



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAFES KUŞLARINDA
TÜBERKÜLOZA NEDEN OLAN ETKENLERİN
KÜLTÜR VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TEŞHİSİ**

Nihan ALTINSOY DUYGU

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Barış SAREYYUPOĞLU**

2012-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAFES KUŞLARINDA
TÜBERKÜLOZA NEDEN OLAN ETKENLERİN
KÜLTÜR VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TEŞHİSİ**

Nihan ALTINSOY DUYGU

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Barış SAREYYUPOĞLU**

Bu tez, Tübitak Bideb-2211 Yurt İçi Doktora Burs Programı ile Desteklenmiştir.

2012-ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	III
İçindekiler	IV
Önsöz	VI
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	VIII
Çizelgeler	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	3
1.1.1. Türkiye’deki Kafes Kuşlarında Mikobakteriyozis Varlığı	4
1.2. Etiyoloji	6
1.2.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	6
1.2.2. Genetik Karakter ve Plazmidler	7
1.2.3. Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı	7
1.2.4. Gelişme Gereksinimleri ve Koloni Morfolojisi	9
1.2.5. Biyokimyasal Özellikler	11
1.3. Epidemiyoloji	12
1.3.1. Hastalığın Kafes Kuşları İçin Önemi	15
1.3.2. Cinsiyet ve Yaş Faktörü	16
1.3.3. Bulaşma	16
1.3.4. Enfeksiyon Yolu ve Yerleşimi	18
1.3.5. Potansiyel Zoonotik Önem	19
1.4. Klinik Belirtiler	21
1.5. Patolojik Bulgular	23
1.5.1. Makroskopik Bulgular	23
1.5.2. Mikroskopik Bulgular	24
1.6. Laboratuvar Teşhisi	25
1.6.1. Etkenin İdentifikasyonu	27
1.6.2. Kültür	28
1.7. Moleküler Teşhis	33
1.8. Sağaltım	34
1.9. Koruma ve Kontrol	35
1.9.1. Bakım-İdare Uygulamaları	36
1.9.2. Aşılama	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. Gereç	38
2.1.1. Örnekler	38
2.1.2. Referans Suşlar	38
2.1.3. Solüsyonlar	42
2.1.4. Besiyerleri	43
2.1.5. Bakteriyolojik Muayenelerde Kullanılan Cihazlar	46
2.1.6. PCR Testinde Kullanılan Primerler	47
2.1.7. PCR Testinde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	48

2.2.	Yöntem	49
2.2.1.	Nekropsi	49
2.2.2.	Mikobakterilerin Bakteriyoskopik Tanısı	49
2.2.2.1.	Preparatların Hazırlanması	49
2.2.2.2.	Ziehl-Neelsen Boyama	49
2.2.3.	Optimizasyon İçin Sulandırma Örneklerinin Hazırlanması	50
2.2.3.1.	On Katlı Mikobakteri Sulandırmalarının Hazırlanması	50
2.2.3.2.	Yapay Kontamine Doku ve Dışkı Örneklerinin Hazırlanması	50
2.2.4.	Mikobakteri Kültürü	51
2.2.4.1.	Dekontaminasyon	51
2.2.4.2.	Kültür Optimizasyonu	51
2.2.4.3.	Besiyerlerine Ekim	52
2.2.5.	Mikobakterilerin Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu	52
2.2.5.1.	DNA Ekstraksiyonu	52
2.2.5.1.1	Standart Suşlardan DNA Ekstraksiyonu	52
2.2.5.1.2	Yapay Kontamine Örnekler ve Tez Materyalinden Ekstraksiyon	53
2.2.5.2.	PCR Tabanlı Testler	54
2.2.5.2.1	PCR	55
2.2.5.2.1.1.	PCR Optimizasyonu	56
2.2.5.2.1.2.	PCR Testleri	57
2.2.5.2.2.	Nested PCR	59
2.2.5.2.2.1.	Nested PCR Test Optimizasyonu	59
2.2.5.2.2.2.	Nested PCR Testleri	59
2.2.5.3.	DNA Jel Elektroforezi	59
3.	BULGULAR	61
3.1.	Nekropsi ve Ziehl-Neelsen Boyama Bulguları	61
3.2.	Optimizasyon Bulguları	61
3.3.	Kültür Bulguları	64
3.4.	Moleküler Yöntem Optimizasyon Bulguları	64
3.5.	PCR Bulguları	67
4.	TARTIŞMA	69
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	75
ÖZET		77
SUMMARY		78
KAYNAKLAR		79
ÖZGEÇMİŞ		91

ÖNSÖZ

Mycobacterium genusuna bağlı bakterilerin oluşturduğu tüberküloz, gerek hayvan gerekse insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen, akciğer, diğer organ ve dokularda kazeöz ve kazeökalseröz tüberkellerin oluşmasıyla karakterize kronik, bulaşıcı ve zoonotik bakteriyel bir hastalıktır. Kafes kuşlarında kanatlı tüberkülozuna (avian tüberkülozis - AT) genel olarak *M. avium* complex (MAC), *Mycobacterium genavense* ve nadiren *Mycobacterium fortuitum* neden olur.

Kanatlı mikobakteriyozisi dünya çapında yaygındır. Geçtiğimiz otuz yıl içerisinde hastalık kafes kuşları da dâhil olmak üzere pek çok kanatlı türünde tespit edilmiştir. Ayrıca, kuşlar için patojenik olan türler de dahil birçok mikobakteri çevrede bol miktarda bulunmaktadır.

Son yıllarda şehir hayatının gelişmesiyle evde hayvan bakım ve beslenmesine ilgi artmıştır. Pet hayvanı olarak adlandırılan pek çok hayvan türü içinde, diğerlerine göre daha az zaman ve gider istemesi sebebiyle en yaygın beslenenleri kafes kuşlarıdır. Bu nedenle çalışmada zoonoz potansiyele sahip tüberküloz etkenlerinin kafes kuşlarında varlığını araştırmak amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının belirlenmesinde ve yürütülmesinde bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU ve beni mikrobiyoloji ile tanıştıran Sayın Prof. Dr. Nejat AYDIN başta olmak üzere tez izleme komite üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Hakan YARDIMCI ve Sayın Prof. Dr. Mehmet ŞAHAL'a Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Serdar DİKER ve öğretim üyeleri; Sayın Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Sayın Prof. Dr. Mehmet AKAN'a teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmamda kullandığım standart suşların temininde yardımcı olan Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığından Başkan Yardımcısı Sayın Mik. Uzm. Dr. İsmail CEYHAN ve Uzm. Bio. Hülya ŞİMŞEK'e; ilgilerini tüm sıcaklığıyla her zaman yanı başımda hissettiğim aileme; sevgisi ve her konudaki desteği için eşim Serkan DUYGU'ya ve hayatıma anlam katan oğlum Kuzey DUYGU'ya teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADC	Middlebrook ADC (Albumin, Dextrose, Catalase) Enrichment
ARB	Asidorezistans Bakteri
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
bp	Baz Çifti
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asid
KH ₂ PO ₄	Potasyum di-Hidrojen Fosfat
L-J	Löwenstein-Jensen Besiyeri
MAA	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MAI	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>
MD	Megadalton
MgCl	Magnezyum Klorür
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
NaOH	Sodyum Hidroksit
NTM	Non-Tuberculous Mycobacteria
OADC	Middlebrook OADC (Oleik Asid, Albumin, Dekstroz ve Katalaz) Enrichment
1N	Bir Normal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPÇM	Potansiyel Patojenik Çevresel Mikobakteriler
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
TBE	Tris Borate EDTA
TDM	Tüberküloz Dışı Mikobakteriler
UV	Ultra-Violet
Z-N	Ziehl-Neelsen Boyama

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Mikobakterilerde hücre duvarı yapısı	8
Şekil 2.1.	Mikobakteriyel türlerin identifikasyonu için uygulanan diagnostik algoritma	55
Şekil 2.2.	Tez çalışmasında izlenen moleküler yöntemin şematik gösterimi	58
Şekil 3.1.	Karaciğer ve dışkı örneklerine 12SrRNA internal kontrol primerleri ile uygulanan PCR bulguları ile on katlı sulandırma sonuçları bulguları	65
Şekil 3.2.	On katlı standart suş sulandırmalarına 16SrRNA genus spesifik primerler (543 bp) ile uygulanan PCR bulguları	66
Şekil 3.3.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> standart suşu ile hazırlanan on katlı sulandırma örneklerine uygulanan 16SrRNA nested PCR sonuçları	66
Şekil 3.4.	<i>Mycobacterium</i> spp. (16srRNA) primerleri ile uygulanan PCR ampliconlarının template DNA olarak kullanıldığı, 16SrRNA nested primerleri ile uygulanan nested PCR bulguları	67
Şekil 3.5.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (IS901) primerleri (509 bp) ile uygulanan PCR ampliconlarının template DNA olarak kullanıldığı nested PCR bulguları (375 bp)	68

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1	Runyon mikobakteri sınıflandırması	4
Çizelge 1.2	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ve <i>M. genavense</i> biyokimyasal özellikleri	12
Çizelge 1.3	Çeşitli kuş ve memeli türlerinin <i>M. avium</i> complex serotiplerine duyarlılıkları	12
Çizelge 1.4	Kuşlarda kullanılan tüberküloz tanı metotları ve testler	26
Çizelge 1.5	<i>Mycobacterium</i> spp. için kullanılan dekontaminantlar ve özellikleri	29
Çizelge 2.1	Çalışmada kullanılan tez materyalleri	40
Çizelge 2.2.	Çalışmada kullanılan primerler	47
Çizelge 2.3.	Tez çalışmasında kullanılan PCR karışımı	56
Çizelge 2.4.	Tez çalışmasında PCR için uygulanan amplifikasyon koşulları	56
Çizelge 3.1.	On katlı <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> sulandırılmaları ile çeşitli katı besiyerlerine yapılan ekimlerin sonuçları	62
Çizelge 3.2.	On katlı <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> sulandırılmaları ile sıvı besiyerine yapılan ekimlerin sonuçları	63

1.GİRİŞ

Mikobakteriyozis pet kuşlarında, doğada serbest ve kafeste tutulan vahşi kuşlar ile diğer kanatlılarda bildirilmiş, dünya çapında yaygın bir hastalıktır. Hastalık sıklıkla *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (serotip 1, 2 ve 3) ve *Mycobacterium genavense* tarafından meydana getirilir (Keymer ve ark., 1982; Cromie ve ark., 1991; Hoop ve ark., 1996; Portaels ve ark., 1996; Holsboer-Buogo ve ark., 1997; Tell ve ark., 2003b). Her ne kadar *M. avium* kanatlı tüberkülozunun başlıca etkeni olarak bilinse de pet kuşlarında mikobakteriyozisin tür tayini için uygulanan yeni moleküler teknikler, başta *M. genavense* olmak üzere kültürü yapılamayan mikobakterilerin de varlığını ortaya koymuştur.

M. genavense, pet kuşlarında yapılan çalışmalarda en sık rastlanılan (%71) tür iken, *M. avium* izole edilen ikinci (%17) tür olmuştur (Hoop ve ark. 1996; Manarolla ve ark. 2009). *Mycobacterium fortuitum* kanatlı türlerindeki lezyonlardan zaman zaman izole edilir (Holsboer-Buogo ve ark., 1997; Silvia-Krott ve ark., 1998). *Mycobacterium bovis* ve *Mycobacterium tuberculosis* nedenli infeksiyonlar da kuşlarda çok az rastlanan etkenler olmasına rağmen bildirilmiştir (Van der Heyden, 1997a). Bunlardan *M. tuberculosis* kuşlarda infeksiyona daha az neden olur, genellikle kuş sahiplerinden bulaşır ve klinik bulgular mikobakterilerin sık rastlanan türlerinde ortaya çıkan bulgularla farklılık gösterir (OIE, 2008; Schmidt ve ark., 2008). Bunun yanında yapılan post-mortem araştırmalarda pet kuşlarında mikobakteriyozis insidensi % 0,5-14 olarak belirlenmiştir (Lennox, 2007).

Mikobakteriyozis hemen hemen tüm kuş sınıflarında bildirilmiş olmasına rağmen hastalığa duyarlılık, tür bazında değişim gösterebilmektedir. Zoolojik koleksiyonlardan hastalığa karşı en duyarlı sınıflar; *Gruiformes* (Turnamsılar), *Passerines* (Serçegiller), *Raptors* (Yırtıcı kuşlar), *Ratites* (Karinasız kuşlar) ve *Galliformes* (Tavuksular)'dır (Keymer ve ark., 1982; Dhama ve ark., 2011).

Hastalığın klinik bulguları ilişkili olduğu organa göre çeşitlilik gösterir. Klasik bulgu kronik ve ilerleyen zayıflık ve halsizliktir. Diyare de sık karşılaşılan bir bulgudur. Bazı kuşlarda solunum problemi belirtileri görülebilir (Tell ve ark., 2001). Zaman zaman kuşlarda ani ölümler şekillenir bunun yanında yine bazı kuşlarda granülamatöz oküler lezyonlar gelişebilir (OIE, 2008).

Kültür, pratikte bazı sınırlamaları olmasına rağmen kuşlarda mikobakteriyozis enfeksiyonun doğrulanmasında kesin bir yöntemdir. Kuşlar için patojenik olan mikobakteriler en az 15 saatlik bir bölünme zamanına ihtiyaç duyan yavaş gelişen organizmalardır. Bu nedenle besiyerinde gözle görülür koloniler elde etmek için 2–4 haftaya gerek vardır (Aranaz ve ark., 1997). Bazı *M. avium* suşlarında kolonilerin tanımlanabilmesi için 6 aya gereksinim olabilir. Ayrıca, kültür metotları ile tanı konabilmesi için ml’de en az 100 mikobakteri bulunması gerekmektedir (Butcher ve ark., 1996). Ancak bunun yanında, *M. genavense* gibi kültüre edilemeyen türler de kuşlarda tüberküloza sebep olmaktadır. Mikobakteriler türlere göre değişen içerikte substrat, besin maddeleri, sıcaklık ve oksijen ihtiyaçlarına göre spesifik üreme özellikleri göstermektedir (Tell ve ark., 2004).

M. genavense ilk olarak 1990 yılında AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)’li bir insanda saptanmıştır (Böttger ve ark., 1992). Türün o zamandan beri kuşlar için de patojenik olduğu kanıtlanmıştır. 1986 ve 1995 yıllarında İsviçre’de yapılan epidemiyolojik bir çalışmada *M. genavense*’nin kuşlarda mikobakteriyozis için en sık rastlanılan ortak etken olduğu bildirilmiştir (Hoop ve ark., 1996). Hem kuş hem de insanlarda, *M. avium* ve *M. genavense* neredeyse aynı klinik bulguları gösterir ve öncelikle 16S ribozomal RNA vasıtasıyla ayırt edilirler (Coyle ve ark., 1992; Jackson ve ark., 1992). Dahası, ikili enfeksiyonlar da bildirilmiştir (Kirschner ve ark., 1994). *M. genavense*’nin musluk suları (Ristola ve ark. 1999) ve hastane sularında (Hillebrand-Haverkort ve ark., 1999) da bulunduğu bildirilmiştir (Nichols ve ark., 2005).

1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Tüberkülozun tarihçesi insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanların mikobakterilerle karşılaşmasının kanıtları M.Ö. 8000 yıllarına dayanır. Toplu yaşama geçiş ve sığırların evcilleştirilmesiyle tüberküloz hastalığı gelişmiştir. Bu dönemle ilgili olarak, Almanya’da bulunan insan iskeletlerinde (M.Ö. 5000) aside dirençli mikobakteri (ARB) saptanmıştır (Herzog, 1998). Yine hastalıkla ilgili bilgi ve bulgular Mısır’da 5000, Hindistan’da 3300 ve Çin’de 2300 yıl önceki kayıtlarda yer almıştır (Leão ve Portaels, 2007). Dr. Robert Koch, 1882 yılında *M. tuberculosis*’in verem hastalığının sebebi olduğunu göstermiştir (Fulton ve Thoen, 2003). Kuşlarda ise mikobakteriyel hastalık ilk kez Maffucci tarafından 1890’da tanımlanmıştır (Maffucci, 1894). Straus ve Gamaleia, kuşlarda hastalığa neden olan bu etkenin farklı bir tür olduğu tespit etmiş (Grange ve ark., 1990), etken 1901’de Chester tarafından *M. avium* olarak adlandırılmıştır (Chester, 1901). 1800’lerin sonundan bu yana da kuşlarda ortaya çıkan mikobakteri kaynaklı bu hastalık kanatlı tüberkülozisi olarak isimlendirilmektedir (Tell ve ark., 2001).

Actinomycetales takımındaki *Mycobacteriaceae* familyasına bağlı tek genus olan *Mycobacterium* genusu içinde, alt türlerle birlikte 60’dan fazla tür vardır (Yardımcı, 2006). *M. tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* ve *M. bovis* dışındakilerin primer insan patojeni olmamaları sebebiyle ‘atipik mikobakteriler’ olarak sınıflandırılır. Günümüzde epidemiyolojik olarak da klasik tüberküloz grubundan farklılık gösteren bu mikroorganizmaları tanımlamak için daha sık ‘tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM)’ veya ‘nontüberküloz mikobakteriler (NTM)’ deyimleri kullanılmaktadır. Tüm NTM yaygın bir şekilde çevresel mikroorganizmalardır ve insandan insana temas ile bulaşmazlar (Hoop, 1997). Wayne bu etkenleri ‘potansiyel patojenik çevresel mikobakteriler (PPÇM) olarak adlandırmıştır (Wayne ve Kubica, 1986). NTM yavaş gelişenler (Grup I-III: 7 günden sonra gözle görülür koloni) ve hızlı gelişenler (Grup IV: 7 gün içinde gözle görülür koloni) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Çizelge 1.1). Diğer kriterler ise pigmentasyon ve biyokimyasal reaksiyonlardır. Genellikle hızlı gelişen mikobakteriler (Grup IV) insanlar için nonpatojenik iken, yavaş gelişen mikobakterilerin çeşitli türleri patojeniktir. Bu

mikobakterilerden bazıları *M. avium* complex (MAC), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium malmoeensis*, *Mycobacterium celatum*, *M. fortuitum* ve *M. genavense*'dir (Shinnick ve Good, 1994; Hoop, 1997).

Çizelge 1.1: Runyon mikobakteri sınıflandırması (Shinnick ve Good, 1994)

GRUP	KÜLTÜR KARAKTERİSTİĞİ	HASTALIK KOMPLEKSİ	KONAK	ÖNEMLİ TÜRLER
A	yavaş gelişen (3-6 hafta)	Tüberküloz	İnsan Sığır	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i>
B	kültüre edilemeyen yavaş gelişen	Lepra Paratüberküloz	İnsan Sığır	<i>M. leprae</i> <i>M. paratuberculosis</i>
C	(Non-tüberküloz bakteriler)			
I	yavaş gelişen (3-6 hafta) fotokromojenik, ışıkla temasta sarı pigment oluşturan	Saprofitik Potensiyel patojen		<i>M. kansasii</i>
II	yavaş gelişen (10-14 hafta) skotokromojenik, ışıktan bağımsız turuncu pigment oluşturan	Saprofitik		<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. gordonae</i>
III	yavaş gelişen (3-4 hafta) nonfotokromojenik	Saprofitik Kuş, insan ve memeliler için potansiyel patojenik		<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. genavense</i> <i>M. celatum</i>
IV	hızlı gelişen (6-7 gün) oportunistik patojen	İnsan ve hayvanlar için		<i>M. chelonae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i>

1.1.1. Türkiye'deki Kafes Kuşlarında Mikobakteriyozis Varlığı

Ülkemiz'de kafes kuşlarında mikobakteriyozise ait oldukça az sayıda yayın vardır. Bu çalışmalar genellikle çeşitli üniversitelerin patoloji anabilim dallarınca yürütülmüştür.

Gümüşsoy ve ark.'nın 2006 yılında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi'nde yaptıkları çalışmada Kayseri Hayvanat Bahçesi'nden ölü olarak getirilen 4 güvercin (*Columba domestica*), 3 kıvıl şahin (*Buteo rufinus*), 2 mandarin ördeği (*Aix galericulato*), 2 hindi (*Meleagris gallopavo*) ve 1 sölün'de (*Phasianus colchicus*) költürel yoklama ve BACTEC hızlı radiometrik teknikle *M. avium* subsp. *avium* izole ve identifiye edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada yapılan nekropside karaciğer, akciğer, dalak ve ince bağırsaklarda tüberküloz lezyonları gözlenmiş, lezyonların histopatolojik incelemesinde çok çekirdekli dev hücrelerinde asido-rezistans mikobakterilerin bulunduğu granulomlara rastlanmıştır. Çalışma sonunda Kayseri Hayvanat Bahçesi'nde kanatlı tüberkülozunun oldukça yaygın olduğu ortaya konmuştur (Gümüşsoy ve ark., 2006).

Aynı yerde tutulan 2 tavuskuşu ve 2 halkalı sölünde ise Kul ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada *M. avium* subsp. *avium* tespit edilmiştir. Her iki halkalı sölün ve dişi bir tavuskuşunda klinik bulgu gözlenmemiş, erkek tavuskuşunda iki ay süresince semptomlar izlenmiştir. Patolojik incelemede kuşların karaciğer, dalak ve bağırsaklarında kalsifiye olmayan granulomlar bulunmuştur. Dört kuşun da költür sonuçları negatif çıkmıştır.

Yine ölkemizde 1986-2009 yılları arasında yapılan çeşitli çalışmalarda da güvercinlerde mikobakteriyozis tespit edilmiştir (Kutsal ve Sağlam, 1988; Gürel ve ark., 1997; Kapakin Terim ve Alığır, 2009).

Ayrıca kuş türleri içerisinde kazlarda hastalığın çok ender göröldüğü bildirilmesine rağmen, Özcan ve ark. (2001) tarafından infeksiyonun göröldüğüne dair bir adet olgu raporlanmıştır.

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Mikobakteriler küçük ($0.2-0.6 \times 1.0-10 \mu\text{m}$), aerobik, sporsuz etkenlerdir (Falkinham, 1996). Organizmalar mikroskopta basil görünümündedirler fakat küp benzeri, kavisli ve eğik formları da bazı preparatlarda ortaya çıkar. Nadiren dallanma görülür. Çoğunun yuvarlak sonları vardır ve uzunlukları $1-3 \mu\text{m}$ arasında değişiklik gösterir. Sporlanma yoktur ve organizmalar hareketsizdir. Sitoplazma içinde herhangi bir yerde küre biçiminde veya konik granüllere rastlanabilir (Thoen, 1994).

Mikobakterilerin en karakteristik morfolojik özellikleri aside dirençliliğidir. Bu özellikleri dolayısıyla Gram, Giemsa gibi rutin bakteriyolojik boyalarla boyanmazlar. Bazı özel yöntemlerle boyandıklarında ise asit ile yıkanmalarına rağmen boyayı bırakmazlar (Fulton ve Thoen, 2003). İdentifikasyonları genellikle Ziehl-Neelsen (Z-N) tekniği adında özel bir boyama tekniği ile yapılır. Auramin veya akridin turuncusu (Smithwick ve ark., 1995) gibi floresan boyama teknikleri konvensiyonel fuksin temelli boyamalara göre, bakterinin daha kolay görülebilmesi ve daha az sürede daha fazla alanın incelenebilmesi olanaklarıyla daha avantajlıdır (Aranaz ve ark., 1997).

