina D, Kleven SH, Habe F. The hemagglutination- positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. Infect. Immun, 1998; 66, 6004–6009.

Noormohammadi AH, Markham PF, Whithear KG, Walker ID, Gurevich VA, Ley DH, Browning GF. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phasevariable major membrane antigens one of which is a putative haemagglutinin. Infect Immun. 1997; 65:2542-2547.

Noormohammadi AH, Markham PF, Duffy MF, Whithear KG, Browning GF. Multigene families encoding the major haemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. Infect Immun, 1998; 66:3470-3475

Noormohammadi AH, Markham PF, Kanci A, Whithear KG, Browning GF. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. Mol. Microbiol. 2000; 35, 911–923.

Noormohammadi AH, Jones JF, Harrigan KE, Whithear KG. Evaluation of the non-temperature- sensitive field clonal isolates of the *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H. Avian Diseases, 47, 355e360. novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. Mol Microbiol, 2003; 35:911-923.

Ongor H, Kalin R, Karahan M, Cetinkaya B, McAuliffe L. & Nicholas RA – Isolation of *Mycoplasma bovis* from broiler chickens in Turkey. Avian Pathol, 2008, 18, 1-2.

Papazisi L, Frasca S, Gladd M, Liao X, Yogevev D, Geary SJ. GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. Infection and Immunity, 2002; 70, 6839-6845.

- Papazisi L, Gorton TSGK, Markham PF, Browning GF, Nguyen DK, Swartzell S, Madan A, Mahairas G, Geary SJ. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. *Microbiology*,2003; 149, 2307–2316.
- Pettersson B, Tully JG, Bölske G, Johansson KE. Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg et al. 1989) based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*,2000; 50, 291–301.
- RAJ Nicholas, RD Ayling and L McAuliffe, 2009. Vaccines for *Mycoplasma* Diseases in Animals and Man, 90-91.
- Ramirez AS, Naylor CJ, Hammond PP, Bradbury JM. Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Vet Microbiol*, 2006; 118, 76-82.
- Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 1998; 62, 1094–1156.
- Rhoades KR. Selection and comparison of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinating and nonhemagglutinating variants. *Avian Dis*, 1985; 29: 1170–1176.
- Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne D. *Diseases of Poultry*. 11. Ed. Iowa State University Pres, Iowa, 2001.
- Seya T, Matsumoto M. A lipoprotein family from *Mycoplasma fermentans* confers host immune activation through Tolllike receptor 2. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 2002; 34, 901–906.
- Sirand-Pugnet P, Lartigue C, Marena M, Jacob D, Barré A, Barbe V, Schenowitz C, Mangenot S, Couloux A, Segurens B, de Daruvar A, Blanchard A, Citti C. Being pathogenic plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet*, 2007; 3:744-758.
- Talkington FD, Kleven SH. A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence. *Avian Dis*, 1983; 27: 422–429.
- Wang H, Fadl AA, Khan MI. Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *Molec Cell Probes*, 1997; 11: 211-216.
- Whithear KG. Control Of Avian Mycoplasmoses By Vaccination. Department Of Veterinary Science, University Of Melbourne, Werribee, Victoria, Australia. 1996 Dec;15(4):1527-53.
- Wise KS. Adaptive surface variation in mycoplasmas. *Trends Microbiol*, 1993; 1:59–63.
- Wigley P, Kaiser P, 2003. Avian cytokines in health and disease. *Rev. Bras. Cienc. Avic*. 5, 1–14.
- Yoder HW, Hofstad MS. A previously unreported serotype of avian *Mycoplasma*. *Avian Diseases*, 1962; 6:147-60.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İzmir’de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İzmir’de tamamladım. 2001 yılında liseden mezun olarak aynı yıl Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinde lisans eğitimime başladım. 2006 yılında Veteriner Fakültesi’nden mezun olduktan sonra kısa süre pet kliniğinde klinisyen hekim olarak görev yaptım. 2007 yılından itibaren çikma tavuk kesimi yapan bir şirkette 5 yıl süre ile çalıştım. 2009 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora programına başladım. 2013 Haziran ayında yaptığım evlilik sonucu işimden ayrılarak İstanbul’a yerleştim. Yabancı dil olarak “İngilizce” bilmekteyim.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübesi ile bana destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA'ya ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a, Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Göksel ERBAŐ'a ve laboratuvar çalışmaları ve tez yazım aşamasında hep yanımda olan Araştırma Görevlisi Dr. Uđur PARIN'a, desteklerini gördüğüm Vet. Hekim NeŐe UÇAN'a, pozitif kontrol DNA'ların tedarik edilmesini sağlayan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Mehmet AKAN'a, bugünlere gelmemde bana hep destek olan ve emeğini esirgemeyen aileme ve eŐime sonsuz teşekkür ederim.