Tüberküloz tanısında mikroskopi, klinik örneklerden aside dirençli etkenin tespiti için en basit, en ucuz ve oldukça hızlı bir yöntemdir (Huebner ve ark, 1993). Etkenlerin preparatta görülme şansı örnekteki yoğunluklarıyla doğru orantılı olarak artar. Mikobakterilerin mikroskopide görülebilmeleri için en az 5×10^4 mikobakteri/ml bulunması gerekmektedir. Doku kesitleri ve preparatlarda bulunan çok sayıda *M. avium* genellikle tespit edilir. Ayrıca *M. avium*, *M. bovis*'e göre çok daha farklı şekillerde görülebilir (Aranaz ve ark., 1997).

1.2.2. Genetik Karakter ve Plazmidler

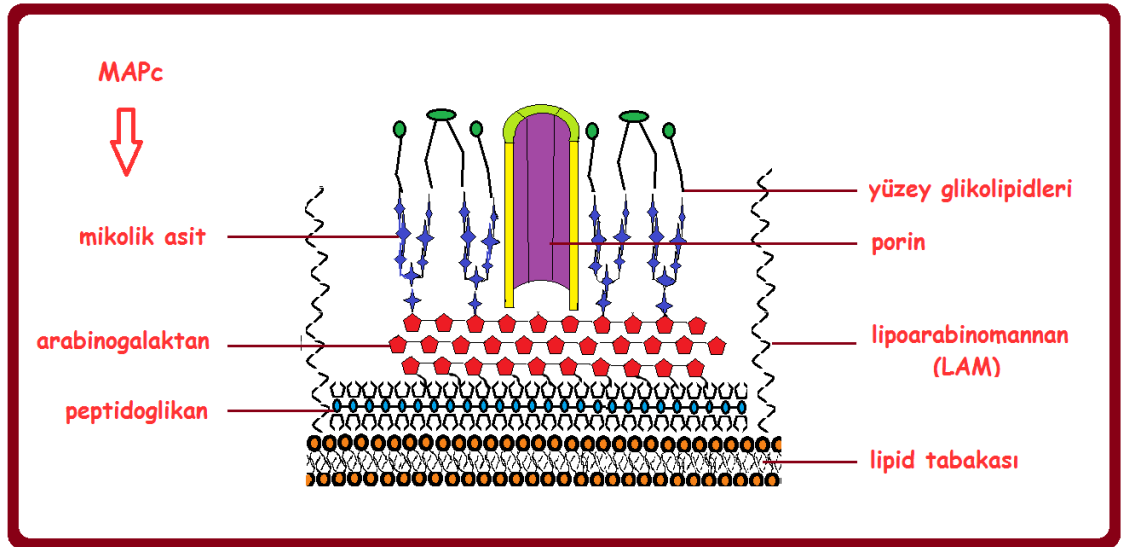
Mikobakteriyel genom DNA'nın tek bir kapalı döngüsünden (single closed loop) oluşur. Bazı suşların bir veya birden fazla plazmidleri vardır. Elektron mikroskopide DNA yoğun nükleer bir yapı olarak görünmesine rağmen, genom nükleer membrana sahip değildir. *Mycobacterium avium* - *intracellulare* (MAI) complex suşlarının genom boyutları $2.8-4.5 \times 10^9$ bp'dir. Çoğu bakteri DNA'sı % 64 -70 mol guanin ve sitozin içermektedir (Inderlied ve ark., 1993).

Plazmidler, *M. avium*, *M. intracellulare* ve *M. scrofulaceum* grup üyelerinde yaygındır. Bazı suşların 3 ila 6 plazmidi vardır. Bazı suşlarda ise toplam DNA'nın % 30'u plazmid DNA'dır. Plazmidler MAI complex'inin insan suşlarında %55 ve aerosollerden elde edilen suşlarda %75 oranında bulunurken, suda %21, çöplerde %7 ve topraktan elde edilen suşlarda ise yalnızca %5 oranında tespit edilmiştir. Bu durum plazmidlerin sudan ziyade daha çok havada bulunduklarını ve bu aerosol izolatlarının insan izolatlarına diğer çevresel izolatlardan çok daha fazla benzediği görülmüştür. Plazmidlerin virulensi etkiledikleri de düşünülmektedir ve Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)'lu hastalardan elde edilen izolatlardan sadece üç çevresel izolatın plazmid taşıdığının tespit edilmesi, plazmidlerin virulensi etkilediğini göstermiştir (Grange ve ark., 1990). Bu plazmidlerin moleküler ağırlıkları 8.8'den 160 megadalton (MD)'a kadar değişmektedir. Plazmid içeriğinin heterojenitesinde aynı plazmidlerin profil suşlarıyla nadiren karşılaşılmıştır. Plazmidlerin bağlandıkları MAI complex etkenlerinin; faj lizisi duyarlılığını belirlemeleri, civa ve bakır gibi ağır metal tuzlarına direnç ve koloni morfolojilerini belirlemek gibi bazı karakteristik özelliklerinden sorumlu oldukları görülmektedir (Falkinham, 1996).

1.2.3. Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı

Mikobakterilerin üzerinde en çok çalışılmış olan özelliklerinden birisi hücre duvarı ile hücre zarının yapı ve fonksiyonudur (Alsteens ve ark., 2008). Hücre duvarı

çözülebilir proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve üç çözülme-yen makromolekül komponentinden oluşur. Bu makromoleküller, arabinogalaktan, peptidoglikan ve mikolik asittir ve hücre duvarının “mikolarabinogalaktanpeptidoglikan kor yapısını (MAPc)” teşkil ederler. MAPc tüm mikobakterilerde bulunan iki lipopolisakkaritin (LPS) birini oluşturur (Brennan ve Nikaido, 1995). MAPc, mikobakterilerin ince bölümlerinde negatif boyama ile elektronca yoğun ve elektron geçirgen zonlar olarak görülür. Ayrıca hücre yüzeyindeki elektronca yoğun katmanlar çoğunlukla korun etrafını kuşatır. Bunun yanında tüm mikobakteriler lipoarabinomannan (LAM) olarak bilinen ikinci bir lipopolisakkarite sahiptir (Şekil 1.1). MAI complex’inin MAPc ve LAM yapıları oldukça immunojeniktir. Paralel hidrokarbon zincirlerinin kompleks dizisi mikobakterilerin impermeabilitesi için muhtemel kökendir. Kompleks lipidce zengin hücre duvarı ve kalın mikolik asit tabakası organizmayı aside dirençli hale getirir ve dilue bir asitle hafifçe yıkandıktan sonra fuksin gibi arilmetan boya-larla boyanamazlar (Lederer, 1971; Inderlied ve ark., 1993).



Şekil 1.1: Mikobakterilerde hücre duvarı yapısı (Bu şekil, hücre duvarı konusunda yazılan makale (Alsteens ve ark., 2008) kullanılarak, yazarın öneri ve izinleri ile Microsoft Windows Paint Programı 6.1 adlı yazılımla oluşturulmuştur.)

1.2.4. Koloni Morfolojisi ve Gelişme Gereksinimleri

MAI complex suşları, iki-dört haftalık inkubasyon sonrası yaklaşık 1 mm çapında taşkın ya da aralıklı koloni gelişimi gösterirler. Bazı suşların kolonilerinin gözlenebilmesi için altı ay kadar zamana ihtiyaç vardır (Aranaz ve ark., 1997). Koloniler inci grisi renkte veya limon sarısı olabileceği gibi gelişme sırasında grimsi beyazdan yavaş yavaş açık toprak sarısına döner ve kültür yaşı arttıkça koyulaşırlar (Akay, 2002; Fulton ve Thoen, 2003).

Eğer inokulum bol miktarda bakteri içeriyorsa koloniler çok sayıda ve birleşmiş olacaktır. Koloniler küreseldir ve besiyerine penetre olmazlar. *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'in aksine *M. avium* 25-45°C'ler arasında gelişmekle birlikte en iyi ısı 39-45 °C'dir. Tüberküloz etkeni için tasarlanan özel besiyerinin saha materyallerinden izolasyon amacıyla da kullanılabilir. Eğer besiyeri gliserin içeriyorsa koloniler daha büyük olur ve genellikle piruvat içeren besiyerlerinde gelişim daha hızlıdır. *M. avium*'un bazı suşları ilk ve sonraki gelişimleri için büyütme faktörü olarak mikobaktine ihtiyaç duyarlar (Matthews ve ark., 1977; Fulton ve Thoen, 2003).

Katı besiyerindeki subkültürler 6-8 günde gelişirler ve 3-4 haftada maksimum boyuta ulaşırlar. Bu kültürler genellikle ıslak ve yağlı görünürler ve yüzey genellikle pürüzlüdür. Sıvı besiyerinde gelişim hem tüpün dibinde hem de sıvı yüzeyde şekillenir. Oluşum topaklanan memeli tüberkil etkeninin aksine tortulu süspansiyonun sallanmasıyla genellikle dağılabilir (Akay, 1980; Benson ve Ellner, 1993).

Mikobakterilerin birkaç koloni formu tanımlanmıştır ve yapılan deneysel çalışmalarda koloni çeşitliliğinin virulansta değişiklik yaptığı gösterilmiştir. *M. avium* kolonileri kanatlılar için virulent iken bunun aksine kubbemsi veya pürüzlü koloniler kaynağı ne olursa olsun avirulenttir (Kuze ve Uchihira, 1984; Fulton ve Thoen, 2003).

M. genavense son yıllarda identifiye edilen ve kuşlarda klinik ve histopatolojik olarak MAI complex benzeri bir hastalık tablosuna neden olan, genetik olarak farklı bir türdür (Antinoff ve ark. 1996; Portaels ve ark. 1996; Ramis ve ark. 1996). Löwenstein-Jensen, katkı maddesi olmayan Middlebrook (MB) 7H10 ve 7H11 gibi standart katı besiyerlerinde gelişme göstermez. Bunun yanında sıvı kültürde hızlı ve çeşitli şekillerde gelişir. İlk izolasyonları için BACTEC 13A medium, MACTEC prizinamidaz test mediumu, Middlebrook 7H9 medium, Middlebrook 7H12 medium gibi sıvı besiyeri gerektirir ve 3-12 haftada gelişme gösterir. Asitli besiyeri ilk izolasyonunda gelişimi kolaylaştırır. Gözle görülür koloniler Mycobactin J (MJ) ilave edilmiş MB 7H11 besiyerinde 3 ila 9 haftada ortaya çıkar ve gelişme çok küçük, şeffaf, nonfotokromojenik koloniler şeklindedir. Koloniler kültür yaşıyla birlikte daha yoğun ve kremsi veya düz ve kuru şekle dönüşür. Bunun yanında *M. genavense*'nin subkültürü mikobaktin J katkılı MB 7H11 katı besiyerinde yapılabilir ancak gelişmenin oldukça zayıf, çok yavaş ve çeşitlilik gösterebileceği unutulmamalıdır (Böttger ark., 1993; Hoop ve ark., 1993).

Yaklaşık 20 yıl öncesine kadar kuşlarda çoğu mikobakteriyozis olgusunun MAI nedenli olduğu varsayılmaktaydı. Hatta 1990'dan önce kuşlardan kültüre edilen saptanabilir mikobakterilerin çoğu *M. avium* iken, bu tarihten önce yapılan birkaç çalışmada mikobakteriyel kültürde gelişme göstermeyen mikobakterilerden de bahsedilmiştir (Keymer ve ark. 1982). Bu olguların çoğunun, özel gelişme ihtiyaçları gösteren ve nazlı üreyen bir organizma olan, kültürü zor olduğu için yakın bir geçmişte DNA problemleri ile saptanmış *M. genavense* ile ilişkili olduğunu düşünmek gerekir. Bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler ile ev kuşlarının arasında oluşabilecek zoonotik potansiyel bu bakterinin hızlı tanı ve ayırım metodlarının önemini ortaya koymaktadır (Coyle ve ark., 1992; Kiehn ve ark., 1996; Mendenhall ve ark., 2000; Tell ve ark. 2001).

1.2.5. Biyokimyasal Özellikler

Kanatlılar için virulent olduğu bilinen *M. avium* serovar 1, 2 ve 3 arasında herhangi bir biyokimyasal farklılık olmadığı, son zamanlarda *M. intracellulare* olarak adlandırılan serovar 4-20'nin kanatlılar için az virulent olduğu görülmektedir (Huebner ve ark., 1993).

Niasin üretmeyen ve Tween-80'i hidroliz etmeyen *M. avium*, peroksidaz negatiftir, katalaz üretir, üreaz veya arilsülfatazı yoktur ve nitrat üretmez. *M. avium* pirazinamidaz ve nikotinamidaz dışında çoğu amidazdan yoksundur. MAI complex üyeleri tuzlu (% 2'ye kadar) ve tuzsuz suda iyi gelişme gösterirler. Non-tüberküloz mikobakteriler ağır metallere karşı göreceli olarak dirençlidirler (Thoen, 1994; Falkinham, 1996).

M. genavense diğer yavaş gelişen mikobakterilerden; sıvı besiyerinde ve daha hızlı gelişmesi, standart (katkı maddesi olmayan) katı besiyerlerinde gelişme göstermemesi ve küçük aside dirençli kokobasil şeklindeki karakteristik morfolojik görünüşü ile ayrılabilir (Lucas ve ark. 2000). *M. genavense* katı besiyerinde diğer mikobakteriler gibi gelişemediği için, diğer mikobakterilerle karşılaştırmak için uygulanan biyokimyasal testlerin de bir kısmı gerçekleştirilememektedir. Bununla birlikte MB 7H11'de yapılan testlere göre, *M. genavense*'nin katalaz, pirinamidaz ve ureaz pozitif, nikotinik asit ve tween hidrolaz yönünden negatif olduğu bilinmektedir (Böttger ve ark. 1993). Bu durumda, *M. avium* ve *M. genavense* katalaz ve üreaz testleriyle biyokimyasal olarak ayrılabilirler (Çizelge 1.2) (Wayne ve ark., 1986; Coyle ve ark., 1992).

Çizelge 1.2. *M. avium* subsp. *avium* ve *M. genavense* biyokimyasal özellikleri

Özellik:	<i>M. avium</i>	<i>M. genavense</i>
Farklı sıcaklıklarda üreme:		
24°C	±	±
31°C , 37°C, 42°C	+	+
Pigment	N	N
Niacin	-	-
Nitrat	-	-
Katalaz (Semiquantitative)	-	+
Katalaz (68°C)	±	+
Tween hidroliz	-	-
Arilsulfataz	±	-
Urease	-	+
Pyrazinamidase	+	+

(-): negatif; (±): değişken; (+): pozitif N: nonpatokromojenik

1.3. Epidemiyoloji

Mycobacterium avium complex tarafından oluşturulan infeksiyon primatlar, ruminantlar, karnivorlar, diğer monogastrik hayvanlar, tavşanlar ve kanatlılarda tanımlanmıştır (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3: Çeşitli kuş ve memeli türlerinin *M. avium* complex serotiplerine duyarlılıkları (Thoen, 1997; Fulton ve Thoen; 2003; Dhama ve ark., 2011).

TÜRLER	MAC SEROTİPLERİ	DUYARLILIK
Evcil kanatlılar (<i>Gallus domesticus</i>)	1,2	Yüksek
Hindi	1,2	Orta
Sülün	1,2	Yüksek
Vahşi kuşlar	2,3	Yüksek
Sığır	1,2	Orta
Domuz	1,2,4,8	Yüksek
Tavşan	1,2	Yüksek
İnsan	1,4-20 23,25	Düşük (sağlıklı bireylerde) Yüksek (bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde)

Kuşlar. Hastalık kuşlarda *M. genavense* ile *M. avium*'dan daha hızlı başlar. İnsanlarda ise *M. avium* ve *M. genavense*, daha çok immunsupresif bireylerde, tedaviye yanıt vermeyen progresif karakterli bir hastalığa neden olur (Tell ve ark., 2001; Bougiouklis ve ark., 2005; OIE, 2008). İsviçre'de *Mycobacterium* spp. ile infekte kuşlarda 9 yıl süren identifikasyon çalışmaları boyunca, *M. genavense* (%71.8) en yaygın tür olarak tespit edilirken, bunu *M. avium* complex (%16.7), *M. fortuitum* (%4.2), *M. tuberculosis* (4.2), *M. gordonae* (%2.2) ve *M. nonchromogenicum* (%2.2) izlemiştir (Holsboer-Buogo ve ark., 1997).

Kanatlı tüberkülozu, hayvanat bahçesi koleksiyonları ve vahşi kuşlarda, evde bakılan kuşlara oranla daha fazla görülmektedir. Kuş sınıflarında duyarlılık farklılık gösterse de tüm kuş türleri mikobakteriyozisten etkilenirler (Kauppinen ve ark., 2001; Dvorska ve ark., 2007). Kanatlı tüberkülozu evcil ve yabani ördekler (*Anas* spp.), kazlar (*Anser* spp.), kuğular (*Cygnus* spp.), tavus kuşları (*Pavo* spp.), sülünler (*Phasianus colchicus*), flamingolar (*Phoenicopterus* spp), bıldırcınlar (*Coturnix* spp.), keklikler (*Alectoris* spp.), güvercinler (*Columba* spp.), kumrular (*Streptopelia decaocto*), hindiler (*Meleagris* spp), av kuşları ve diğer kafes ve/veya vahşi kanatlılarda bildirilmiştir (Kock ve ark., 1999; Bougiouklis ve ark., 2005). Hastalık, papağanlar, Avustralya papağanları, muhabbet kuşları, ispinozlar (*Taeniopygia* spp.), sinek kuşları ve kanaryaları da etkileyebilir (Fulton ve Thoen, 2003). *M. tuberculosis* ile oluşan infeksiyon papağangillerde oldukça sık görülmektedir ve genelde kuşun yüz ve kafa bölgesindeki büyüme türü değişikliklerle şüphelenilmelidir (Peavy ve ark., 1976). Bu infeksiyonlar hayvan sahiplerini de yakından ilgilendirir. Bir vakada aynı evdeki iki bireyde aktif tüberküloz saptandıktan dört yıl sonra sahip oldukları papağandan *M. tuberculosis* izole edilmiştir. Kuş sahipleri kuşu ağızlarından besleyerek infekte etmişlerdir (Washko ve ark., 1998).

M. avium'un kanatlılarda tüberküloz oluşturması türe göre çeşitlilik göstermektedir. *Anseriformes* (kazsılar), *Falconiformes* (kartalsılar / gündüz yırtıcı kuşları), *Galliformes* (tavuksular), *Columbiforme* (güvercinler), *Charadriiforme* (yağmur kuşları), *Gruiforme* (turnamsılar), *Passeriformes* (ötücü kuşlar) ve

Psittaciformes (papağansılar) gibi kuş türleri özellikle duyarlılık gösterir. Psittasin kuşlar arasında, kanatlı tüberkülozu ile en sık karşılaşlan türler muhabbet kuşları ve papağanlardır. Genellikle infekte olan passerin kuşlar kanaryalar, isketeler (*Carduelis* spp.), tukanlar (*Ramphastos tucanus*), cennet kuşları (*Viduaparadisea*) ve dokumacı kuşudur (*Philetairus socius*) (Van der Heyden, 1997a; Panigrahy, 1983). Kazlar kanatlı tüberkülozunda ördek ve kuğulara göre daha düşük insidense sahiplerdir (Cromie ve ark., 1993). Flamingoların *M. avium*'a göreceli olarak dirençli olduğu bildirilmiştir (Cromie ve ark., 1991). Kuzey Amerika'da bir hayvanat bahçesinde flamingolar üzerinde 20 yıl boyunca yapılan bir çalışmada kanatlı tüberkülozuna rastlanmamış, ancak 1991 yılında yaşlı bir flamingo nekropsisinde tüberküloz lezyonları gözlenmiştir. Ardından sürüdeki diğer flamingolara uygulanan laparoskopik ve radyolojik incelemeler sonucunda hiçbir flamingoda kanatlı tüberkülozu bulgusu gözlenmemiştir (Zsivanovits, 2001).

Nadir olmasına rağmen infeksiyon ve hastalık, kanatlı tüberkülozunun tavuklarda yaygın olduğu kümes çevresiyle ilişkili vahşi kuşlarda da gözlenebilir. Sülünlerin (*Phasianus colchicus*) alışılmadık şekilde *M. avium*'a karşı duyarlı oldukları görülmektedir (Hsieh ve ark. 2009). Hastalık serçe (*Passer domesticus*.), karga (*Corvus macrorhynchos*), peçeli baykuş (*Tyto alba*.), inek kuşu (*Molothrus ater*.), karatavuk (*Turdus merula*), sığırcık (*Sturnus vulgaris*.), kanada kazı (*Branta canadensis*), yaban hindisi (*Meleagris gallopavo*) ve turnalarda (*Anthropoides virgo*) da incelenmiştir. Kanatlı tüberkülozu hayvanat bahçelerinde tutulan deve kuşları (*Struthio camelus*), Avustralya (emu) (*Casuarus emeu*) ve Amerikan deve kuşlarında (*Rheidae americana*) bildirilmiştir. Son zamanlarda tüberküloz 3 yaşında dişi bir emuda da tanımlanmıştır. Kanatlı tüberkülozu hindilerde sıklıkla rapor edilmemesine rağmen genellikle infekte tavuklarda bulaşır (Bowes, 1993; Tell ve ark., 2001).

M. intracellulare'nin çoğu suşu özellikle kuşlar için patojenik değildir, fakat, virulent suşlarla da ara sıra karşılaşmaktadır (Grange ve ark., 1990). MAI complex ile kıyaslandığında *M. genavense* kuşlardan çok daha seyrek izole edilebilmektedir. Bu durum etkenin izolasyonunda ortaya çıkan güçlüklerle bağlanmaktadır (Portaels ve ark., 1996).

Memeliler. *M. avium* bazı evcil memelileri de infekte ederek hastalığa neden olabilir ancak lezyonlar genellikle sınırlıdır. Mikroorganizmalar uzun sürede dokularda çoğalabilir ve tüberküline karşı hassasiyet oluşturabilir. Tavşan ve domuzlarda da *M. avium* nedenli yaygın tüberküloz bildirilmiştir. Memelilerde doğal infeksiyon kanatlılarda gelişenlerle karşılaştırılabilir şiddette olmayabilir, yapay infekte etkenin uygulanmasıyla pek çok memeli türünde kapsamlı değişiklikler yaratılabilir. Amerika ve Avrupa’da domuzlardaki tüberküloz lezyonlarının yaygın nedeni *M. avium* serovar 2’dir (Fulton ve Thoen, 2003). *M. avium* complex ve *M. intracellulare* domuz, sığır, geyik, koyun, keçi, at, köpek ve egzotik türler gibi daha kapsamlı bir tür çeşitliliğini infekte edebilir. *M. genavense* bir köpek ve bağışıklık sistemi baskılanmış bir kedide de rapor edilmiştir (Lucas ve ark., 2000).

1.3.1. Hastalığın kafes kuşları için önemi

İnfeksiyonun yavaş gelişimi süresince, kuşlar tüberküloz etkenini dışkıları ile çevreye yaymaktadırlar. Memeliler gibi kuşlar da aylar boyunca klinik bir bulgu göstermeyebilir ve infeksiyon kaynağı olarak görülmeyebilirler. Serçe, güvercin, sığırcık ve martı gibi vahşi kuşlar hastalığı bir bölgeden diğerine taşıyabilirler (Tell ve ark., 2001).

Mikobakteriyozis sulak arazi civarlarında, hayvanat bahçeleri veya kültür koleksiyonları gibi kuşların yoğun bulunduğu bölgelerde daha sık görülür. Hastalık sürüye bir kez girdiğinde, tanıdaki güçlükler ve etkenin dirençli yapısı dolayısıyla eradikasyonu oldukça zordur. Bu durumda hastalık sürü için uzun süren, infertiliteyi düşüren ve ergin kuşların ölümüyle sonuçlanabilen bir hal alır. Bu durumda kuşların alım satım veya değişiminde sakıncalar ortaya çıkacak, vahşi hayata salınamayacaklar ya da hayvanat bahçeleri gibi başka kuşlarla aynı bölgeyi paylaşacakları farklı ortamlara alınamayacaklardır (Montali ve ark., 1976).

1.3.2. Cinsiyet ve Yaş Faktörü

Erkek ve dişi kuşların mikobakteriyel enfeksiyona eşit derecede duyarlı oldukları görülmektedir (Keymer ve ark., 1982; Cromie ve ark., 1991). Dahası, papağan ve ötücü kuşlarda mikobakteriyozis dişilerde erkeklere oranla daha fazladır (Panigrahy ve ark., 1983).

Mikobakteriyozis ergin kuşlarda gençlere oranla daha sık saptanmaktadır. Hastalığın İngiltere’de su kuşları koleksiyonunda bulunan kuğularda sürdürülen retrospektif bir çalışmasında mikobakteriyozis ergin kuğuların %33’ünde ve daha küçük kuğuların %4’ünde ölüm nedeniyle yeni çıkan kuğularda ölümcül değildir. Bununla birlikte bu ve diğer çalışmaların bulguları genç veya yaşlılar arasındaki duyarlılığından çok hastalığın kronik ve gizli doğasını yansıtmaktadır. Sekiz haftalık tavuklarda yapılan uygulama çalışmaları genç kuşların mikobakteriyel enfeksiyonlara daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Cromie ve ark., 1991).

1.3.3. Bulaşma

Kontamine çevre, özellikle de toprak ve atıklar enfekte olmayan hayvanlar için en önemli bulaşma kaynağıdır. Büyük arazilerde fazla hayvan olması sebebiyle enfeksiyon oranı da artar (Fulton ve Thoen, 2003).

M. avium toprakta 4 yıla kadar, 1 metreye kadar olan derinlikteki karkasta 27 ay boyunca canlılığını sürdürebilir. *M. avium*’un virulent suşlarının talaşta 20°C’de 168 gün ve 37°C’de 244 gün canlı kalabildiği tespit edilmiştir. Doğal enfekte olan tavukların yumurtalarından *M. avium* izole edilmiştir fakat yumurtadan çıkan civcivlerde kanatlı tüberkülozu gelişmez. Altı dakika kaynatılmış yumurtada *M. avium* bulunmaz ve çırpılmış yumurtanın 2 dakika boyunca kızartılması bakteriyi öldürmek için yeterlidir. Ayrıca, *M. avium*’un vertikal bulaşmayla ve yumurta kabuklarının fekal kontaminasyonu ile ördek embriyolarına geçebileceği tespit edilmiştir (Tell ve ark., 2001; Fulton ve Thoen, 2003).

MAI complex ve diğer pek çok mikobakteriyel tür çevrede serbest olarak yaşarlar. Isı, pH, tuz ve oksijen basıncının uç noktalarına dahi toleranslarından dolayı, bataklık, gölet, göl, nehir ve kıyı deniz sularında da bulunurlar. Özellikle sellerden sonra ortaya çıkabilen bataklık tarzında nemli ve asidik toprak, mikobakteriler için bir diğer doğal yaşam ortamıdır. Aynı zamanda bitkiler, hayvan altlıkları ve ev atıklarında da bulunabilirler. Gruft ve ark. (1979) tarafından yapılan bir çalışmada, okyanus suları MAI varlığı yönünden incelenmiş ve pozitif bulunmuştur.

MAI complex suşları düşük tuz içeren sularda deniz suyuna oranla daha yoğun bulunmuştur. Aerosol deneyleri MAI complexin aerosoller ile taşınabildiğini ve bakteri içeren 0.7 – 3.3 mm büyüklüğündeki parçacıkların ciğerlere girerek alveolar alana ulaşip yayılabildiğini göstermiştir (Parker ve ark., 1983). MAI complex aynı zamanda su borularına da kolonize olabilir (Grange ve ark., 1990). MAI complexin ağır metallerle karşı dirençlilik çalışmaları, *M. avium*, *M. intracellulare* veya *M. scrofulaceum*'un bazı izolatlarının kadmiyum, civa, gümüş, tellurite tam; klorine ise kısmi direnç gösterdikleri saptanmıştır (Falkinham, 1996). *M. avium* complex'in türleri çöplerden, atıklardan, saksı bitkilerinden, yataklık malzemeden ve sigaralardan kültüre edilmiştir (Gruft ve ark., 1979; Tell ve ark., 2001).

İnfekte vahşi kuşlar; pet kuşları, egzotik kafes kuşları ve diğer kanatlılar için önemli bir enfeksiyon kaynağıdır (Portaels ve ark., 1996; Painter, 1997). Araştırmacılar tüberkülozlu kanatlı sürüleri ve çevre alandaki vahşi kuşlarda enfeksiyon şiddeti arasında bir ilişki saptamışlardır. Bu bulgu, hastalığın yabani kanatlılardan mı evcillere, yoksa evcil kanatlılardan mı vahşi kuşlara geçtiği sorularını akla getirmektedir. Çeşitli türlerin beslenme alışkanlıkları da patojenik mikobakterilere maruz kalma oranını yükseltir. İngiltere'de su kuşlarında yapılan bir araştırmada, beslenme alışkanlıkları mikobakteriyozisin insidensini arttırırken beslenme türü değiştirmemiştir. En düşük insidens otçul kuşlarda ve en yüksek insidens ise dalgıç kuşlarda, özellikle de deniz ördeklerinde bulunmuştur. Araştırmacılar tarafından bu durum, otçul kuşların dışkıyla kirlenmiş kontamine besin seçiciliği ve otların güneşin

ultraviole radyasyonu ile sterilizasyon etkisinden kaynaklanmakta şeklinde açıklanmaktadır (Cromie ve ark., 1991; Van der Heyden, 1997b).

Bir diğer ilginç bulgu da Cromie ve ark. (1991) tarafından yapılan araştırmada, yüzeysel sularda dalıp çıkan ve suyla oynayan bir kaç ördekte pulmoner mikobakteriyozise rastlanmasıdır. Suyun serpme tarzında havalanması mikobakteriyi havaya karıştırabilir ve inhalasyonu şekillenir. Belçika'da Antwerp Hayvanat Bahçesinde yapılan bir *M. genavense* araştırmasında çoğu kuşta kapsamlı bir akciğer invazyonu görülmüştür (Portaels ve ark., 1996). Diğer olası mikobakteriyel bulaşma kaynakları keneler, rodentler, uçan haşere larvaları ve çiftleşmedir (Kovalev, 1983).

Mikobakterilere duyarlılık konakçının immun yanıtı ile yakından ilişkilidir. Mikobakteriler konakçı makrofajlarında yaşayabilirler ve yıllar boyu subklinik seviyede bu şekilde bulunabilirler. Konakçının immun sistemi baskılandığında ise etken baskın hale gelebilmektedir. Diğer faktörler yaş ve cinsiyet olarak belirtilebilir. İki yaşın altındaki kuşlarda hastalık daha seyrek görülmekteyken daha yaşlı su kuşları ve kanatlılarda daha sık ortaya çıkmaktadır. Bu durumun uzun inkubasyon periyodu ve baskılamış bağışıklık sistemi ile ilgili olduğu söylenebilir (Montali ve ark., 1976; Panigrahy ve ark., 1983; Cromie ve ark., 2000).

1.3.4. İnfeksiyon Yolu ve Yerleşimi

Kuşlarda infeksiyon genellikle beslenme esnasında oluşur. Kuşlar arası yayılım sıklıkla mikobakteri ile kontamine toprak ve suyun ağız yoluyla alınması ile şekillenir. Nadiren akciğer tüberkülozu görülmekle birlikte lezyonlar genellikle karaciğer, dalak ve bağırsaklardadır. Sıklıkla kemik ve eklemler de lezyon bakımından hastalıkla ilişkilendirilebilir. Bunun yanında ağız boşluğu, üst solunum sistemi, akciğerler ve hava keseleri, deri, kemik iliği, yumurtalıklar, kalp, kloaka, iç organların serozal yüzeyleri ve çok nadiren böbreklerle pankreas da etkilenebilmektedir (Montali ve ark., 1976).

1.3.5. Potansiyel Zoonotik Önem

Tüberküloz, dünyada en sık ölüme neden olan infeksiyonlardan birisidir. Dünya nüfusunun 1/3'ü enfekte olmakla birlikte, her yıl yaklaşık 9 milyon yeni tüberküloz olgusu ortaya çıkmaktadır. Bildirimlerin %95'inden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde olmakta ve yılda 1,8 milyon hastaya ulaşamadığı için tedavileri yapılamamaktadır. İnfeksiyon kaynaklı önlenabilir erişkin ölümlerin %26'sı tüberkülozdan kaynaklanırken, tedavi olmamış her hasta yılda 10-15 kişiyi enfekte edebilmektedir (WHO, 2010).

Nadiren de olsa, MAI complex ve *M. genavense* insanlarda da hastalığa neden olabilmektedir. AIDS hastaları gibi bağışıklık sistemi zayıflamış insanlar ve küçük çocuklar daha duyarlı gözükmetedir (Nadal ve ark., 1993; Böttger, 1994). Sinantropik kuşlarla (örn. pet kuşları, güvercinler, ördekler ve diğer türler gibi aynı ortamda veya yakın bulunan) ilişkili insanlarda potansiyel mikobakteriyozis kaynağını oluşturmaktadır. Bunun yanında mikobakteriler çevresel saprofit oldukları ve insanlarla saprofitik kuşlar aynı çevreyi paylaştıkları için en uygun tanımlama ortak çevredir. Boian ve ark. (1997) ile Böttger (1994), insan ve kuşlarda *M. genavense*'yi doğadan alınmış fırsatçı patojen olarak değerlendirmişleridir (Schmidt ve ark., 2008).

MAI complexi tarafından oluşturulan hastalık tüm dünyada görülmesine rağmen kuzey ülkelerinde daha sık bildirilmiştir (Inderlied ve ark., 1993). Hastalık, genellikle kuş ve memelilerde çevresel kökenli gözlenir ve insandan memeliye veya memeliden insana geçmez (Wayne ve Sramek, 1992).

Çevresel kaynaklar, özellikle de su, hastalık açısından insanlar için büyük risk teşkil eder. İnsanlardan izole edilen bazı serotipler diğer memeli ve kuşlardan da izole edilmiştir ancak son zamanlarda yapılan moleküler temelli araştırmalar, serotipler arasında önemli farklılıklar ortaya koymuştur (Hoop, 1997). Kuşlarda *M. avium* serotip 1, 2 ve 3 başlıca hastalık etkeni iken, AIDS'li insanlarda hastalık sıklıkla serotip 4 ve 8 kaynaklıdır. (Inderlied ve ark., 1993). *M. avium*'un kuştan

direkt insana bulaştığına dair yazılı bir kaynak yoktur. Çocuklarda ve AIDS'li yetişkinlerde MAI complex infeksiyonunun kökenini araştırmak için DNA problemleri ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar, çoğu infeksiyonun çevrede lokalize olarak bulunan benzer serotiplerle olduğunu açığa çıkarmıştır (Daborn ve Grange, 1993). Musluk suları, toprak veya yiyeceklerin AIDS'li hastaların non-tüberküloz mikroorganizmalarla karşılaşma yolu olduğu belirtilmektedir (Benson ve Ellner, 1993). Çalışmalar evsel atıklardan izole edilen suşların yarısının insanlar için potansiyel patojenik olduğunu göstermiştir. Aynı mikobakteriyel türlerin hayvan ve hayvan dışkılarından izole edilmiş olmasına rağmen bu hayvanlar nadiren insan infeksiyonu için rezervuarlardır (Hoop, 1997).

AIDS'li hastalarda MAI complex infeksiyon prevalansı artmaktadır. RFLP (Restriction-fragment-length polymorphism) analizleri MAI complexin Amerika ve Avrupa izolatlarının genetik olarak benzer ve Afrika izolatlarından farklı olduğu bildirilmiştir (Benson ve Ellner, 1993; Hoop, 1997). İnsanlarda başlıca dört hastalık tipi ortaya çıkmaktadır; (1) inokulasyonu takiben lokal lezyonlar, (2) özellikle çocuklarda servikal lenf nodülünde ortaya çıkan lokalize primer lenfadenit, (3) predispose koşullarla ilişkili pulmoner infeksiyon ve (4) genellikle immunsupresyonla ilişkili yaygın hastalık. *M. avium* ve *M. genavense*'nin immun sistemi baskılanmış bireyler ve çocuklara bulaşması küçük bir ihtimal dahilinde de olsa, bu kişilerin potansiyel infekte kuşlardan ve bulundukları çevrelerden uzak tutulmaları gerekmektedir (Falkinham, 1996; Biet ve ark., 2005). *M. tuberculosis*'de kuşlarda infeksiyona nadiren neden olmakla birlikte, özellikle papağanlarda ortaya çıkmakta ve sahipleri ile yakın temasta bulunan bu kuşlar insanlar için potansiyel bir rezervuar olarak değerlendirilebilmektedir (Schmidt ve ark., 2008).

1.4. Klinik Belirtiler

Klinik bulgular patognomonik değildir. Tipik fiziksel bulgular kas atrofisi ile kilo kaybı, anoreksi, depresyon, diyare, poliüri, anemi, düşkünlük, solgunluk, zayıf tüy yapısı, kaşeksi, abdominal şişlik, aksama, ayaklarda şişlik, subkutan veya konjunktival kitleler, kutanöz lezyonlar ve egzama olarak sıralanabilir. Dispne, akciğer veya hava keseleri yerleşiminde ortaya çıkabilir. Tarsal yaralanmalar gözlenebilir (Panigrahy ve ark, 1983; Van der Heyden, 1997a).

Kilo kaybının sindirim ve emilim bozukluğundan kaynaklandığı söylenebilir. Dışkı genelde yumuşaktır. Sindirilmemiş yiyecekler, mukus ve yağ globülleri dışkı muayenesinde dikkat çekici olabilir. Bağırsak yangısı şekillenmişse dışkı, hemoglobin, kırmızı ve beyaz kan hücreleri bakımından da zengin olabilir. Primer renal katılım poliüriye sebep gösterilir. Karaciğer ve ince bağırsakların organomegalisi ile karın bölgesinde gerginlik olabilir. Özellikle karın kaslarının zayıf olduğu durumlarda karın bölgesindeki tüyler ıslatılarak burası palpe edilirse karaciğerde büyüme kolaylıkla fark edilebilir (Hines ve ark, 1995).

İlerlemiş infeksiyonlarda kuşlar halsiz ve deprese görünümündedirler. Yem alımları iyi olsa da sıklıkla atrofiye göğüs kasları görünümü ile kilo kaybı şekillenir ve omurgalar ortaya çıkar. Aşırı ilerlemiş olgularda diğer normal kuşlarla kıyaslandığında yüzde küçülme de gözlenir. Tüyler donuklaşmış gibidir ve karışıktır. Sakal ve ibikler küçülmüştür. Bazen de ibik ve sakallarda mavimsi bir renk değişimi olur. Karaciğer hasarı sonucunda ikterus gözlenebilir (Thorel ve ark., 1997).

Hastalığın ağır seyrinde bile etkilenen kuşların vücut ısıları normal değerlerdedir. Çoğu olguda kuşlarda tek taraflı topallama vardır ve kendine has silkindili bir sekme tarzı gözlenir. Lezyonlar rupture olabilir ve kazeöz materyal dolu sıvı boşalır. Tüberküloz arthritisinden dolayı paraliz de şekillenebilir. Belirli yöntemler ile bağırsaklar içindeki nodüller palpe edilebilir. Bunun yanında tüberkülozlu çoğu kuşta görülen karaciğer büyümesi bu işlemi zorlaştırabilir veya imkansız hale getirebilir. Bağırsak nodulleri ülseratif olabilir ve bu durum ishal ile

sonuçlanır. Etkilenen kuşlar hastalığın seyrine göre birkaç ay içinde ölebilir ya da çoğunlukla yaşamlarını sürdürürler. Etkilenen karaciğer ya da dalağın rupturu sonucu oluşan hemoraji ile kuş aniden ölebilmektedir (Thoen, 1994; Hoop ve ark., 1997).

Bir diğer ilginç bulgu da, etkilenen bazı kuşların normal bir görünüm ve davranış şekline rağmen aniden ölmeleridir. Kuşlar birkaç gün veya hafta mikobakteriyozis belirtisi gösterdikten sonra ölebilirler. Kronik veya aralıklı şekillenen diyare mikobakteriyozisli kuşlarda oldukça yaygın gözlenir. Bu bulgu şu şekilde açıklanır; kuşlarda gerçekleşen doğal infeksiyonlarda oral-fekal yol en sık bulaşma yoludur ve bağırsak kanalı mikroskopik veya makroskopik lezyonların bulunduğu bölgedir. Van der Heyden (1997a), yaptığı fekal incelemelerde sindirilmemiş yem, mukus ve yağ globülleri bulmuş, hemoglobin veya lökositlerin de dışkıda bulunabileceğini açıklamıştır. Bir diğer sık rastlanan bulgu da genellikle kemik veya eklemlerle ilişkili topallıktır (Hoop ve ark., 1993; Portaels ve ark., 1996; Van der Heyden, 1997a; Tell ve ark., 2001).

Daha az sıklıkta karşılaşılan fakat geniş ölçüde bildirilen belirtiler, kutanöz, subkutanöz ve granulatöz oküler lezyonlardır (Pond ve Rush, 1981; Morita ve ark., 1994; Pocknell ve ark., 1996; Washko ve ark., 1998). Av kuşlarında kutanöz mikobakteriyel lezyonlar daha sık kanat, göğüs veya boyunda bulunur. Şahinlerde ayak apseleri sıklıkla mikobakterilerle infekte olmaktadır (Smit ve ark., 1987).

Dispne ve diğer solunum bulgularına çok rastlanmamasının sebebi muhtemelen hastalığın kuşlarda akciğer ilişkili olmayışdır (Hoop ve ark., 1993; Portaels ve ark., 1996). Hırıltılı dispne birkaç olayda bildirilmiş, klinik ve nekropsi bulgularında infraorbital sinuslar, orofarenks ve tracheada granulatöz oluşumlara rastlanmıştır (Antinoff ve ark., 1996; Hofer ve ark., 1996). Sinirsel belirtiler nadiren bildirilen vertebral veya merkezi sinir sistemine yerleşimi sonucu ortaya çıkan bulgulardır (Tell ve ark., 2001).

Mikobakteriyozis, çoğu infekte kuşun, özellikle hastalığın başlangıcında klinik olarak normal görünmesi dolayısıyla sürüde sinsi seyreden bir sorundur. Pek çok

salgın bildirilmesine rağmen, devam eden hastalık ve/veya bir iki kuşun periyodik ölümlerine çok daha sık rastlanılır (Pond ve ark., 1981; Ramis ve ark., 1996; Painter, 1997; Silvia-Krott ve ark., 1998).

Kanatlı mikobakteriyozisi; aspergillozis, koligranuloma, intestinal koksidiozis, lenfoid leukozis, Marek hastalığı, tifo ve neoplastik hastalıklarla karışmaktadır. Hastalığın ayrımı başta mikroskopik olarak etkenin aside dirençli özelliği olmak üzere bakteriyolojik yoklamalarla kolaylıkla yapılabilir (Akay, 1999).

1.5. Patolojik Bulgular

1.5.1. Makroskopik Bulgular

Pet kuşlarında üç tür mikobakteriyel patolojik bulgu tablosu gözlenmektedir: (1) *atipik*, etkilenen organların diffuz genişlemesiyle karakterize fakat nodüler lezyon içermeyen; (2) *lepramatöz*, nodüler-diffuz subkutanöz lezyonlar içeren; (3) *tüberküler*, iç organların içinde ve yüzeyinde aralıklı granulatöz nodüller içeren fakat memeli tüberkülozunda görülen fibröz kapsül içermeyen lezyonlardır (Montali ve ark., 1976).

Atipik mikobakteriyozis, pet kuşlarında en sık rastlanılan patolojik bulgu tablosudur ve genellikle *M. avium* ve *M. genavense* infeksiyonlarında karşılaşılır. Her üç tablo aynı kuşta gözükebileceği gibi bir tanesi de ortaya çıkabilir (Panigrahy ve ark. 1983). Yapılan çalışmalar son yıllarda *M. genavense*'nin pet kuşlarında atipik mikobakteriyozis nedeni olduğuna dikkat çekmektedir (Hoop ve ark., 1996).

Lezyonlar sıklıkla karaciğer, dalak, bağırsaklar ve kemik iliğinde gözlenir. Kalp, ovaryumlar, testisler ve deri gibi bazı organ ve dokular nadiren etkilenir. Özellikle ördek ve güvercinler için lezyonlar karaciğer ve dalakta baskındır ancak diğer pek çok organda da görülebilmektedir (Thoen, 1994).

Kanatlı tüberkülozu lezyonları, karaciğerde, dalak ve bağırsaklarda iğne ucundan birkaç santime değişen, düzensiz grimsi sarı veya grimsi beyaz lezyonlar olarak tanımlanmaktadır. Karaciğer ve dalak büyüme gösterir ve ruptura bağlı ölümcül hemoraji ortaya çıkar. Küçük nodüllerin etkilenen organ yüzeyinde gelişmesiyle oluşan geniş nodüllerde yumrulu kenar yapısı vardır. Nodüller sert olmasına rağmen kolay kazınırlar. Mineralleşme nadirdir. Bir nodül, kesit yüzeyinde çok sayıda küçük sarımsı odaklar veya fibröz kapsülle sarılı tek bir sarımsı yumuşak kazeöz alan içerir. Fibröz kapsül, boyut ve hastalık dönemine bağlı olarak çeşitli kalınlık ve yoğunlukta şekillenebilir. Bağırsakların serozal yüzeyinde kabarıklık, katı ve beyaz lezyonlar olabilir. Karaciğer ve dalağın yanında akciğerlerin hastalıkla ilişkisi çok daha azdır. Granulom oluşumu, sıklıkla kemik iliğindedir. Kemik iliği infeksiyonu muhtemelen hastalığın çok erken dönemlerinde başlayarak bakteriyemi nedenli olmaktadır (Montali ve ark., 1976). Papağangiller, ötücü kuşlar, güvercinler ve kazların *M. avium* infeksiyonlarında etkilenen organlar aralıklı granulomlardan ziyade difuz histiositik genişlemelere eğilim gösterir (Van der Heyden, 1997a).

1.5.2. Mikroskopik Bulgular

Evcil kuşlarda MAI complex infeksiyonları genellikle bağırsak kanalında multiple tüberkül-benzeri lezyonlara sebep olur. Erken dönem lezyonları köpük görünümlü sitoplazmaya sahip epitelooid makrofaj kümelerinden meydana gelir. Odak büyüdükçe merkez dağınık nükleer materyal içeren nekrotik ve eozinofilik bir hal alır (Soler ve ark., 2009). Epitelooid makrofaj populasyonları granulom içinde gelişir ve çok çekirdekli dev hücreleri geliştirmek için periferine yapışır. Daha büyük nodüllerde granulomun merkezi koagulatif veya kazeöz nekroze olabilir. Büyük nodüllerde sadece çok çekirdekli dev hücreler nekrotik parça etrafında bir manto gibi kalabilir. Çok çekirdekli dev hücrelerin hemen periferisindekiler hem epitelooid hem de histiositik makrofajların toplamından oluşur. Fibrosit içeren bir fibröz kapsül ve çok ince kan damarları periferik alanın dış kısmında bulunur. Aside dirençli etkenler merkezde veya tüberkülin nekrotik alanında çok sayıdadır ancak epitelooid bölgenin

yanında ve çok çekirdekli dev hücrelerin çekirdeklerinde de bulunabilir. Granulomların en dış bölgesi fibröz bağdoku, makrofaj, bazı lenfositler ve nadiren granülosit ile kapsüle olmuştur (Bermudez, 1994; Thoen, 1994).

1.6. Laboratuvar Teşhisi

Kanatlılarda tüberküloz infeksiyonlarının laboratuvar teşhisinde, etkenin gelişme süresinin uzunluğu başta olmak üzere pek çok sorunla karşılaşmaktadır. Klinik belirtiler ve hematolojik anormallikler mikobakteriyozise özgü olmadığı gibi hastalığın ileriki safhalarına kadar ortaya çıkmayabilir (Tell ve ark., 2001).

Kültür ile izolasyon veya klinik örneklerden amplifikasyon ile etkeni saptama, etkenin çevresel olarak da bulunması sebebiyle aktif infeksiyon anlamına gelmemektedir. Mikrobiyolojik tanı için örnek toplanması, çevresel kontaminasyon açısından laboratuvar sonuçlarını maskeleyememesi için dikkatle gerçekleştirilmelidir. Örnekler soğuk zincirde taşınıp buzdolabında tutulmalı ve hızlıca işlenmelidir. Uzun bir süre işlenmeyecekse, örnekleri korumak için dondurmak çözüm olabilir (Aranaz ve ark., 1997; Tell ve ark., 2001). Kuşlarda tüberkülozun tanısı için kullanılan metodlar, süre, materyal, avantaj ve dezavantajları bakımından değerlendirilerek seçilmelidir (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4: Kuşlarda kullanılan tüberküloz tanı metotları ve testler (Thoen, 1997; Tell ve ark., 2001; Fulton ve Thoen, 2003; Tell ve ark., 2003b; OIE, 2008; Dhama ve ark., 2011)

TEST	MATERYAL	SÜRE	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Makroskopik lezyonların incelenmesi	Ölü kuş	1 saat	Kolay tanı	Yanılıcı olabilecek tanı
Aside dirençli bakterilerin tespiti için boyama	Ölü kuş	1 saat	Kolay ve hızlı tanı	Duyarlılığı az, türler arası ayırım yapılamaz
İzolasyon / Kültür	Ölü kuş	Ortalama 4 hafta	Kesin tanı	Uzun zaman gerektirir
Tüberkülin testi	Canlı kuş	48 saat	Hızlı tanı	Kuşlarda strese neden olur, süre bakımından uzundur, yanlış pozitif ve negatif sonuçlar verebilir
Aglutinasyon testi	Canlı kuş	Birkaç dakika	Serotip ayrımı yapabilir, çok sayıda kuş bulunan sürüler için uygundur	Zaman zaman yanlış pozitif sonuç verir, kafes kuşları için güvenilir değildir
ELISA	Canlı kuş	2 saat	Egzotik ve pet kuşları için kullanılabilir	Tüberkülin testinden daha az spesifitesi vardır, yanlış pozitif sonuçlar verebilir
DNA problemleri	Bakteri kültürleri	4-6 saat	Yüksek sensitivite ve spesifite	Prob genetik veya biyokimyasal olarak etkenle uyumlu olmayan izolatlarla tepkimeye girebilir
PCR	Canlı/Ölü kuş, Bakteri kültürleri	4 saat	Yüksek sensitivite ve spesifite	Özel laboratuvar ve deneyimli personel gerektirmektedir
RFLP	Bakteri kültürleri, Klinik örnekler	1 gün	Tür düzeyinde ayırım	Yetersiz miktarda gen parçalanmış fragmentlerin görünümünde zorluk yaratır
Multiplex PCR	Bakteriyel kültürleri, Klinik örnekler	5-8 saat	Hızlı ve pahalı olmayan, alttürleri tespit edebilen ve MAC için ayırıcı tanı yapabilen bir yöntem	Özel laboratuvar gerektirmektedir
16S rRNA gen sekans analizi	Bakteri kültürleri	2 gün	Türlerin ayrımında güçlü bir teknik	Fazla işgücü ve rutin tanıda zorluklar ortaya çıkarır
HPLC	Bakteri kültürleri	1 gün	Mikobakteri izolatlarını tür seviyesinde tanımlayabilme	Pahalı ekipman gerektirir
Real-Time PCR	Bakteri kültürleri, Klinik örnekler	4-6 saat	Örnek kontaminasyonundaki düşük risk	Sensitivite mevcut DNA'nın ilk hacmi ile ilgili etkilenebilir

Özellikle değerli ve soyu tükenmekte olan kuşların söz konusu olduğu durumlarda hızlı ve kesin tanı, pozitif olguların en kısa sürede tespit edilebilmesi için gereklidir. Yine açık sahada yaşayan kuşlar için de hastalığın kontrolü yönünden hızlı tanı gerekmektedir. Intradermal test uygulamasının çiftlik kanatlıları hariç diğerlerinde tercih edilmemektedir. Serolojik testler de yine genellikle çiftlik kanatlılarında ve zaman zaman su kuşlarında daha sık kullanılmaktadır (Cromie ve ark., 2000; Tell ve ark., 2003a).

1.6.1. Etkenin identifikasyonu

Klinik örneklerde aside dirençli etkenlerin tespiti için mikroskopi, basit, ucuz ve hızlı bir yöntemdir (Huebner ve ark., 1993). Eğer sürüde karakteristik tüberküloz hikâyesi varsa ve post mortem olarak kuşlarda lezyonlar bulunursa, etkilenen organdan yapılan sürme veya kesit preparatlarda Ziehl-Neelsen metoduyla boyama ile aside dirençli etkenlerin tespiti, tanı koymak için yeterlidir (OIE, 2008). Preparatlarda etken bulma şansı, örnekteki yoğunluklarıyla doğru orantılıdır. Preparatta mikobakterilerin görülebilmesi için materyalin en az 1×10^4 - 5×10^4 mikobakteri/ml içeriğinin olması gerekmektedir (Aranaz ve ark., 1997).

Zaman zaman çok miktarda etkenle hastalık oluştuğunda, akut ve oldukça kuvvetli bir tablonun sonucu olarak, etkilenen organlarda (özellikle karaciğerde) yeşilimsi sarı benekli keçi derisi görünümü meydana gelir. Bu gibi olgularda aside dirençli organizmalar bulunamayabilir fakat dikkatle incelendiğinde kahverengimsi refraktif etkenler paralel demetler halinde belli olacaktır. Ziehl - Neelsen boyamanın sıcak karbol fuksin aşaması 10 dakikaya uzatıldığında genellikle boya almaya yüksek direnç gösteren aside dirençli basiller ortaya çıkacaktır. Bununla birlikte, Truant boya gibi florokrom boyalar, sensitivitesi daha yüksek sonuçlar verebilmektedir (Tell ve ark., 2003a; OIE, 2008).

Ziehl-Neelsen gibi aside dirençli boyama metotlarında, özellikle yaygın bağırsak lezyonu olan kuşlarda doku kesitleri ve dışkıda fazla sayıda mikobakteri

görölür hale getirilebilir. Dışkıda bulunan mukus ve diğer inhibitör maddeler test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir. Bunun yanında boyama koşullarının düzenli olarak kontrol edilmediği durumlarda yanlış pozitif veya negatif sonuçlar alınabileceği de unutulmamalıdır (Van der Heyden, 1997a).

1.6.2. Kültür

Eğer karakteristik bir sürü hikâyesi varsa ve nekropside anlamlı lezyonlar bulunursa fakat aside dirençli etkenler sürme veya kesit preparatlarda görülmezse, hastalık etkeni olan organizmayı izole etmek için nekropsi materyaline başvurulur. Karaciğer veya dalak genellikle bu amaçla kullanıma uygundur fakat eğer karkas dekompoze olmuşsa daha az kontamine olmasına rağmen kemik iliği de yeterli düzeyde sonuç verir (OIE, 2008). Kanatlı kanı infekte kuşlarda mikobakteri tespiti için başarıyla kullanılmaktayken fekal veya biopsi materyali kültürleri kullanılamamaktadır. Fekal ve kan örneklerinin kuşun mikobakteriyemik olduğu ve dışkı ile bakteri saçıldığı dönemde alınması gerekmektedir. Ayrıca sadece aside dirençli bakteri yönünden pozitif biopsi örnekleri kültür için değerlendirilmelidir (Zsivanovits, 2001; Tell ve ark., 2003a).

Kültürden önce örnekler dekontamine edilmelidir. Numunelerin çoğu istenmeyen ve çabuk gelişen mikroorganizmalar içermektedir. Kontaminasyon içeriği örnek türü, toplama ve saklama metotlarıyla ilişkilidir. Mikobakterilerin tespitinde örneklere uygulanacak dekontaminasyon yolları şu şekildedir: %2 veya %4'lük NaOH, %1'lik NaOH ile %3'lük sodium dodecyl sulfate (SDS), %2'lik N-acetyl-L-cysteine (NALC) ile %1'den %3'e kadar NaOH, %5 oxalic acid, Zephiran-trisodium phosphate (Z-TSP), %4'lük sülfürik asit ve hexadecylpyridinium chloride (HPC) (Çizelge 1.5) (Salfinger ve Kafader, 1987; Clark ve ark., 1995; Hines ve ark., 1995; Aranaz ve ark., 1997).

Çizelge 1.5. *Mycobacterium* spp. için kullanılan dekontaminantlar ve özellikleri

DEKONTAMİNANT	ÖZELLİKLERİ
%2 veya % 4'lük NaOH	Mikobakteriler için sık kullanılan ılımlı dekontaminasyon solüsyonudur. Dekontaminasyon süresi 15 dakikayı geçmemelidir.
% 1'lik NaOH ile %3'lük sodium dodecy sulfate (SDS)	Kullanımının NALC, NaOH ve Z-TSP'den daha uygun olduğu düşünülmektedir. Ancak non-tüberküloz mikobakteriler için diğerlerinden daha tahrip edicidir.
%2'lik N-acetyl-L-cysteine (NALC) ile %1'den %3'e kadar NaOH	NALC mukolitik ajanı ile serbest mikobakterileri yakalayan ılımlı bir dekontaminanttır. Temas süresi 15 dakikayı geçmemelidir. Kontaminasyon oranları SDS'ye göre daha yüksektir. NALC oksijene duyarlı olduğu için hazırlanan bu karışım en fazla 24 saat kullanılabilir.
%5 oxalic acid	Özellikle <i>Pseudomonas aeruginosa</i> içeren örneklerde kullanılabilir.
Zephiran-trisodium phosphate (Z-TSP)	Daha çok zaman kontrolünün etkili yapılamadığı laboratuarlarda tercih edilir. Zephiran lesitin ile nötralize edilmelidir ve yumurta bazlı besiyerine inokule edilememektedir.
Hexadecylpyridinium chloride (HPC)	%2'lik NaOH kadar etkili bulunmuştur, dekontaminasyon için daha kısa süreye ihtiyaç duymaktadır ve mikobakteriler için daha az toksik etkiye sahiptir.

İşlenen örneklerde mikobakterilere zarar vermeden, kısa sürede ve en yoğun sonucu %4'lük NaOH gibi ılımlı dekontaminantlar vermektedir. Hexadecylpyridinium chloride ile dekontaminasyon da en az %2'lik NaOH kadar etkili bulunmuş ve mikobakterilere karşı daha az toksik olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte tüm dekontaminantlar mikobakteriler için toksiktir ve genellikle %80-90 oranında mikobakteriyel tahribata yol açarlar (Salfinger ve Kafader, 1987; Clark ve ark., 1995; Hines ve ark., 1995; Aranaz ve ark., 1997; Zsivanovits, 2001; Beran ve ark., 2006).

Örnekler dekontaminasyon işlemini takiben santrifugasyon ile konsantre edilmelidir. Bu amaçla 3000 g'de 15 dakika veya 2000-9.500 g arası 20 dakika tavsiye edilmektedir (Aranaz ve ark., 1997).

Dekontaminasyon ve konsantrasyon aşamalarından sonra örnek uygun kültür ortamına inokulasyon için hazırdır. Mikobakteriyozisin tanısında kültür altın standart olarak bilinmektedir. Bununla birlikte kültürün en az 2 hafta gibi uzun bir sürede

sonuç vermesi ve *M. genavense* gibi bazı türlerin standart kültür teknikleri ile izolasyonunun zor olması dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır. (Ramis ve ark., 1996; Aranaz ve ark., 1997; Boian ve ark., 1997; Mendenhall ve ark., 2000; Tell ve ark., 2003a).

Mikobakteriler için pek çok farklı kültür ortamı mevcuttur. Konvansiyonel katı besiyerlerini temelde yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere ikiye ayırmak mümkündür. Günümüzde en yaygın kullanılan yumurta bazlı besiyeri Löwenstein-Jensen (L-J)'dir (Hines ve ark., 1995). Ancak Petragnani ve American Trudeau Society besiyerleri de tercih edilebilir. L-J besiyeri, *M.tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin üretilmesi için güvenilir bir besiyeri olarak tanımlanmaz ancak tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle primer izolasyonda önerilmektedir. Kontaminasyon olasılığı yüksek örneklerden mikobakterilerin üretilmesi için L-J besiyerinde 2 kat fazla malaşit yesili içeren Petragnani besiyeri kullanılır. American Trudeau Society besiyeri ise L-J besiyerinden daha düşük konsantrasyonda malaşit yesili içerir. Bu nedenle kontaminasyona neden olan bakteriler daha kolay ürerler ve mikobakterilerin de büyümesi daha az inhibe olarak daha erken bir dönemde daha büyük koloniler meydana gelir (Aranaz ve ark., 1997).

Bunun yanında şeffaf görünümlü agar bazlı besiyerlerinden en çok tercih edilenleri Middlebrook 7H10 ve 7H11'dir. Middlebrook agar, L-J'e göre mikrobiyal gelişimin erken tespiti, daha az kontaminasyon ve daha kolay koloni morfoloji incelemesi sağlamaktadır. Aynı zamanda Middlebrook 7H11 besiyeri petriye ince dökülerek mikroskopta koloni gelişiminin incelenmesi amacıyla da kullanılmaktadır. İster yumurta, ister agar bazlı olsun özellikle ilk izolasyonda kontaminasyonu engellemek amacıyla selektif besiyeri kullanılması önerilmektedir. Bu amaçla L-J Gruft, Mycobactosel L-J, Mitchison selektif 7H11 kullanılabilir. Sıvı besiyerleri ise mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlık deneyleri, diğer *in vitro* deneylerde inokulum hazırlanması, izolasyon şansını arttırmak için bakteri sayısının arttırılması gibi amaçlarla tercih edilebilir ve bu amaçla Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin kullanılabilir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri aynı zamanda çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır (Anagyros ve ark., 1990; Stager ve ark., 1991; Wilson ve ark., 1995).

M. avium en iyi L-J, Herrold's medyum, Middlebrook 7H10 ve 7H11 veya %1 sodyum piruvat ilave edilmiş Coletsos gibi besiyerlerinde gelişir. Kültürler en az 8 hafta boyunca inkube edilmelidir. Tipik olarak *M. avium* 'smooth' yapıda koloni oluşturur ve 2-4 haftada rough form gözlenir. Besiyerinde buharlaşan suyun kümelenmesiyle gelişme sınırlanabilir (OIE, 2008).

MAI complex üyelerinin suşları 14-30 günlük inkubasyonda yavaş gelişen, birleşik veya aralıklı koloniler oluştururlar. Gelişme sıcaklık aralığı 25-45 °C arasında değişir. Piruvat içeren besiyerlerinde daha hızlı gelişim söz konusudur. İlk koloniler inci yeşili görünürken yaşlı kültürlerde sarıya dönebilir. Lezyonlardan yapılan ilk izolasyonda koloniler pürüzsüz ve şeffafken, tekrarlayan pasajlarda bu koloni tipi yerini kubbeli, şeffaf olmayan forma bırakır (Kuze ve Uchihira, 1984; Aranaz ve ark., 1997).

Kuşlarda tüberkülozis genellikle *M. avium* tip 1, 2, veya 3 tarafından meydana getirilir. Bunlardan birinin bulunması halinde hastalık etkeni olarak varsayılır. Eğer izolat bunlardan biri değilse daha başka identifikasyon testleri gerçekleştirilmesine gerek duyulur. Bunun yanında kafes kuşlarında özellikle de psittasinlerdeki süperfisiyal tüberküloz lezyonlarının *M. tuberculosis* tarafından meydana getirilebileceği de akıldan çıkarılmamalıdır. Dolayısıyla eğer bu kuşlardan mikobakterilerin rough kolonileri izole edilirse 42°C'de gelişebilme yönünden test edilmelidirler. Eğer izolat 42°C'de gelişmezse *M. tuberculosis*'den şüphelenilmelidir Geleneksel olarak *M. avium*, diğer nonkromatojenik yavaş büyüyen organizmalardan 42 °C'de gelişebilmeleri (*M. avium*) ve Tween hidroliz testi, pyrazinamidaz gibi biyokimyasal testler, thiopen-2 karboksilik asit hidrazid (TCH) içeren medyada gelişmeleri ve tellurite azaltması ile ayrılırlar (OIE, 2008).

M. genavense'nin katı besiyerinde gelişmediği, MB 7H13'de (BACTEC sistemi ile) ise çok düşük büyüme indeksi saptandığı ve subkültürlerin negatif olduğu bildirilmiştir. En iyi gelişimin pH 6.0'da, BACTEC vialleri kullanılarak olduğu belirtilmiştir (Böttger ve ark., 1993; Hoop ve ark., 1993, Hoop ve ark., 1996; Realini ve ark., 1997; Realini ve ark., 1999)

Sıvı kültür olan BACTEC sistemi ile inkubasyon süreleri kısaltılmaktadır. Düşük oksijen basıncı ile pH'ın 6.0 olması önerilmektedir (Realini ve ark. 1997; Realini ve ark. 1998). Optimal katı medyum pH 6'ya asitleştirilmiş ve kan ve charcoal ilave edilmiş Middlebrook 7H11'dir. Bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür (Realini ve ark. 1999; OIE, 2008).

Hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize BACTEC 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. BACTEC 12B (MB 7H12) ve BACTEC 13A (MB 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerlerinde bulunan C14 işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan 14 CO₂'nin 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Başarı ile kullanılmakla beraber, sistemde yer alan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazda yapılan rutin kontroller sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyon sorun oluşturmaktadır (Clark ve ark., 1995).

Mikobakterilerin tanısı için geliştirilmiş tam otomatize sistemler ise Myco-ESP (Extra Sensing Power), (Trek Diagnostics, Inc., Westlake, Ohio), MB/Bact T (Organon Teknika, Durham, NC), BACTEC 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD) ve BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Biosciences, Sparks, MD)'dır (Shitayea ve ark., 2009). Bu sistemler arasında da izolasyon oranı açısından önemli bir fark olmamakla birlikte, konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek; BACTEC 460 TB sistemine göre daha düşük oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir. Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır ancak bu sistemlerde oran, BACTEC 460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksektir (Uzun, 2003).

Mikobakterileri tür ve alttürlerle tiplendirmek için bu konuda uzmanlaşmış bir laboratuvara ihtiyaç duyulur. Türlerin identifikasyonu için konvensiyonel biyokimyasal testler ayrıntılıdır ve *M. avium* ve *M. intracellulare* arasında tür ayrımı yapılamaz. Bu nedenle mikobakterilerin her iki türü de içeren çeşitli grupları *M. avium* complex (MAC) adı altında isimlendirilirler (OIE, 2008).

1.7. Moleküler Teşhisi

Son zamanlarda DNA problemleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri kanatlı mikobakteriyozisinin teşhisinde sık kullanılmaktadır (Ramis ve ark., 1996; Boian ve ark., 1997; Mendenhall ve ark., 2000; Tell ve ark., 2003b; OIE, 2008; Siriudom ve ark., 2008).

PCR teknikleri, klinik örneklerde çok düşük sayıdaki DNA'ları tespit etmede oldukça hızlı ve doğru sonuç veren tanı metotlarıdır. Sonuçlar birkaç saatte ortaya çıkmaktadır ve durum özellikle antemortem tanı için çok önemlidir. Ayrıca *M. genavense* kültürünün zor olması sebebiyle PCR, bu etkende tercih edilecek ilk tanı yöntemidir (Avaniss-Aghajani ve ark., 1996; Boian ve ark., 1997; Mendenhall ve ark., 2000).

Çeşitli konvensiyonel PCR protokolleri mikobakteriyel DNA tespiti için kullanılmaktadır (Portaels ve ark., 1996; Ramis ve ark., 1996; Boian ve ark., 1997; Mendenhall ve ark., 2000). Yakın zamanda kantitatif gerçek zamanlı (Real-Time) PCR yöntemi (TaqMan-PCR) geliştirilerek bir örnekteki etkenlerin başlangıç konsantrasyonlarının eş zamanlı olarak izlenmesi sağlanmıştır. TaqMan-PCR konvensiyonel PCR'a göre, spesifite ve sensitivitede artış, kontaminasyonda azalma, daha fazla sayıda ürün işleme ve PCR inhibitörlerine karşı dayanıklılık gibi oldukça fazla avantaj içermektedir (Tell ve ark., 2003b).

Sık kullanılan PCR metotlarından birisi de nested PCR'dır. Hedef dizilerin amplifikasyonunun çeşitli nedenlerle klasik PCR yöntemi ile mümkün olmadığı

durumlarda kullanılır. Bu yöntemle klasik PCR'a farklı primer çiftleri ile ikinci bir amplifikasyon uygulanarak gerçekleştirilir. Kullanılan ikinci primerler diziyeye özgüdür ve ilk PCR'da elde edilen amplifikasyon ürünü, ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır (Miyazaki ve ark., 1993).

1.8. Sağaltım

İnsanlarda *M. tuberculosis* ve *M. bovis* nedenli mikobakteriyel infeksiyonlar genellikle isoniazid, ethambutol, rifampicin veya pyrazinamide gibi antibiyotiklerle tedavi edilmektedir (Van der Heyden, 1997b). Hayvanlarda, uzun sürmesi ve maliyetinin yüksek olması sebebiyle tüberküloz tedavisine nadiren başlanır. Ayrıca bazı ülkelerde tüberküloz tedavisi yasal değildir. Diğer taraftan *M. avium*, bu antitüberküloz ilaçlarına karşı dirençlidir. Bu nedenlerden ötürü tedavi, kanatlı sektöründe de tercih edilen uygulamalardan değildir. Bununla birlikte egzotik pet kuşları ve hayvanat bahçesi kuş koleksiyonlarında görülen *M. avium* infeksiyonlarında 12-18 aya kadar süren kombine tedavi seçenekleri uygulanmaktadır (Fulton ve Thoen, 2003).

Mikobakteriyel infeksiyonlarla ilişkili kanatlı tedavilerinde başlıca problem kuşlarda çoğu antimikobakteriyel ilacın farmakokinetiğinin bilinmemesidir. Ayrıca mikobakteriyel hücre duvarının göreceli hidrofobisi, aminoglikozidler, fluorokinolonlar ve makrolidler gibi birçok hidrofilik antibiyotiklerin aktivitesini kısıtlayan bir engel olarak görev yapmaktadır. Bunun yanında mikobakterilerin yavaş ve hücre içi gelişimi, tedavinin uzun sürmesini gerektirir (Van der Heyden, 1997b). Yapılan in vitro çalışmalarda *M. avium*'un trimethoprim-sulfamethoxazole, sulfisoxazole, amikasin ve gentamisin yanıt verdiği görülmüştür (Davis ve ark., 1987).

Pet kuşlarında *M. avium* infeksiyonları, isoniazid, rifampin, rifabutin, ethambutol, klofazimine, siprofloksasin, enrofloksasin, streptomisin ve amikasin ile tedavi edilmiş ve insanlarda *M. genavense* infeksiyonunun klaritromisin ile tedavisi

bildirilmiştir. Klaritromisin ve azitromisin gibi yeni makrolidlerin *M. avium* ve *M. genavense*'ye karşı gözle görülür etkisi, kuşlarda kullanımlarını arttırmaktadır. Bununla birlikte ilk tedavi rifabutinin ve etambutol ile yapılmalı ve daha sonra gerekirse azitromisin veya klaritromisin birlikte verilmelidir. Tedaviye yanıtta istenilen başarı sağlanamazsa florokinolon veya bir aminoglikozid tedavi kürüne eklenebilir. Bir diğer alternatif ya da ilave ilaç da özellikle kuşlarda belirgin bir inflamatuvar yanıt veren clofazamine'dir. Van der Heyden (1997b), bahsedilen bu ilaçların günlük toplam dozlarını; klaritromisin için 85 mg/kg, azitromisin için 43 mg/kg, rifabutin için 56 mg/kg, ethambutol için 56-85 mg/kg ve klofazamin için 6-12 mg/kg olarak bildirmiştir. Bir diğer çalışmada, mevcut ilaçların potansiyelini arttırmak için, *Staphylococcus*'un Clavelis suşundan "stazyme" adı verilen bir mikobakteriyolitik preparat geliştirilmiştir. Stazyme *M. avium* izolatlarının permeabilite bariyerini kırarak, ethambutol, rifampicin ve amikacin gibi anti-tüberküloz ilaçlarının aktivitesini belirgin şekilde değiştirmiştir (Dhama ve ark., 2011).

1.9. Koruma ve Kontrol

M. avium enfeksiyonunun eradikasyonu, kronik taşıyıcı ve enfekte kuşlar tarafından etkenin aralıklı saçılımı nedeniyle zordur. Hastalığın elimine edilmesi ve tüberküloz ari sürülerin oluşturularak korunması için gereken önlemler alınmalıdır.

Dhama ve ark. (2011), hastalığın tüberkülin ve aglütinasyon testleri ile düzenli olarak izlenmesi yanı sıra sıkı biyogüvenlik prosedürlerinin uygulanmasını önermişlerdir. Stres, saçılımı artırması ve yeni salgınların oluşması nedeniyle anahtar faktördür. Bu hastalığı kontrol etmek için en iyi yol hasta ve taşıyıcı kuşları ayırmak ve çevresel parametreleri geliştirerek stres faktörünü düşürmektir (Fulton ve Thoen, 2003).

1.9.1. Bakım-İdare Uygulamaları

Kuşları bu hastalıktan koruma, kafeslerde kalabalık kuş popülasyonunu seyreltme, uygun havalandırmayı sağlama ve vitamin mineral desteği tam olan diyetlerle besleme şeklinde yapılabilir. Bir kuş topluluğunda kanatlı tüberkülozu görüldüğünde, söz konusu kafes ile diğer komşu kafesler 6-12 hafta boyunca karantinaya alınarak aralıklı olarak teste tabi tutulmalıdırlar. Ne tüberkülin ne de aglutinasyon testleri infekte olan her kuşun tespitini yapamamaktadır, bu nedenle sürüde bir tek infekte kuş bile kalsa hastalığın diğerlerine bulaşması söz konusu olacaktır. Dolayısıyla tüm sürü elden çıkarılarak infekte olmayan yeni bir sürü, altlık ve hatta ekipman alımı en iyi yaklaşımdır. Fekal maddenin sık uzaklaştırılması da hastalığın yayılmasını önleyen en önemli faktördür. Kafeslerin dezenfeksiyonu sık ve düzenli yapılmalıdır (Fulton ve Thoen, 2003).

Serbest dolaşım sistemi hastalığın kontrolü açısından önerilmemektedir. Egzotik kuşlar için infekte kuşlarla veya bulundukları çevre ve barınaklarla temas önlenmelidir. İnfeksiyonun izlenmesi tüm hijyen prosedürleri ile birlikte yürütülmelidir. *M. avium* varlığını tespit etmek için, yeni egzotik veya yerli kuş alımında tüberkülin testi zorunlu olmalı ve alınan kuş 2 ay karantinada tutulmalıdır (Tell ve ark., 2001).

1.9.2. Aşılama

Kuşlarda tüberküloz için uygulanan bir aşı yoktur. Öldürülmüş ve/veya canlı mikobakteriler ile hazırlanan deneysel aşılar değerlendirilmekte, çalışmalar sürdürülmektedir. *M. avium* serovar 6 oral yolla verildiğinde tatmin edici koruma elde edilmiştir (Tell ve ark., 2001; Thoen, 1997). *M. avium* serovar 7 ve 19'un inaktive ile canlı kombinasyonları da kısıtlı ölçüde koruma sağlamaktadır. Kuşlarda hücresel bağışıklığı ortaya çıkartmak için protein oluşturan *M. avium* genlerinden hazırlanan nükleik asit temelli aşılar da deneysel olarak denenebilir (Dhama ve ark.,

2008). Basit tüm hücre veya lizat aşıları ve aşı preparat kombinasyonlarının da yüksek düzeyde koruma sağladığı tespit edilmiştir (Falkinham ve ark., 2004).

Bu çalışmada, kafes (pet) kuşlarında önemli bir problem olan kanatlı tüberkülozunun teşhisi için kafes kuşlarına ait klinik örneklerden mikobakteri türlerini, kültür ve moleküler yöntemle (PCR) ortaya koymak amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örnekler

Çalışmada, Ankara ili sınırları içerisindeki kuşhane, petshop ve evcil kuş kafeslerinden toplanan 192 dışkı örneği ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Hastalıkları Rutin Teşhis Laboratuvarı'na getirilen 22 adet ölü kuştan elde edilen 51 adet organ (karaciğer, dalak, bağırsak ve kemik iliği) numunesi ile bu kuşların kafeslerinden alınan 5 adet dışkı test materyali (toplam 248) olarak kullanıldı. Her bir kuşa ait organ örneği 20 ml'lik vida kapaklı polietilen kaplarda ve 5 cm çaplı plastik mini petrilere tutuldu. Dışkı örnekleri ise 5 ml'lik, içerisine 1 ml fosfat tampon solusyonu (PBS) olan plastik tüplerde, 4°C'de muhafaza edilerek laboratuvara getirildi. Tüm örnekler işleme aşamasına kadar -20°C'de dondurularak saklandı (Portaels ve ark., 1996).

Mikobakteri varlığı yönünden incelenen tez materyallerinin toplanma işlemi Haziran 2010 - Eylül 2011 tarihleri arasında yapıldı. İncelenen dışkı ve organ örneklerinin temin edildiği yerler, kuşların cinsiyetleri, yaşları ile klinik bulguları ve gönderilen materyal numaraları Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

2.1.2. Referans Suşlar

Çalışmada kullanılan *M. avium* subsp. *avium* (ATCC 15769/956) ve *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (ATCC 6841/06060) suşları Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlandı. *M. genavense* suşu RSHMB’de bulunmadığından İtalya’da mikobakteri referans merkezinden (Regional Reference Center for Mycobacteria, Italy) talep edildi, ancak suşun transferine onay verilmediğinden sadece DNA’sı gönderildi.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan tez materyalleri

KUŞ TÜRÜ	KUŞ SAYISI	KUŞLARIN CİNSİYETİ	KUŞLARIN YAŞI	MATERYAL TÜRÜ	KUŞLARDA GÖRÜLEN KLİNİK TABLO
Bıldırcın (<i>Coturnix coturnix</i>)	34	23 Dişi 11 Erkek	1-2 yaş aralığında	Dışkı	Zayıflama ve ishalden ani ölüme kadar değişen tablo
Bülbül (<i>Luscinia megarhynchos</i>)	6	6 Erkek	1-2 yaş aralığında	Dışkı, karaciğer, kemikiliği, dalak	Depresyon ve zayıflamadan ani ölüme kadar değişen tablo
Cennet Papağanı (<i>Roseicollis verde</i>)	3	1 Dişi 2 Erkek	2-3 yaş aralığında	Dışkı, karaciğer ve dalak	Ani ölüm ve zayıflama bulguları
Erik Başlı Papağan (<i>Psittacula cyanocephala</i>)	3	2 Dişi 1 Erkek	2.5-4 yaş aralığında	Dışkı	Zayıflama, halsizlikten ishale kadar değişen klinik tablo
Esmer Akbaba (<i>Aegypius monachus</i>)	1	1 Erkek	12 yaş	Dışkı	İshal
Flamingo (<i>Phoenicopterus ruber</i>)	7	5 Dişi 2 Erkek	>3 yaş	Dışkı	İshal
Güvercin (<i>Columba domestica</i>)	49	27 Dişi 19 Erkek 3 Bilinmiyor	1-4 yaş aralığında	Dışkı, karaciğer, kemikiliği, dalak	Depresyon, iştahsızlık ve klinik bulgu görülmeyen hayvanlar
İspinoz (<i>Taeniopygia guttata</i>)	20	11 Dişi 9 Erkek	1-3 yaş	Dışkı, karaciğer, dalak	Yaralanmadan ishal ve zayıflamaya kadar değişen klinik tablo
Jako Papağanı (<i>Psittacus erithacus timneh</i>)	1	Erkek	2 yaş	Dışkı	İshal
Kakadu Papağanı (<i>Cacatua alba</i>)	1	Erkek	6 yaş	Dışkı	Klinik bulgu gözlenmedi
Kanarya (<i>Serinus canaria</i>)	23	8 Dişi 15 Erkek	1-2 yaş aralığında	Dışkı, karaciğer, kemikiliği ve dalak	Tırnak lezyonu, beyaz ishal, depresyon ve iştahsızlıktan ishale kadar değişen tablo

Çizelge 2.1 (Devam) Çalışmada kullanılan tez materyalleri

KUŞ TÜRÜ	KUŞ SAYISI	KUŞLARIN CİNSİYETİ	KUŞLARIN YAŞI	MATERYAL TÜRÜ	KUŞLARDA GÖRÜLEN KLİNİK TABLO
Kırmızı Lori Papağanı (<i>Lorius garrulus</i>)	1	Bilinmiyor	1.5 yaş	Dışkı	Zayıflama, halsizlik
Kumru (<i>Streptopelia decaocto</i>)	7	3 Dişi 2 Erkek 2 Bilinmiyor	1-2 yaş aralığında	Dışkı, karaciğer, dalak, bağırsak	Yaralanma tespit edilen ve klinik bulgu görülmeyen kuşlar
Muhabbet Kuşu (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	45	15 Dişi 25 Erkek 5 Bilinmiyor	1-3 yaş aralığında	Dışkı, karaciğer	Göz ve gaga çevresinde lezyon olan, depresyon, ishal, zayıflama bulguları gösteren kuşlar
Ördek (<i>Aix Sponsa</i>)	2	1 Dişi 1 Erkek	1 yaştan üzerinde	Dışkı	Depresyon ve zayıflama, tüylerde kabarma
Puhu kuşu (<i>Bubo bubo</i>)	1	Bilinmiyor	4 yaştan üzerinde	Dışkı	Klinik bulgu gözlenmedi
Rosella papağanı (<i>Pyatycercus eximius</i>)	2	1 Dişi 1 Erkek	3 yaş	Dışkı, dalak bağırsak	İshal ve ani ölüm
Sultan papağanı (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	6	1 Dişi 5 Erkek	1.5-5 yaş aralığında	Dışkı	Tüy dökmeden yeşil ishale kadar değişen klinik tablo
Şahin (<i>Buteo rufinus</i>)	2	1 Dişi 1 Bilinmiyor	1-4 yaş aralığında	Dışkı, karaciğer, bağırsak, dalak	Kanat kırığı ve ishal
TOPLAM:	214	99 Dişi 102 Erkek 13 Bilinmiyor	1-12 yaş aralığı	51 Organ örneği 197 Dışkı örneği	Toplam 248 Materyal

2.1.3. Solüsyonlar

% 4 NaOH

Sodyum hidroksit (NaOH)	40 g
Distile su	1000 ml

NaOH, distile su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak eritildi. Otoklavda, 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra kullanım süresince buzdolabında saklandı.

Fosfat Tampon Solusyonu (PBS)

Sodyum Klorür (NaCl)	8 g
Potasyum Klorür (KCl)	0.2 g
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)	1.15 g
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	0.2 g
Distile su	1000 ml

Ziehl-Neelsen Boyama Bileşenleri

• Konsantre Karbol Fuksin

Fuksin.....	1.0 g
Ethanol % 95 (v/v).....	10.0 ml
Fenol	5.0 g
Distile su	100.0 ml

• Metilen Mavisi

Metilen mavisi.....	8.0 g
Ethanol % 95 (v/v)	300.0 ml
Potasyum hidroksit.....	0.13 g
Distile su	1300.0 ml

• Asit- Alkol (Dekolorizasyon)

Konsantre HCl asit.....	8.0 ml
Ethanol % 95.....	97.0 ml

2.1.4. Besiyerleri

Löwenstein-Jensen Medium Base (Merck, KGaA 64271)

Besiyeri Bileşeni (g/litre)

Asparajin.....	3.6 g
Monopotasyum Fosfat	2.5 g
Magnezyum Sülfat... ..	0.24 g
Magnezyum Sitrat.....	0.6 g
Patates Unu	30.0 g
Malaşit Yeşili.....	0.4 g

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 37.4 g alınarak, 600 ml distile su ve 12 ml gliserol ilave edildi. Sterilizasyon amacıyla 121°C’de 15 dakika otoklavda tutuldu. Besiyeri 50°C’ye kadar soğutularak aseptik olarak yumurta katıldı. Yumurta, hava kabarcıkları oluşmasına izin verilmeden karıştırıldı. Besiyeri uygun steril vida kapaklı tüplere bölündü. Yatay pozisyonda 85°C’de 45 dakika bekletildi. Koagülasyon görüldükten sonra tüpler sterilite kontrolü için etüve konularak bir gün bekletildi. Kontamine olanlar ayrıldıktan sonra kalan tüpler tez çalışmasında kullanılmak üzere buzdolabında saklandı.

Middlebrook 7H10 Agar (Difco) (900 ml için):

Amonyum Sülfat	0.5 g
Monopotasyum Fosfat	1.5 g
Di-sodyum Fosfat.....	1.5 g
Sodyum Sitrat.....	0.4 g

Magnezyum Sülfat.....	25.0 mg
Kalsiyum Klorür	0.5 mg
Çinko Sülfat	1.0 mg
Bakır Sülfat	1.0 mg
L-Glutamik Asid (sodyum tuzu)	0.5 g
Demir Amonyum Sitrat	0.04 g
Piridoksin Hidroklorid.....	1.0 mg
Biyotin	0.5 mg
Malaşit Yeşili.....	250.0 µg
Agar	15.0 g

Middlebrook 7H11 Agar (Difco) (900 ml için):

Magnezyum Sülfat	0,05 g
Ferrik Amonyum Sitrat	0,04 g
Sodyum Sitrat.....	0,4 g
Amonyum Sülfat.....	0,5 g
Monosodyum Glutamat.....	0,5 g
Disodyum Fosfat	1,5 g
Monopotasyum Fosfat	1,5 g
Agar	13,5 g
Piridoksin	1,0 mg
Çinko Sülfat.....	1,0 mg
Bakır Sülfat.....	1,0 mg
Biotin.....	0,5 mg
Kalsiyum Klorür	0,5 mg
Malaşit Yeşili	0,25 mg
Kazeinin pankreatik dijesti.....	1,0 g
Polimiksin B.....	200.000 birim
Karbenisilin.....	50,0 mg
Amfoterisin B.....	10,0 mg
Trimetoprim Laktat	20,0 mg

Middlebrook OADC Enrichment (BBL) (1 Litre için):

Sodyum Klorür.....	8.5 g
Dekstroz.....	20.0 g
Bovine Albumin (Fraksiyon V)	5.0 g
Katalaz	0.03 g
Oleik Asit	0.6 ml

MB7H10 hazırlanıp 50-55°C'ye kadar soğuduğunda aseptik olarak 100 ml Middlebrook OADC Enrichment eklendi. MB7H11 agar hazırlanırken 5 ml gliserol ilave edildi.

Middlebrook 7H9 Broth (Difco) (900ml için):

Amonyum Sülfat	0.5 g
L-Glutamic Asid	0.5 g
Sodyum Sitrat.....	0.1 g
Piridoksin	1.0 mg
Biyotin	0.5 mg
Di-sodyum Fosfat.....	2.5 g
Mono-potasyum Fosfat.....	1.0 g
Demir Amonyum Sitrat.....	0.04 g
Magnezyum Sülfat.....	0.05 g
Kalsiyum Klorür.....	0.5 mg
Çinko Sülfat.....	1.0 mg
Bakır Sülfat.....	1.0 mg

Middlebrook ADC Enrichment (BBL) (1 litre için):

Sodyum Klorür.....	8.5 g
Bovine Albumin (Fraksiyon V)	50.0 g
Dekstroz.....	20.0 g
Katalaz.....	0.03 g

MB7H9 hazırlanıp 50-55°C'ye kadar soğuduğunda aseptik olarak 100 ml Middlebrook ADC Enrichment eklendi.

2.1.5. Bakteriyolojik Muayenelerde Kullanılan Cihazlar

- Etüv (EN120, Nüve, Türkiye)
- Fırın (Fu-Berlin, Almanya)
- Mikroskop (Olympus-CX21, Japonya)
- Otoklav (Medexport-TK-100-2, Rusya)
- Santrifüj (JANETZKI-T30, Almanya)
- Steril Kabin (Aura 2000 Mac., Bio Air Inst., İtalya)
- Vortex (FISONS, İngiltere)

2.1.7. PCR Testinde Kullanılan Primerler

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primerler.

TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN PRİMERLER				
Tür	Primer İsimleri	Primer Sekansları (5'-----3')	Ürün Boyutu (bp)	Kaynak Makale
<i>Mycobacterium</i> spp.	16SrRNA	F:25-mer 5'-ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC-3' R:28-mer 5'-TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA-3'	543	Huard ve ark., 2003
<i>Mycobacterium</i> spp.	16SrRNA (Nested PCR)*	- -	274	-
<i>M. avium</i> complex	IS1245	F:19-mer 5'-AGGTGGCGTCGAGGAAGAC-3' R:18-mer 5'-GCCGCCGAAACGATCTAC-3'	427	Guerrero ve ark., 1995
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	IS901	NP1:20-mer 5'-TTAACACGATGAGTCATGCG-3' NP2:20-mer 5'-GCTTATCGATGTCCTTGATC-3'	509	Pavlik ve ark., 2000
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	(Nested PCR)	NP3:19-mer 5'-GTACCCGGCGAAGACCTGG-3' NP4:19-mer 5'-AAGTCCAGCAGCCGTGCTG-3'	375	Pavlik ve ark., 2000
<i>M. genavense</i>	21kDa protein *	-	219	-
İnternal Kontrol	12SrRNA*	-	158	-

(**M. genavense*, *Mycobacterium* genusuna spesifik nested primerleri ve internal kontrol primerlerinin tasarımları Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na aittir. Primerler patent başvurusuna tabi olmaları nedeniyle açık dizileri verilmemiş sadece hedef ampikon büyüklükleri ile dizayn edildikleri gen bölgesi bildirilmiştir).

2.1.7. PCR Testinde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Hassas Terazi: Solüsyonların ve jelin hazırlanması amacıyla kimyasalların tartılmasında Scaltec sbc41 model (Almanya) hassas terazi kullanıldı.

Jel Elektroforez Cihazları ve Güç Kaynakları: Jel elektroforez analizlerinde minigel yatay jel elektroforez cihazı (Minnie Submarine Agarose Gel Unit, Model HE 33, ABD) ile maxigel yatay elektroforez cihazı ve güç kaynağı (Wealtec Elite 3000 Plus, ABD) kullanıldı.

Mikrodalga Fırın: Jel hazırlanması aşamasında çözündürme işlemi için mikrodalga fırın (AKAI, MW-GS0923DP, Çin Halk Cumhuriyeti) kullanıldı.

Santrifüj: Örneklerin santrifüj aşamalarında Hettich marka (Micro 22R, Almanya) soğutmalı santrifüj kullanıldı.

Shaker: Dekontaminasyon aşamasında BioSan marka (ES-20, Letonya) shaker kullanıldı.

Steril Kabin (Laminar Flow): DNA eldesi ve PCR karışımlarının hazırlanması işlemleri steril kabinde (Aura 2000 Mac., Bio Air Inst., İtalya) gerçekleştirildi.

Thermal Cycler: Komplementer DNA (cDNA) eldesi ve sonrasında gerçekleştirilen amplifikasyon, enzimatik kesim işlemlerinde Techne marka (Genius, Almanya) thermal cycler kullanıldı.

UV-Transilluminatör: Jel elektroforez test sonuçlarının değerlendirilmesinde Bilgisayarlı Jel Dokümantasyon Sistemi (Gene Genius, Bio Imaging System, İngiltere) kullanıldı

Vorteks: Dekontaminasyon ve DNA eldesi aşamasında örneklerin ve PCR aşamasında PCR mikslerinin karıştırılmasında vorteks (Fine Vorex, Kore) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Nekropsi

Mikobakteri varlığının araştırılması amacıyla, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen 22 ölü kuşa tekniğine uygun şekilde nekropsi yapıldı. Bu kuşlardan toplamda 51 adet nekropsi materyali [karaciğer (22), dalak (18), bağırsak (8) ve kemikiliği (3)] elde edildi.

2.2.2. Mikobakterilerin Bakteriyoskopik Tanısı

2.2.2.1. Preparatların Hazırlanması

Elde edilen nekropsi materyalleri ve dışkı örneklerine Ziehl-Neelsen boyama yapılması amacıyla, örnekler ikişer adet temiz lam üzerine alındı. Nekropsi ile elde edilen materyaller iki lam arasında ezilerek ve dekontaminasyondan sonra elde edilen süspansiyondan, dışkı örnekleri ise dekontaminasyon aşamasının ardından elde edilen süspansiyondan, temiz bir lam üzerine bir öze dolusu alınarak oda ısısında kurutuldu. Bek alevinde yapılan fiziksel tespitin ardından preparatlar boyanmak üzere ızgaralı boya küvetine yerleştirildi.

2.2.2.2. Ziehl-Neelsen Boyama

Preparatlar maksimum 10'arlı gruplar halinde boyama küvetine yerleştirilerek üzerlerine öncelikle fenollü bazik fuksin döküldü ve 4-5 dakika boyunca kaynamasına izin vermeden ve boya azaldığında takviye edilerek alttan ısıtıldı. Hafif akan su ile yıkandıktan sonra preparatlar asit-alkol ile yaklaşık 1 dakika dekolorize edildi. Tekrar hafif akan su ile yıkandı ve metilen mavisi dökülerek 2 dakika kadar

bekletildi. Hafif akan suda son kez yıkanarak kurutuldu. Tüm boyama prosedürü aynı preparat sırası izlenerek yapıldı. İmmersiyon yağı ile mikroskopta incelendi. Aside dirençli bakteriler mavi zemin üzerinde ince kırmızı çomaklar olarak arandı (Goldman ve Green, 2009).

2.2.3. Optimizasyon İçin Sulandırma Örneklerinin Hazırlanması

2.2.3.1. On Katlı Mikobakteri Sulandırmalarının Hazırlanması

M. fortuitum ve *M. avium* subsp. *avium* suşları Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı'ndan elde edilerek 1-4 hafta boyunca 37°C'de inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilerden ikişer seri on katlı sulandırmalar hazırlandı. Bu amaçla McFarland Standart tüpleri kullanıldı. Birinci tüp bulanıklığı (10^7 etken/ml) baz alınarak ve distile su kullanılarak her iki suşun on katlı sulandırmaları elde edildi.

2.2.3.2. Yapay Kontamine Doku ve Dışkı Örneklerinin Hazırlanması

Yapay kontamine doku ve dışkı örneklerinin hazırlanması amacıyla tez materyali olarak elde edilen ve bakteriyoskopi, kültür ve moleküler incelemeler ile mikobakteri yönünden negatif olduğu tespit edilen şahin karaciğeri ile güvercin dışkısı kullanıldı.

Kültür optimizasyonu amacı ile seçilen karaciğer ve dışkı örneklerine, *M. fortuitum* ve *M. avium* subsp. *avium* suşlarından hazırlanan on katlı sulandırmalar karıştırıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu optimizasyonu amacı ile ayrı ayrı hazırlanan 20'şer mg karaciğer ve 200'er mg dışkı örneklerine 100'er µl on katlı bakteri sulandırmalarından katıldı.

2.2.4. Mikobakteri Kùltürü

2.2.4.1. Dekontaminasyon

Dekontaminasyon amacıyla, 1-3 g dışkı örnekleri 10 ml distile su ile muamele edildi. Shaker’da oda ısısında 30 dakika tutulduktan sonra yine oda ısısında 45-60 dakika kadar bekletilerek partiküllerin çökmesi sağlandı. Dekontaminasyon ve kùltür amacıyla üst sıvıdan 5 ml alındı.

Organ örneklerinden 1-2 g alınarak 10 ml PBS (pH 7.2) içinde homojenize edildi. Havanda ezilerek sağlanan homojenizasyonun ardından metal süzgeç kullanılarak süzöldü ve elde edilen sıvıdan 10 ml alındı.

Elde edilen dışkı ve doku materyalleri eşit hacimde 1N %4’lük NaOH solüsyonu ile 10-20 dakika muamele edildi. Tüm örnekler 3000 – 4000 x g’de 20-30 dakika santrifüje tabi tutuldu. Üst sıvı dökölerek dipte kalan peletlere 1’er ml Middlebrook buyyon veya distile su ilave edildi.

2.2.4.2. Kùltür Optimizasyonu

Kùltür optimizasyonu için hazırlanan on katlı sulandırılmalardan 0.2 ml alınarak gliserinli Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeri, Middlebrook 7H9 (MB7H9), Middlebrook 7H10 (MB7H10) ve gliserinli Middlebrook 7H11 (MB7H11) besiyerlerine ikişer seri olmak üzere inokule edildi. Ayrıca aynı materyallerden onar adet hazırlanan karaciğer ve dışkı örneklerine (1-3 gram) aynı sulandırma serisinden 1’er ml alınarak karıştırıldı. Bu şekilde yapay kontamine edilen örnekler dekontaminasyona tabi tutulduktan sonra aynı besiyerlerine inokule edildi. Tüm inokulumlar 37°C’de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonun 1, 2, 4 ve 6. günlerinde besiyerleri kontaminasyon yönünden incelendi. Dört haftalık inkubasyon sonunda

üreyen koloniler değerlendirilerek tez materyallerinin izolasyon ve identifikasyonunda kullanılacak koşullar belirlendi.

2.2.4.3. Besiyerlerine Ekim

Dekontaminasyonu yapılan dışkı ve organ örnekleri ikişer tüp gliserinli L-J besiyeri, ikişer petri MB7H10 agar , ikişer petri gliserinli MB7H11 agar ve ikişer tüp MB7H9 buyyon (Middlebrook OADC Enrichment BBL ve Middlebrook ADC Enrichment BBL ilave edilerek) besiyerlerine inokule edildi (Salfinger ve Kafader, 1987; Grange ve ark., 1996; Manarolla ve ark., 2007).

Katı ve sıvı besiyerleri 37°C’de inkube edilerek ve ilk 48 saat sonunda kontaminasyon varlığı yönünden incelendi. Besiyerleri ilk hafta kontaminasyon, daha sonra haftada 1 kez olmak üzere 12 hafta boyunca mikobakteri üremesi yönünden kontrol edildi (Quinn, ve ark., 1999).

2.2.5. Mikobakterilerin Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu

2.2.5.1. DNA Ekstraksiyonu

2.2.5.1.1. Standart Suşlardan DNA Ekstraksiyonu

Standart suşlardan DNA ekstraksiyonu için iki farklı ticari kit (Qiagen; DNeasy® Blood & Tissue Kit ve Fermentas; GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit) ile kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla kültürden elde edilen *M. avium* subsp. *avium* ve *M. fortuitum* suşlarının McFarland standardında 1. tüp baz alınarak hazırlanan on katlı sulandırılmalarından faydalanıldı.

Kaynatma yönteminde örneklerden, 2 ml'lik santrifuj tüplerine 100'er µl alınarak 100°C'de 10 dakika tutuldu. Daha sonra 4000 rpm'de 4 dakika santrifuj edildi ve üst kısımdan yaklaşık 70 µl mini PCR tüplerine aktararak -20°C'de saklandı.

2.2.5.1.2. Yapay Kontamine Örnekler ve Tez Materyalinden DNA Ekstraksiyonu

Hazırlanan yapay kontamine dışkı örnekleri Qiagen Mini Stool Kit (Qiamp; Beckman Instruments, Inc), organ örnekleri ise Qiagen Blood & Tissue Kit (DNeasy; Beckman Instruments, Inc.) kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde ekstrakte edildi.

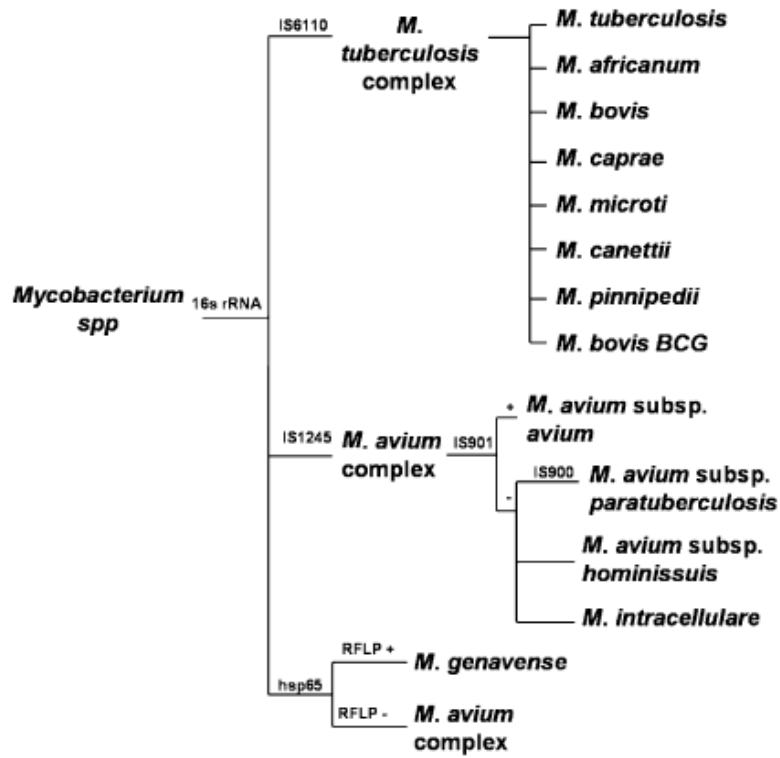
Doku Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu: Dokulardan 1.5 ml'lik mikrosantrifuj tüplerine 25'er mg alınarak üzerine 180 µl Buffer ATL ile 20 µl Proteinaz K eklendi ve tüpler vortekslendi. Örnekler 56°C'de, dokular tamamen parçalanana kadar inkubasyona bırakıldı. Inkubasyon sonunda tüpler vortekslendi ve 98°C'de 10 dakika boyunca kaynatıldı. Daha sonra 200 µl Buffer AL ile 200 µl ethanol tüplere ilave edildi. Örnekler vortekslendikten sonra 2 ml spin kolonlu koleksiyon tüpüne alınarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi. Spin kolon yeni koleksiyon tüpüne alındı ve 500 µl AW1 buffer eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi. Sıvı koleksiyon tüpüne geçti. Spin kolon yeni bir koleksiyon tüpüne alındı, üzerine 500 µl AW2 buffer eklendi. Tüpler 14000 rpm'de 3 dakika santrifuj edildi. Sıvı koleksiyon tüpüne geçti. Spin kolon mikrosantrifuj tüpüne alındı. Üzerine 200 µl AE buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakikalık inkubasyondan sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi ve spin atıldı. Altta kalan sıvı template DNA olarak kullanılmak üzere amplifikasyon işlemine kadar -20°C'de saklandı.

Dışkı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu: Dışkılardan 1.5 ml'lik mikrosantrifuj tüplerine 180-200'er mg alınarak üzerine 1.4 ml Buffer ASL eklendi ve tüpler vortekslendi. Tüpler 98°C'de 10 dakika boyunca kaynatıldı, vortekslendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi. Üst kısımdan 1.2 ml süpernatant yeni bir tüpe

alınarak içine inhibex tablet atıldı ve vortekslenerek oda ısısında 2 dakika bekletildi. Karışım 14000 rpm’de 3 dakika santrifuj edildi. Üstteki sıvıdan yaklaşık 1.5 ml yeni bir mikrosantrifuj tüpüne alınarak tekrar 14000 rpm’de 3 dakika santrifuj edildi. Yeni bir mikrosantrifuj tüpüne 15 µl Proteinaz K konularak üzerine örnek süpernatantından 200 µl ilave edildi. Üzerine 200 µl Buffer AL eklenerek vortekslendi ve 70°C’de 10 dakika inkubasyona bırakıldı. Bu kez 200 µl ethanol AL eklenerek vortekslendi. Yaklaşık 500 µl örnek spin kolona alındı. 14000 rpm’de 1 dakika santrifuj edilerek alt kısımdaki sıvı atıldı. Yeni koleksiyon tüpüne spin kolona 500 µl AW1 buffer eklendi. 14000 rpm’de 1 dakika santrifuj edildi. Sıvı koleksiyon tüpüne geçti. Spin kolon yeni bir koleksiyon tüpüne alındı. Tüpe 500 µl AW2 buffer eklenerek 14000 rpm’de 3 dakika santrifuj edildi. Sıvı koleksiyon tüpüne geçti. Spin kolon mikrosantrifuj tüpüne alındı. Üzerine 200 µl AE buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakikalık inkubasyondan sonra 8000 rpm’de 1 dakika santrifuj edildi ve spin atıldı. Altta kalan sıvı template DNA olarak kullanılmak üzere amplifikasyon işlemine kadar -20°C’de saklandı.

2.2.5.2. PCR Tabanlı Testler

Tez kapsamındaki çalışmalarda, Ikonomopoulos ve ark. (2009)’nın önerdiği ve kanatlılarda önemli mikobakteri türlerinin moleküler identifikasyonunda kullanılan, diagnostik algoritma baz alınarak, PCR tabanlı tanı testleri modifiye ve optimize edildi.



Şekil 2.1. Mikobakterilerin identifikasyonu için uygulanan diagnostik algoritma (Ikonomopoulus ve ark., 2009).

2.2.5.2.1. PCR

Tezde, primer spesifitelerinin kontrolünde, direkt bakteri sulandırılmaları ve bunlarla hazırlanan yapay kontamine örneklerle yapılan optimizasyon denemelerinde ve tez materyallerinin test edilmesinde PCR ve nested-PCR teknikleri kullanıldı. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan PCR karışımı ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan PCR karışımı (*Fermentas, Litvanya)

PCR Bileşeni	Stok Yoğunluğu	Hacim
10 x PCR Buffer*	-	2.5 µl
MgCl₂*	25 mM	3 µl
dNTP*	10 mM	0.5 µl
Primer 1F	10 µM	1 µl
Primer 1R	10 µM	1 µl
Taq polimeraz*	5U / µl	0.2 µl
Distile su	-	14.8 µl
Template DNA		2 µl

Çizelge 2.4. Tez çalışmasında PCR için uygulanan amplifikasyon koşulları

PCR Aşaması	Sıcaklık	Süre	Siklus
Ön denaturasyon	94°C	3 dk	1
Denaturasyon	94°C	1 dk.	30
Primer Bağlanması	54°C	1 dk.	
Uzama	72°C	1 dk	
Final Uzama	72°C	1 dk	1

2.2.5.2.1.1. PCR Optimizasyonu

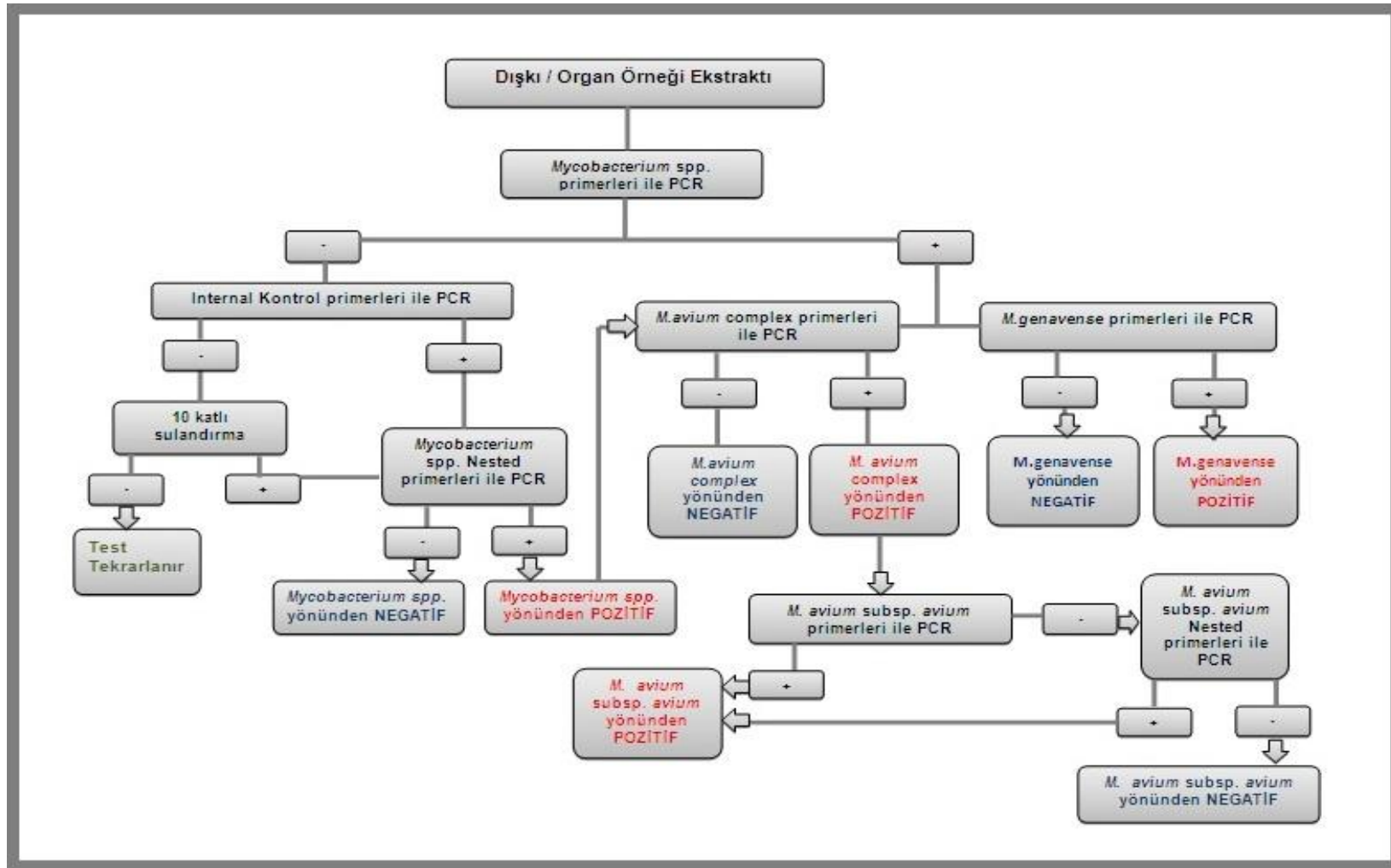
Tezde kullanılacak PCR koşullarının belirlenmesi amacıyla *M. avium* subsp. *avium* ve *M. fortuitum* sulandırılmaları ve bu sulandırılmaların ilave edildiği yapay kontamine örneklerle ait DNA'lara yukarıda belirtilen karışım ve koşullarda PCR uygulandı.

Tez materyallerinden rastgele seçilerek genel PCR uygulanan 5 adet dışkı ve 5 adet doku örneğine internal kontrol primerleri kullanılarak yine aynı koşullarda PCR uygulandı. Doku ve özellikle dışkıda ortaya çıkan inhibitör faktörlerinin PCR'a etkisinin azaltılmasını optimize etmek amacıyla 1/10 ve 1/100 olmak üzere iki farklı koşulda sulandırılmalar hazırlanarak internal kontrol primerleri ile PCR tekrarlandı. Bu denemeler ile sulandırma ile azalan inhibitörük içeriğin PCR üzerine etkisi kanatlı hayvan türlerinin 12SrRNA genlerinden dizayn edilmiş internal kontrol primerleri ile test edildi.

2.2.5.1.1.2. PCR Testleri

Tez materyali olarak 214 kuştan elde edilen 197 kuşa ait dışkı ve 22 kuşa ait organ örnekleri, yapılan standardizasyon çalışmaları sonuçlarına göre moleküler tekniklerle incelendi. İzlenen yöntem Şekil 2.2.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Tüm tez örneklerine öncelikle 16SrRNA bölgesini çoğaltan genus spesifik mikobakteri primerleri kullanılarak, yukarıdaki koşullarla genel PCR uygulandı. Bant görülen örneklerle genel PCR koşulları değiştirilmeden *M. avium* complex ve *M. genavense* primerleri ile PCR uygulandı. Bant görülmeyen örnekler internal kontrol primerleri ile materyalde bulunan kanatlı hücrelerine ait genetik materyal yönünden kontrol edildi. Genus ve tür spesifik primerler ile gerçekleştirilen PCR sonucunda bant görülmeyen ancak internal kontrol primerleri ile bant veren örneklerle nested PCR uygulandı.



Şekil 2.2. Tez çalışmasında izlenen moleküler yöntemin şematik gösterimi

2.2.5.2.2. Nested PCR

2.2.5.2.2.1. Nested PCR Test Optimizasyonu

Tezde test örnekleri kullanılacak nested PCR tekniğinin spesifite ve sensitivitesini (deteksiyon limiti) belirlemek amacıyla hazırlanan bakteri sulandırılmaları ve bunların dışkı ve organlara karıştırılması ile elde edilen yapay kontamine örneklerle 16srRNA genini hedefleyen nested PCR testleri uygulandı.

2.2.5.2.2.2. Nested PCR Testleri

Tez materyallerinin tamamına 16SrRNA ve IS901 genlerine yönelik nested PCR testleri uygulandı. Bu amaçla 16SrRNA için aynı genin 543 bp'lik porsiyonunu çoğaltan primerler ile ilk PCR ve bunun amplikonlarının template DNA olarak kullanıldığı, 274 bp'lik porsiyonunu çoğaltan primerler kullanılarak ikinci PCR gerçekleştirildi. Aynı şekilde IS901 için de aynı genin 509 bp'lik porsiyonunu çoğaltan NP1 ve NP2 primerleri ile ilk PCR ve bunun amplikonlarının template DNA olarak kullanıldığı, 376 bp'lik porsiyonunu çoğaltan NP3 ve NP4 primerleri ile ikinci PCR uygulandı.

Nested PCR testi için genel PCR karışım miktarları ve koşulları ile aynı amplifikasyon ve elektroforez aşamaları kullanıldı.

2.2.5.3. DNA Jel Elektroforezi

Elektroforez aşamasında % 1.5'luk agaroz (Prona, EU) jel kullanıldı. Optimizasyon ve tez örneklerinin elektroforezi için küçük ve büyük elektroforez tanklarından faydalanıldı. Büyük elektroforez tankı için 3 gr agaroz 200 ml 0.5 x TBE (Tris-Borate-EDTA) buffer ile karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında eritildi. Eriyen

agaroz yaklaşık 50°C'ye soğuyunca içerisine 8 µl ethidium bromid eklenerek karıştırıldı. Küçük tank için ise 0.75 gr agaroz, 50 ml 0.5 x TBE buffer ve 2 µl ethidium bromide kullanıldı. Yatay elektroforez şablonuna örnek tarakları yerleştirildikten sonra jel döküldü ve donması için yaklaşık yarım saat beklendi.

Elektroforez tankı 0.5 x TBE buffer ile doldurulduktan sonra hazırlanan jel tanka yerleştirildi. 2 µl 6 x Loading Dye solusyonu ile 10 µl PCR amplikon örneği parafilm üzerinde karıştırılarak jeldeki gözlere kondu. Yükleme işleminin ardından ilk gözlere 3 µl 100 bp'lik DNA molekül ağırlık standardı (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus; Fermentas, Litvanya) ilave edildi. Elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak büyük tank için 180 volt 60 dakika, küçük tank için 90 volt 40 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Örneklerin görüntülenmesi için elektroforez sonuçları biyo-görüntüleme sisteminde (Gene Genius, Sygene, İngiltere) incelendi ve kaydedildi. Bant büyüklükleri ve yoğunlukları Syngene Genesnap yazılımı ile belirlendi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ölü olarak getirilen 22 kafes kuşuna ait organ (karaciğer, dalak, bağırsak ve kemikiliği) ve gelen bu kuşlardan elde edilen 5 dışkı örneği ile dışarıdan toplanan 192 kafes kuşuna ait dışkı örneği mikobakteriyozis varlığı yönünden incelendi. Çalışmada toplam 51 organ ve 197 dışkı materyali kullanıldı.

3.1. Nekropsi ve Ziehl-Neelsen Boyama Bulguları

Nekropsisi yapılan 22 kafes kuşu ile bunlardan elde edilen 51 organda tüberküloz lezyonuna rastlanmadı.

Tez materyali olarak elde edilen 51 organ ve 197 dışkı materyaline uygulanan Ziehl-Neelsen boyama sonucunda, aside dirençli bakteriye rastlanmadı.

3.2. Kültür Optimizasyonu Bulguları

M. avium subsp. *avium* suşundan hazırlanan on katlı sulandırılmaların gliserinli Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeri, Middlebrook 7H9 (MB 7H9), Middlebrook 7H10 (MB 7H10) ve Middlebrook 7H11 (MB 7H11) besiyerlerine ekimleri sonucunda, direkt yapılan ekimlerde tüm besiyerlerinde üremeler gözlenirken (şekil 3.1), dışkı ve karaciğere karıştırılan sulandırmalardan gerçekleştirilen ekimlerde, bakteri yoğunluğu azaldıkça koloni formasyonunda da azalma görüldü. Üreme sonuçları çizelge 3.1'de verilmiştir.

Üremeler haftalar bazında değerlendirildiğinde, ilk haftanın sonunda MB7H11 ve MB7H9 besiyerlerinde mililitresinde 10^7 ve 10^6 bakteri bulunan sulandırmalar; L-J ve MB7H10 besiyerlerinde ise mililitresinde 10^7 bakteri bulunan sulandırmada üremelerin başladığı tespit edildi.

Çizelge 3.1. On katlı *Mycobacterium avium* subsp. *avium* sulandırmaları ile çeşitli katı besiyerlerine yapılan ekimlerin sonuçları

SULANDIRMALAR / BESİYERLERİ																								
	10 ^{7*}			10 ⁶			10 ⁵			10 ⁴			10 ³			10 ²			10 ¹			0		
	L-J	MB 7H10	MB 7H11	L-J	MB 7H10	MB 7H11	L-J	MB 7H10	MB 7H11	L-J	MB 7H10	MB 7H11	L-J	MB 7H10	MB 7H11	L-J	MB 7H10	MB 7H11	L-J	MB 7H10	MB 7H11	L-J	MB 7H10	MB 7H11
Direkt Ekim	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
Karaciğer ile	++	++	++	+	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Dışkı ile	+	++	+	++	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L-J: gliserinli Löwenstein-Jensen Besiyeri; MB 7H10: Middlebrook 7H10 besiyeri; MB 7H11: gliserinli Middlebrook 7H11 besiyeri.

(++): yoğun üreme; (+): üreme; (-) : üreme yok

Direkt: Bakteri sulandırmalarından direkt ekim yapıldı

Karaciğer ile: Bakteri sulandırmaları eşit hacimde ve aynı koşullar altında karaciğere karıştırıldı, dekontaminasyondan sonra ekimleri yapıldı

Dışkı ile: Bakteri sulandırmaları eşit hacimde ve aynı koşullar altında dışkıya karıştırıldı, dekontaminasyondan sonra ekimleri yapıldı

* Mililitresinde 10⁷ mikobakteri bulunan sulandırmayı temsil etmektedir (McFarland standardı 1. tüpe göre ayarlanmıştır).

Çizelge 3.2. On katlı *Mycobacterium avium* subsp. *avium* sulandırılmaları ile sıvı besiyerine yapılan ekimlerin sonuçları

SULANDIRMALAR / BESİYERLERİ								
	10 ^{7*}	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	0
	MB 7H9	MB 7H9	MB 7H9	MB 7H9	MB 7H9	MB 7H9	MB 7H9	MB 7H9
Direkt Ekim	++	++	++	++	++	++	+	-
Karaciğer ile	++	++	++	++	+	+	+	-
Dışkı ile	++	++	++	+	+	+	-	-

MB 7H9: Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri

(++): yoğun üreme; (+): üreme; (-) : üreme yok

Direkt: Bakteri sulandırılmalarından direkt ekim yapıldı

Karaciğer ile: Bakteri sulandırılmaları eşit hacimde ve aynı koşullar altında karaciğere karıştırıldı, dekontaminasyondan sonra ekimleri yapıldı

Dışkı ile: Bakteri sulandırılmaları eşit hacimde ve aynı koşullar altında dışkıya karıştırıldı, dekontaminasyondan sonra ekimleri yapıldı

* Mililitresinde 10⁷ mikobakteri bulunan sulandırmayı temsil etmektedir (McFarland standardı 1. tüpe göre ayarlanmıştır).

Üreme durumları besiyeri bazında değerlendirildiğine, en iyi üremenin MB7H10'da olduğu, ikinci sırada MB7H11 ve üçüncü sırada gliserinli L-J olduğu görüldü. L-J'de, diğer besiyerlerine göre daha fazla kontaminasyon tespit edildi. Koloni bazında yapılan incelemede, gliserinli L-J'de koloniler mukoid karakterde ve grimsi açık sarı renkte tespit edildi. MB 7H10 besiyerinde üreyen koloniler daha geniş, düzgün yapıda ve yağlı görünümde izlenirken MB 7H11 besiyerinde, kabarık, yaygın, açık sarı – krem renkli ve daha büyük gözlendi. Ayrıca MB 7H11 besiyeri inkubasyonun dördüncü gününden itibaren her iki günde bir mikrokoloni formasyonu yönünden incelendiğinde, ilk haftanın sonunda kenarlara doğru pürüzlü yapı gösteren mikrokoloniler tespit edildi.

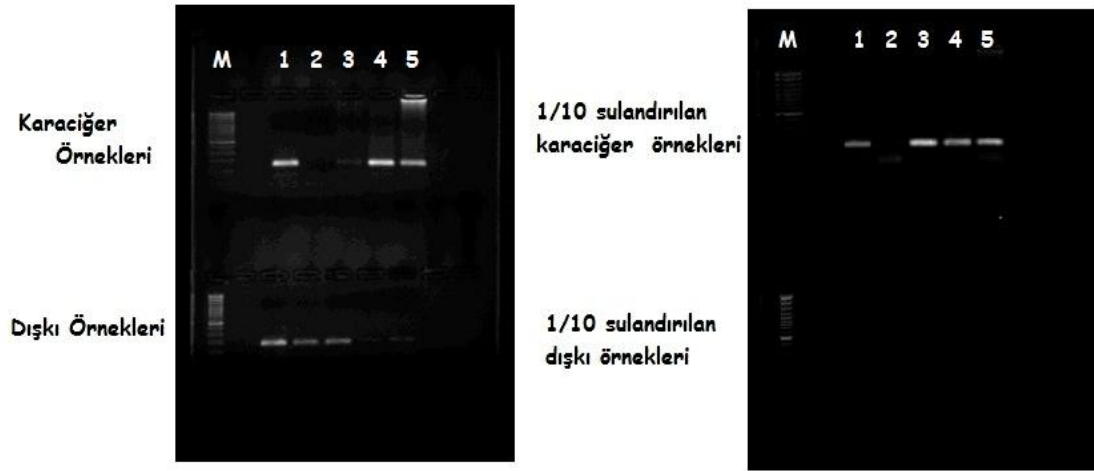
3.3. Kültür Bulguları

Tez materyali olarak toplanan 248 örneğin, gliserinli Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeri, Middlebrook 7H9 (MB 7H9), Middlebrook 7H10 (MB 7H10) ve Middlebrook 7H11 (MB 7H11) besiyerlerine ekimleri sonucunda hiçbir besiyerinde üreme gözlenmedi.

3.4. Moleküler Yöntem Optimizasyonu Bulguları

Optimizasyon esnasında standart suşlara ve sulandırılmaların karıştırıldığı dışkı ve karaciğer neklerine uygulanan ekstraksiyon metotları sonucunda Qiagen kitin (Standart Suşlar, yapay kontamine nekler ve diğer doku önekleri için DNeasy® Blood & Tissue Kit ve yapay Kontamine dışkı ve diğer tez dışkı önekleri için Qiaamp® Mini Stool Kit) tez ęalışması için en uygun ekstraksiyon yöntemi olduğu görüldü.

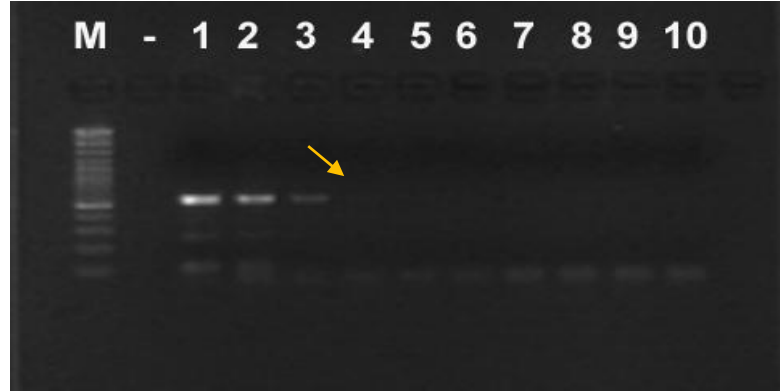
Tez materyallerinden 5 adet organ ve 5 adet dışkı olmak üzere rastgele seçilerek internal kontrol primerleri ile PCR ęalışması yapılan neklere, inhibitör maddelerin etkileri nedeniyle kanatlı hücrelerine ait genetik materyalin istenilen düzeyde görüntülenemediği tespit edildi. Bu amaçla, template DNA'nın 1/10 sulandırılmasıyla organlardaki inhibitör etkinin azaltılabildiği görüldü. Ancak sulandırmanın inhibitörler yanında hedef DNA kaybına da neden olduğu için dışkı neklerinde kullanılamayacağı belirlendi (Şekil 3.1). Ayrıca optimizasyonda denenen 1/100 sulandırmanın hem dışkı hem de organlarda hedef DNA kaybına neden olduğu belirlendi.



Şekil 3.1. Karaciğer ve dışkı örneklerine 12SrRNA internal kontrol primerleri (158 bp) ile uygulanan PCR bulguları ile on katlı sulandırma sonuçları bulguları

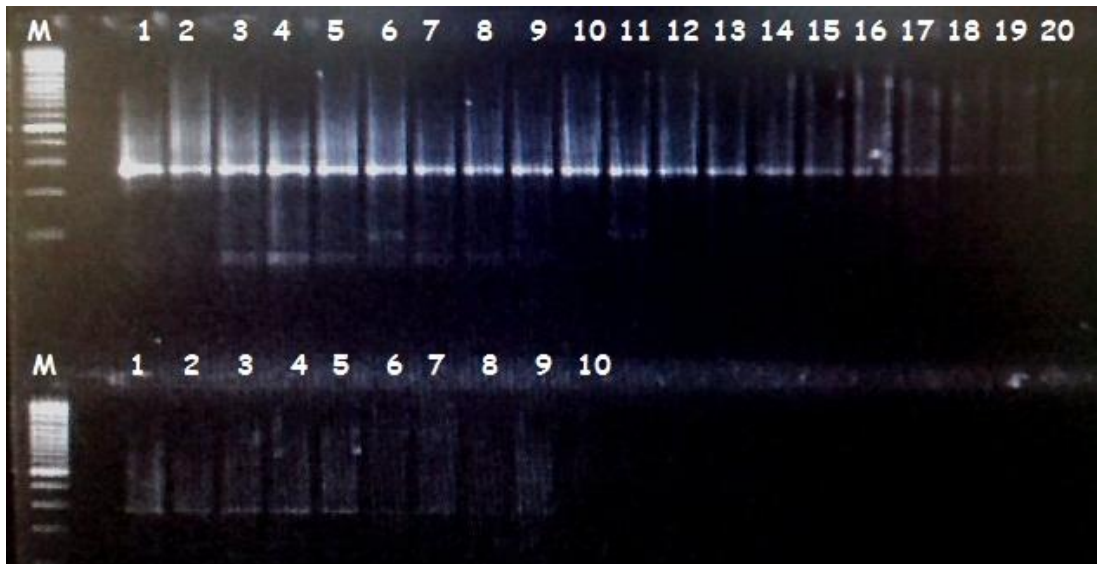
M. avium subsp. *avium* standart suşunun on katlı sulandırma serisine genus spesifik primerler ile uygulanan PCR sonucunda ilk dört sulandırmada 543 bp'lık spesifik bant saptandı (Şekil 3.2). Karaciğer ve dışkıya karıştırılan suş sulandırma serilerine aynı primer ve koşullarla uygulanan PCR sonucunda; yalnızca ilk sulandırmada bant saptandı. Dışkı örneğinde saptanan bantın karaciğer örneği ile karşılaştırıldığında daha zayıf olduğu görüldü.

Kullanılan moleküler yöntemdeki primerlerin ve dolayısıyla da yöntemin spesifitesi, öncelikle primerlerin *in silico* (bilgisayar ortamındaki) analizleriyle ve daha sonra pozitif kontrol DNA'larıyla *in vitro* (laboratuvar ortamında) analizleriyle test edilerek primerlerin yalnızca hedef DNA'yı çoğalttığı görüldü.



Şekil 3.2. On katlı standart suş sulandırmalarına 16SrRNA genus spesifik primerler (543 bp) ile uygulanan PCR bulguları

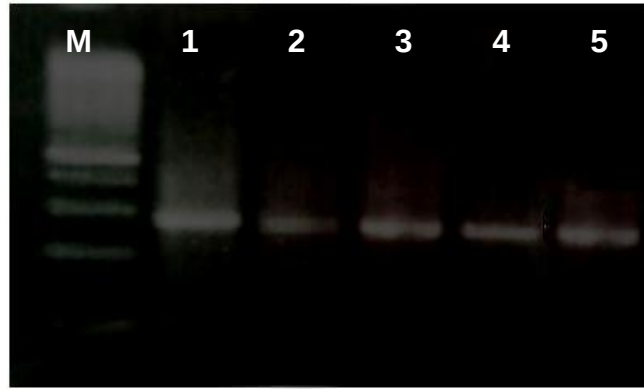
Genus spesifik primerlerle yapılan PCR'a sonucu elde edilen template DNA'lar ile nested primerleri kullanılarak ikinci bir PCR uygulandığında deteksiyon limitinin yükseldiği tespit edildi. Sulandırma serisi 10'dan 20'ye çıkarıldığında azalan bant yoğunluğu ile birlikte, nested PCR ile direkt standart suş sulandırmalarının 18. sulandırmaya kadar gittiği tespit edildi. Karaciğere karıştırılan 20 suş sulandırmasına nested PCR uygulandığında ise son bant 9. sulandırmada görüldü (Şekil 3.3). Dışkı örnekleriyle yapılan çalışmada ise son bantın 8. sulandırmada görüldüğü ve tüm bantların çok daha silik olduğu belirlendi.



Şekil 3.3. *M. avium* subsp. *avium* standart suşu ile hazırlanan on katlı sulandırma örneklerine uygulanan 16SrRNA nested PCR (274 bp) sonuçları. (Üst sıra direkt standart suş sulandırmaları, alt sıra karaciğere karıştırılan standart suş sulandırmaları)

3.5. PCR Bulguları

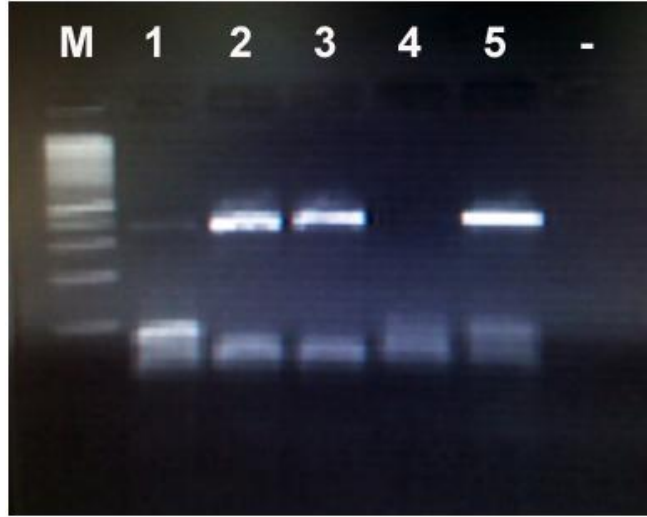
Tez materyallerine genus spesifik primerler ile uygulanan PCR sonucunda hiçbir örnekte bant görülmedi. İnternal kontrol primerleri ile test tekrarlanarak, kanatlı hücresi tespit edilen örneklerle *Mycobacterium* spp. nested primerleri ile PCR uygulandığında ise toplamda 5 örnekte 274 bp'lık spesifik bant saptandı (Şekil 3.4). Söz konusu 5 örneğin tamamı aynı yetiştirilme ortamından gelen farklı ispinoz kuşlarına ait karaciğer (4) ve dışkı (1) örnekleri idi.



Şekil 3.4. *Mycobacterium* spp. (16srRNA) primerleri (543 bp) ile uygulanan PCR amplikonlarının template DNA olarak kullanıldığı, 16SrRNA nested primerleri (274 bp) ile uygulanan nested PCR bulguları

Mycobacterium spp. yönünden pozitif değerlendirilen 5 örneğe IS1245 *M. avium* complex (427 bp), 21kDa protein *M. genavense* (219 bp) ve IS901 *M. avium* subsp. *avium* (509) primerleri ile PCR uygulandı. Yapılan PCR'lar sonucunda bant saptanmadı.

Aynı örneklere, IS901 *M. avium* subsp. *avium* primerleri ile (509) PCR yapılarak elde edilen amplikonların template DNA olarak kullanıldığı, *M. avium* subsp. *avium* nested PCR primerleri (375 bp) ile gerçekleştirilen ikinci PCR sonucunda 5 örneğin 4'ünde spesifik bant saptandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *M. avium* subsp. *avium* (IS901) primerleri (509 bp) ile uygulanan PCR amplikonlarının template DNA olarak kullanıldığı nested PCR bulguları (375 bp).

Yapılan moleküler çalışmalar ile ispinoz kuşlarının 4 tanesinin *M. avium* subsp. *avium*, diğer bir örneğin ise *M. avium* subsp. *avium*'dan farklı bir *Mycobacterium* spp. üyesi mikobakteri yönünden pozitif olduğu belirlendi.

Toplam 248 tez materyali baz alındığında; 248 materyalin 5 (%2)'sinde mikobakteri DNA'sı saptandı. Bu DNA'lardan 4 (%80)'inin *M. avium* subsp. *Avium* olduğu belirlendi. Nekropsisi yapılan kuş bazında incelendiğinde; 22 kuşun 5 (22,7)'sinde mikobakteriyel DNA saptandı. Doku materyalleri olarak; 51 materyalin 4 (%7,8)'ünde; değerlendirilen dışkı örnekleri baz alındığında ise 197 dışkı örneğinin sadece 1 (%0,5)'inde mikobakteri DNA'sı olduğu tespit edildi.

4. TARTIŞMA

Kanatlı mikobakteriyozisi dünya çapında yaygın bir hastalık olmakla birlikte doğada serbest bulunan kuşlar, pet kuşları, kafeste tutulan vahşi kuşlar ile diğer kanatlılarda sıklıkla görülmektedir. Kuşlarda mikobakteriyozis son zamanlarda sıklıkla rapor edilmiş ve *M. avium* subsp. *avium*'u da içeren *M. avium* complex (MAC) etkenleri dışında *M. genavense* kanatlı tüberkülozundan sorumlu başlıca mikobakteri türleri olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada, kafes kuşlarının dışkı ve organ örneklerindeki tüberküloz etkenlerinin kültür ve moleküler yöntemlerle teşhisi hedeflenmiştir.

Çalışmada 22 kafes kuşundan elde edilen nekropsi materyalinde tüberküloz lezyonları görülmedi. Bununla birlikte, 22 kuştan 4'ünde moleküler yöntemlerle tüberküloz etkenleri tespit edildi. Kriz ve ark. (2011), 435 evcil güvercinin 42 (%9)'sinde makroskopik lezyonlar tespit etmişlerdir. Lanteri ve ark. (2011), erişkin, dişi bir kırmızı tepeli amazon papağanının nekropsisinde kaslarda, femur kemiğinde ve karaciğerde tüberkeller bulmuştur. Ledwon ve ark. (2008), muhabbet kuşlarında gerçekleştirdikleri deneysel infeksiyonda, *M. avium* subsp. *avium* ile infekte ettikleri kuşların nekropsilerinde karaciğer, dalak gibi organlarda herhangi bir lezyona rastlamadıklarını, yalnızca enjeksiyon yerinde küçük tüberkeller oluştuğunu; *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ve *M. intracellulare* ile infekte edilen muhabbet kuşlarında ise makroskopik oluşum tespit edilmediğini belirtmişlerdir. Witte ve ark. (2008), San Diego Hayvanat Bahçesi'nin on dört yıllık nekropsi kayıtlarını inceleyerek 13.976 kuşun yalnızca 172 (%1.2)'sinde hastalığa dair makroskobik bulguya rastlamışlardır. Tell ve ark. (2003a), yapay infekte ettikleri 8 bıldırcını incelediklerinde ilk makroskopik bulguların etkenin vücuda girişinden yaklaşık 50 gün sonra şekillendiğini bildirmişlerdir. Tez bulguları bu çalışmalar ışığında değerlendirildiğinde, hastalık etkenleri yönünden pozitif tespit edilen kuşların, bu etkenleri kısa bir süre önce almış oldukları düşünülebilir. Ayrıca, incelenen kuş ve/veya materyal türü ve sayısı nekropsi bulgularını etkileyebilir.

Bu çalışmada, Ziehl-Neelsen (Z-N) boyama yöntemi ile incelenen 248 tez materyalinde aside dirençli bakteriler (ARB) tespit edilmedi. Nolte ve Metchock (1995) ile Butcher ve ark. (1996), aside dirençli bakterilerin Ziehl-Neelsen boyama ile tespit edilebilmesi için preparatta en az 1×10^4 - 5×10^4 bakteri olması gerektiğini bildirmiştir. Kriz ve ark. (2011)'nın yaptıkları çalışmada 42 karaciğerde nodüler lezyonlu, 55 lezyonsuz ve 20 yavru güvercinden oluşan toplam 117 evcil güvercin karaciğerine yapılan Z-N boyama sonucunda 19 (%16.2) örnekte ARB tespit etmişlerdir. Tez çalışması kapsamında incelenen materyallerden Z-N boyama ile ARB tespit edilememesi, mikobakteri yönünden pozitif olan örneklerden hazırlanan preparatların 5×10^3 'den az etken içermesi ile ilişkilendirilebilmektedir. Bununla birlikte incelenen karaciğer ve dalakların, boyama için hazırlanması esnasında mikroorganizma kaybı olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Kültür optimizasyonu amacıyla gerçekleştirilen *M. avium* subsp. *avium* ekimleri sonucunda; seçilen dört besiyerinde de üreme gözlemlendi. Optimizasyonda direkt bakteri ekimlerinden deteksiyon limiti 10 bakteri olarak tespit edilirken, karaciğer ve dışkıya karıştırılan bakteri sulandırılmalarında deteksiyon limitinin 100 bakteriye çıktığı gözlemlendi. Nolte ve Metchock (1995) ile Butcher ve ark. (1996), aside dirençli bakterilerin standart kültür metotları ile tespit edilebilmesi için militrede en az 10-100 bakteri olması gerektiğini bildirmektedirler. *M. avium* için çeşitli besiyerlerinde deteksiyon limiti çalışması bulguları çalışma ile uyumlu bulundu.

Çalışmada besiyerleri karşılaştırıldığında en erken üreme MB7H11'de, en yoğun üreme ise MB7H10'da tespit edildi. Stager ve ark. (1991) ile Wilson ve ark. (1995), L-J ile MB7H11 agarları karşılaştırmışlar ve MB7H11'in daha iyi sonuç verdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulgularına benzetmekle birlikte, L-J'a göre koloni morfolojisinin incelenebilirliği ve kontaminasyon azlığı bakımından da MB7H11'i, üreme yoğunluğu bakımından ise MB7H10'u öne çıkarmaktadır.

Bu çalışmada incelenen 197 dışkı ile 22 kuşa ait nekropsi materyalinin çeşitli besiyerlerine ekimleri sonucunda üreme tespit edilmedi. Ledwon ve ark. (2008), muhabbet kuşlarında yaptıkları deneysel çalışmada *M. avium* subsp. *avium* ile infekte ettikleri kuşlarda, inokulasyondan üç gün sonra, *M. intracellulare* ile infekte ettikleri kuşlarda ise inokulasyondan 13 gün sonra dışkı ile AFB atılımı tespit etmişler ancak dışkıdan etkeni kültüre edememişlerdir. Hejlícek ve Tremł (1994) farklı yedi bölgeden gelen toplam 470 güvercini mikobakteriyozis yönünden incelemiş ve nekropside 2 (%0.43), izolasyonda ise 5 (%1.06) güvercinde hastalığı tespit etmişlerdir. Smit ve ark. (1987), ise organlardan L-J ve MB7H10 besiyerlerine ekim yaparak inceledikleri 11.664 kuştan 82 (%0.7)'sinde mikobakteri üremesi saptamışlardır. Hoop ve ark. (1993)'nın yaptıkları çalışmada üç muhabbet kuşu (*Melopsittacus undulatus*), bir papağan (*Amazona amazonica*), bir sinekkapan kuşu (*Cyanoptila cyanomelana*) ve bir ispinoz (*Taeniopygia guttata*)'un karaciğerlerinden ARB tespit edilmesine rağmen, L-J besiyerinde hiçbir üreme olmamıştır, etkenin altı kuşun tümünde *M. genavense* olduğu ise PCR ile tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen farklı sonuçların, materyallerin tüberküloz bakımından şüpheli hayvanlardan seçilip seçilmemesi, etkenin dışkı ile saçılımının sürekli olmaması ve materyallerde geleneksel metotlar ile kültüre edilemeyen mikobakteri türlerinin varlığı gibi faktörlerle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada kültür sonuçlarının en erken üçüncü haftanın sonunda alındığı, bunun yanında moleküler yöntemlerle çalışıldığında DNA ekstraksiyonu ile birlikte 4 saat içinde sonuca gidildiği, nested PCR uygulamasının süreyi en fazla 6 saate çıkardığı tespit edilmiştir. Pavlik ve ark. (2000), *Mycobacterium avium* complex ile ilgili çalışmalarda farklı yöntemler kullanmış ve bu yöntemler arasında PCR ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniklerinin süre bakımından en hızlı sonuca varan teknikler olduğunu belirtmişlerdir. Tell ve ark. (2003b) ise kanatlı örneklerinden real-time PCR yöntemi ile *Mycobacterium avium* complex ve *M. genavense* saptamışlardır. Çalışma bulguları ile de desteklenen bu bilgiler ışığında, özellikle antemortem teşhiste, kısa süre içinde hastalık tespiti yapmak açısından moleküler tekniklerin öncelikli kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Moleküler tekniklerle yapılan çalışmalarda, PCR'ı takiben gerçekleştirilen elektroforezde spesifik DNA bandı görülmeyen örneklerde olası PCR inhibitörlerine bağlı yanlış negatifliğin kontrolü amacıyla internal kontrol primerleri ile PCR uygulandı. Internal kontrol primerleri kanatlı hücrelerine spesifik olarak tasarlandı. Bu amaçla, doku ve dışkıları internal kontrol primerleri ile tekrar PCR'a tabi tutularak, örnekte spesifik DNA ve inhibitör varlığı ve bunların birbirlerine oranı ve tüm bu parametrelerin PCR testi üzerindeki etkileri araştırıldı. Rosenstraus ve ark. (1998) internal kontrol kullanımının, PCR için inhibitör etki taşıyan örneklerin yeniden test etmek koşuluyla identifiye edilmesine olanak sağlayarak PCR tabanlı testlerde testin sensitivitesini arttırdığını savunmaktadır. Özbek ve ark. (2003)'nın sığır dışkılarında *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in moleküler araştırması için yaptıkları çalışmada, sığır dışkısında bitki bulunacağı görüşünden yola çıkarak, internal kontrol olarak bitki genlerini hedeflemişlerdir. Internal kontrol primerleri ile gerçekleştirilen bir PCR'da amplifikasyonun doğruluğu ve test örneklerinin gerçek negatif olup olmadığını gösterme durumu söz konusudur. Internal kontrol kullanımının, özellikle yanlış negatif PCR sonuçlarının tekrar değerlendirilmesini sağlayacağından kanatlı tüberkülozun moleküler tanısında gerekli olduğuna inanılmaktadır.

Tezin moleküler çalışmasında sensitivite ve spesifiteyi arttırmak amacıyla nested PCR uygulanmış, moleküler deteksiyon limitinin ilk PCR'a göre yaklaşık 5 kat arttığı tespit edilmiştir. Miyazaki ve ark. (1993), yaptıkları çalışmada nested PCR sonuçlarının ilk PCR'a göre çok daha hassas sonuç verdiği ve deteksiyon limitini yükselttiğini göstermiştir. Nested PCR'da, birinci PCR sonucunda elde edilen ürünler, ilk PCR'da hedeflenen bölgenin içerisindeki daha kısa ikinci bölgeyi hedefleyen ikinci PCR'da template DNA olarak kullanıldığı için spesifite ve sensitiviteyi artmaktadır. Nested PCR stratejisinin tüberkülozun moleküler tanısına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmada, özellikle internal kontrol primerleri ile gerçekleştirilen PCR testleriyle doku ve dışkıları inhibitörlerin varlığı ve etkileri ortaya kondu. İnhibitörlerin etkilerinin azaltılması için bazı örneklerde ait DNA'lar 10 kat

sulandırılarak yeniden PCR testine tabi tutuldu. Kullanılan materyalin büyük kısmı dışkı olması ve bu dışkıların kirli kafes altlıklarından izole edilmesi sebebiyle, örneklere moleküler teknikler uygulanırken inhibitörlerin test üzerindeki olumsuz etkilerinin aşılması için yapılan sulandırmalarda hedef DNA kaybı da görüldü. Rosenstraus ve ark. (1998), inhibitörlerin PCR’da hedef molekülden elde edilen ürün miktarını azaltarak amplifikasyon verimliliğini düşürdüğünü bildirmiştir. Chambers ve ark. (2001) kanatlı dışkısında, özellikle de idrar ile karışık olduğu için inhibitörlerin yoğun miktarda bulunduğuna işaret ederek, bu durumun ortadan kaldırılması için seçilen ekstraksiyon tekniğinin değiştirilmesini önermiştir. Bunun yanında Monterio ve ark. (1997), ekstraksiyon metodunun da tam anlamıyla inhibitörleri ortadan kaldırmaya yetmediğini, özellikle kompleks polisakkaritlerin ortamda kaldığını ve PCR sonuçlarını inhibe ettiğini savunmuşlar ve inhibitör etkisini azaltmak için örnekleri dilue etmişlerdir. Tez kapsamında yapılan optimizasyon çalışmalarında, özellikle de dışkı gibi çeşitli ve yüksek oranda inhibitör maddeler içeren materyallerle çalışılırken yanlış negatif sonuçlar vermesi bakımından PCR inhibitörlerinin önemi ve etkisi ortaya konmuştur. Tez çalışmasında daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda da olduğu gibi, seçilen ekstraksiyon tekniği ve dilusyolarla inhibitörük etkinin azaltılabileceğini vurgulamaktadır.

Çalışmada tüberküloz yönünden pozitif olduğu tespit edilen materyaller moleküler yöntemlerle incelendiğinde 5 örneğin 4 (%80)’inin *M. avium* subsp. *avium*, diğer 1 (%20) örneğin farklı bir mikobakteri olduğu tespit edilmiştir. Hoop ve ark. (1996), 5.345 pet kuşu üzerinde gerçekleştirilen bir araştırmada *M. genavense*’yi kuşlarda en baskın mikobakteri türü olarak tanımlanmıştır. Mikobakteri saptanan örneklerin %71’inde *M. genavense* ve sadece %17’sinde *M. avium* tespit edilmiştir. Tespit edilen diğer mikobakteri türleri ise *M. fortuitum* (%4), *M. tuberculosis* (%4), *M. gordonae* (%2) ve *M. nonchromogenicum* (%2)’dur. Holsboer-Buogo ve ark. (1997) ise, 253 kuşun %73’ünde *M. genavense*, %11.5’inde *M. avium*, ve sadece bir kuşta *M. fortuitum* tespit etmişlerdir. Her iki araştırmacı da *M. genavense*’yi organlardan, BACTEC ve PCR ile tespit etmişlerdir. *M. genavense*’nin kültürü için BACTEC sistemine gereksinim duyulmaktadır. Kuşlarda *M. genavense* tanısının yarı

veya tam otomatize sistemler ile kültürü yanında *M. genavense* için tasarlanabilecek nested PCR primer ve stratejileri kullanılarak yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan materyallerin ait olduğu hayvanlara ilişkin hazırlanan anamnez formları incelendiğinde, oküler nodüler lezyon, kronik ishal ve zayıflama gibi tüberküloz şüpheli klinik bulgular gösteren iki adet papağanın sahibi, babasının uzun süre tüberküloz tedavisi gördüğünü bildirilmiştir. Papağanların dışkılarından yapılan inceleme sonucunda mikobakteriye rastlanmamıştır. Washko ve ark. (1998) aynı evde yaşayan iki bireyin tüberküloz tedavisi gördüğü ve bundan dört yıl sonra sahip oldukları papağanda *M. tuberculosis*'e rastladıklarını belirtmişlerdir. Miyoshi ve ark. (2010) 15 yaşında sağlıklı bir erkek çocukta *M. genavense* tespit etmiş ve araştırmada hastanın sıklıkla su kenarlarında ve sahip olduğu balık, köpek, tavşan ve kaplumbağalarla oynadığını bildirmişlerdir. Araştırmacıya elektronik posta ile hastanın sahip olduğu hayvanlarda mikobakteri tespiti yapılıp yapılmadığı sorulmuş, yanıtta söz konusu hayvanların öldüğü ve *M. genavense*'den şüphelenildiği belirtilmiştir. Kuşlarda ve diğer pet hayvanlarında bulunan çoğu tüberküloz etkeninin özellikle immun sistemi baskılanmış bireylerde önem arz etmesi bakımından, yapılan araştırmalara hayvan sahiplerinin de dâhil edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, 19 farklı kuş cinsine ait 214 kuştan elde edilen toplam 248 materyal kanatlı tüberküloz etkenleri varlığı yönünden boyama, kültür ve moleküler yöntemlerle araştırıldı. Çalışmada aşağıdaki sonuçlara varıldı.

- Kuşlardan alınan organ ve dışkı örneklerinin boyama ve kültür sonuçlarında mikobakteri tespit edilmedi.
- Kültür optimizasyonunda en iyi üremenin MB7H10 agarda olduğu görüldü.
- Farklı 5 ispinoza ait 4 karaciğer ve 1 dışkı örneği moleküler yöntemler ile incelendiğinde 3 karaciğer ve 1 dışkıda *Mycobacterium avium* subsp. *avium*; diğer 1 ispinoz karaciğerinde ise *Mycobacterium* spp. tespit edildi.
- Nested PCR ile tüberküloz etkenlerinin moleküler deteksiyon limitinin arttığı ve özellikle konvansiyonel kültür ve boyama metotlarının uygulanma zorluğu ve süre kısıtlaması olduğu tüberküloz tanısında nested PCR'ın kullanılabileceği belirlendi.
- Tüberküloz tanısı amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu kullanılırken internal kontrol primerleri ile yanlış negatif PCR sonuçlarının önüne geçtiği tespit edildi.
- Organ örneklerinde bulunan inhibitörlerin moleküler tespit aşamasında 1/10 sulandırma ile azaltılabildiği, bunun yanında dışkı örneklerindeki inhibitörlerin giderilmesi için sulandırmanın hedef DNA kaybına neden olması bakımından kullanılamayacağı görüldü.
- Mikobakteri izolatlarının moleküler doğrulaması ve/veya identifikasyonu için hedef genlere yönelik tek bir PCR yapılması yeterli iken, doku ve dışkı örneklerinden direkt tanılamada ise bu materyallerin fazla miktarda inhibitör madde içermesi, bununla birlikte bu materyallerdeki etken sayısının dolayısıyla da hedef DNA miktarının azlığı nedeniyle; sensitivite ve spesifitesi yüksek olan nested-PCR tekniğinin uygun olduğu görüldü.

Hastalığın etken kültürü ile ortaya konması amaçlanıyorsa yarı otomatize veya tam otomatize sistemlerin kullanılması, hem inkubasyon süresinin kısalması hem de kültürü yapılamayan *M. genavense* gibi türlerin izolasyonu amacıyla faydalıdır.

Hastalığın moleküler teşhisinde internal kontrol primerleri ve nested-PCR ile desteklenen yöntemler ile Taq-Man problemleri kullanımına dayalı real-time PCR gibi moleküler tekniklerin kullanılması ile kafes kuşlarında daha etkin bir mikobakteri tanısının gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

Etkenin hücre içi bir organizma olmasından dolayı, ekstraksiyon aşamasına hc parçalamaya dayalı tekniklerin eklenmesi, daha fazla mikobakteri hücresinin ortaya çıkması bakımından yararlı olacaktır.

Bu çalışmada, insanlarla iç içe olan kafes kuşlarında zoonoz önemi olan mikobakterilerin varlığı ortaya konmuş ve özellikle halk sağlığı bakımından değerlendirildiğinde hastalığın önemine dikkat çekilmiştir.

Kuş yetiştiricileri, satıcıları ve evlerinde kuş bakan bireylere hastalıkla ilgili bilgi verilmesi ve özellikle yetiştiricilikte hijyen uygulamaları ile sürü taramasına ve hasta kuşların ayrılarak hastalıktan arı sürüler oluşturulması konusunda bilgilendirme çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

ÖZET

Kafes Kuşlarında Tüberküloza Neden Olan Etkenlerin Kültür ve Moleküler Yöntemlerle Teşhisi

Kanatlı mikobakteriyozisi dünya çapında önemli bir hastalık olmakla birlikte, hastalığın tanısı oldukça zahmetli ve zordur. Bu çalışmada, farklı cins kuşlardan alınan organ ve dışkı örnekleri kültür ve Ziehl Neelsen boyama (Z-N) ve moleküler teknikler ile tüberküloz yönünden değerlendirildi. Kültür için 4 farklı besiyeri (Gliserollü Löwenstein-Jensen, ADC ile zenginleştirilmiş Middlebrook 7H9 buyyon, OADC içeren Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar) kullanılarak *M. avium* subsp. *avium* için deteksiyon limiti tespit edildi ve tez materyalleri etken izolasyonu bakımından değerlendirildi. Tüm örneklerle aside-dirençli boyama metodu olarak Z-N tekniği uygulandı. Moleküler çalışmalar kapsamında mikobakteriler için deteksiyon limiti belirlendi, hazırlanan yapay kontamine örnekler ve tez materyalleri internal kontrol primerleri ve nested PCR ile incelendi.

Bu çalışma kapsamında 19 farklı cinse ait 214 kuştan elde edilen toplam 197 dışkı ile 51 organ kanatlı mikobakteriyozisi yönünden incelendi. Tüberküloz yönünden incelenen 22 kuşun nekropsisinde herhangi bir lezyona rastlanmadı. Toplam 248 materyalde, Ziehl-Neelsen boyama ile aside dirençli bakteri saptanmazken, dört farklı besiyerine yapılan ekimler sonucunda herhangi bir mikobakteri izolasyonu yapılmadı. Deteksiyon limiti tayini için yapılan çalışmada limit 10-100 bakteri olarak belirlendi. Moleküler çalışmalar öncesi gerçekleştirilen optimizasyonda, inhibitörlerin test sonuçlarına etkisi araştırıldı. Tez materyallerinden yapılan ilk PCR sonucunda mikobakteri DNA'sı saptanmazken, nested primerleri ile gerçekleştirilen prosedür sonucunda 5 örnek (farklı ispinozlara ait 1 dışkı ve 4 karaciğer) *Mycobacterium* spp. yönünden pozitif bulundu. *M. avium* subsp. *avium* primerleri ile yapılan bir diğer nested PCR ile 4 örneğin (farklı ispinozlara ait 1 dışkı ve 3 karaciğer) *M. avium* subsp. *avium*, 1 örneğin (ispinoz karaciğeri) ise *M. avium* subsp. *avium*'dan farklı bir mikobakteri türü olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, kanatlı mikobakteriyozisi yönünden incelenen örneklerden boyama ve kültür çalışmaları ile tüberküloz etkenleri tespiti yapılamazken, aynı örneklerden beş tanesinde PCR ve nested PCR ile mikobakteriyel DNA tespit edildi. Uygun ekstraksiyon yöntemi seçiminin klinik ve nekropsi örneklerinde bulunan inhibitörlerin elimine edilmesi bakımından önemli olduğu ve internal kontrol kullanımının yanlış negatif sonuçların önüne geçtiği belirlendi. Tüberkülozun özellikle antemortem teşhisi için, moleküler tekniklerin özgüllük ve duyarlılığı optimizasyon çalışmaları ile gösterildi. Ayrıca hastalığın hem hayvan hem de insan sağlığı açısından zoonotik potansiyeli değerlendirilerek kuş üretici, yetiştirici ve bakıcılarının hastalık hakkında bilgilendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Kafes kuşları, kültür, mikobakteri, PCR

SUMMARY

Diagnosis of Mycobacteria Causing Avian Tuberculosis in Caged Birds by Culture and Molecular Techniques

Avian mycobacteriosis is a worldwide important disease and diagnosis of the disease is very laborious and difficult. In this study, tissue and fecal samples obtained from different genres of birds were investigated for the presence of tuberculosis by culture, Ziehl-Neelsen stain (Z-N) and molecular techniques. Four different culture media (Löwentein-Jensen [L-J] with glycerol, Middlebrook 7H9 broth supplemented with ADC, Middlebrook 7H10 agar with OADC and Middlebrook 7H11 with OADC) were used to determine the detection limit for *M. avium* subsp. *avium*, and thesis materials were investigated with these culture media in terms of mycobacteria isolation. All samples were investigated with Ziehl-Neelsen (Z-N) technique as acid-fast staining method. Detection limit for mycobacteria was determined within molecular studies. Artificially contaminated samples and thesis materials were investigated with internal control primers and nested PCR.

Within the scope of this study 197 stool and 51 organ samples obtained from 214 birds belonging to 19 different genres were examined for avian tuberculosis. No evidence of any lesions in necropsy of 22 birds was examined in terms of tuberculosis. Acid fast bacteria have not been identified with Ziehl-Neelsen stain, and mycobacterial isolations have not been made in any of the four different culture media from a total of 248 materials. Detection limit was identified as 10-100 bacteria. The effect of the inhibitors was investigated in the optimization studies carried out before the molecular tests. While no mycobacterial DNA was detected after the initial PCR, by the help of the nested primers included to the procedure, 4 samples were detected to be positive for *Mycobacterium* spp. Another nested PCR made with *M. avium* subsp. *avium* primers, detect 5 (1 stool and 4 liver from different finches) sample as *M. avium* subsp. *avium* and 1 (finch liver) sample detected as a mycobacterium other than *M. avium* subsp. *avium*.

As a conclusion, while no mycobacterium was identified with stain and culture studies from samples those have been surveyed for avian mycobacteriosis, mycobacterial DNA was detected from 5 samples with nested PCR. It has been determined that selection of appropriate extraction method is important for the elimination of inhibitors in clinical and necropsy samples and inclusion of internal controls to the overall investigation procedure could prevent the false negative results. The specificity and sensitivity of molecular techniques used especially for antemortem diagnosis were determined in the optimization studies. It is concluded that, manufacturers, bird breeders and bird sitters should be informed about the disease and its zoonotic potential threatening of both animal and human health.

Key Words: Caged birds, culture, mycobacterium, PCR

KAYNAKLAR

- ABDALLA, K.E. (2010). Kuş tipi mikobakteriyozisin tavuk ve hindi sürülerinde kültür ve pcr teknikleri ile teşhisi. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Vet. Fak., Ankara.
- AKAY, Ö. (1980). Hindi Tüberküloz Etkenlerinin İzolasyon, İdentifikasyon, Tiplendirilmesi ile Deneyisel Hindi Tüberkülozisinde Allerjik ve Serolojik Yöntemlerin Uygulanması Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi. Ankara Üniv. Vet. Fak., Ankara.
- AKAY, Ö. (1999). Aside-Dirençli Bakteriler. In *Özel Mikrobiyoloji*. 4. baskı Ed.: M. Arda, A. Minbay, N. Leloğlu, N. Aydın, M. Kahraman, Ö. Akay, A. Ilgaz, M. İzgür, K.S. Diker. Medisan Yayınevi. Ankara. s.: 180-202.
- AKAY, Ö. (2002). Tüberkülozis. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Ed.: M. İzgür, and M. Akan. Medisan Yayınevi. 1. Baskı. Ankara, s.: 101-104.
- ALSTEENS, D., VERBELEN, C., DAGUE, E., RAZE, D., BAULARD, A.R., DUFRÊNE, Y.F. (2008). Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view, *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.*, **456**: 117-125.
- ANAGYROS, P., ASTILL, D.S.J., LIRA, I.S.L. (1990). Comparison of improved BACTEC and Löwenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1288-1291.
- ANTINOFF, N., HOEFER, H., KIEHN, T. BÖTTGER, E. (1996). Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium genavense* in a psittacine bird. *Proceedings of the 17th Annual Conference and Expo of the Association of Avian Veterinarians*, Tampa, Florida, USA, p.: 169-170.
- ARANAZ, A., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L., (1997). Laboratory diagnosis of avian mycobacteriosis, *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **6**: 9-17.
- AVANISS-AGHAJANI, E.A, JONES, K., HOLTZMAN, A., ARONSON, T., GLOVER, N., BOIAN, M., FROMAN, S., BRUNK, .F., (1996). Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 98–102.
- BENSON, C.A., ELLNER, J.J. (1993). *Mycobacterium avium* complex infection and AIDS: Advances in theory and practice. *Clin. Inf. Dis.* **17**: 7-20.
- BERAN, V., HAVELKOVA, M., KAUSTOVA, J., DVORSKA, L., PAVLIK, I. (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: A Review. *Vet. Med.*, **51**: 365–389.

- BERMUDEZ, L. (1994). Immunobiology of *Mycobacterium avium*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 1000-1006.
- BIET, F., BOSCHIROLI, M.L., THOREL, M.F., GUILLOTEAU, L.A. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC). *Vet. Res.* **36**: 411-136.
- BOIAN, M., AVANISS-AGHAJANI, E., WALKER, R., ARONSON, T., TRAN, T., GLOVER, N., BERLIN, O.G.W., WOODS, L., BRUNK, C., LI, J.L., FROMAN, S., HOLTZMAN, A. (1997). Identification of *Mycobacterium genavense* in intestinal tissue from a parakeet using two polymerase chain reaction methods: are pets a reservoir of infection in AIDS patients? *AIDS*, **11**: 255–256.
- BOUGIOUKLIS, P., BRELLOU, G., FRAGKIADAKI, E., IORDANIDIS, P., VLEMMAS, I., GEORGOPOULOU, I., (2005). Outbreak of avian mycobacteriosis in a flock of two-year-old domestic pigeons (*Columba livia f. domestica*). *Avian Dis.* **49**: 442-445.
- BOWES, V. (1993). Avian tuberculosis in ostrich. *Can. Vet. J.* **34**: 758.
- BÖTTGER, E.C., (1994). *Mycobacterium genavense*: An emerging pathogen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 932-936.
- BÖTTGER, E.C., TESKE, A., KIRSCHNER, P., BOST, S., CHANG, H.R., BEER, V., HIRSCHHEL, B. (1992). Disseminated "*Mycobacterium genavense*" infection in patients with AIDS. *Lancet*, **340**: 76-80.
- BÖTTGER, E.C., HIRSCHHEL, B., COYLE, M.B., (1993). *Mycobacterium genavense* sp. Nov. *Int. J. of Sys. Bact.* **43**: 841-843.
- BRENNAN, P.J., NIKAIIDO, H. (1995). The envelope of Mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29-63.
- BUTCHER, P.D., HUTCHINSON, N.A., DORAN, T.J., DALE, J.W. (1996). The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. In: *Mycobacterial disease - old problems, new solutions. J. Apl. Bacteriol.*, **81**: 53-71.
- CHAMBERS, P.A., DUGGAN, P.S., FORBES, J.M., HERITAGE, J. (2001). A rapid, reliable method for the extraction from avian faeces of total bacterial DNA to be used as a template for the detection of antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.*, **47**: 241-243.
- CHESTER, F. D. (1901). A manual of determinative bacteriology, New York: The Macmillan Co., p.: 536-537.
- CLARK, S.L., COLLINS, M.T., PRICE, J.P. (1995). New methods for diagnosis of *Mycobacterium avium* infection in birds. *Proc. Annu. Conf. Am. Assoc. Zoo. Vet., Wildl. Dis. Assoc., Am. Assoc. Wildl. Vet. Joint. Conf.* 151–154.

- COYLE, M.B., CARLSON, C., WALLIS, C.K., LEONARD, R.B., RAISYS, V.A., KILBURN, J., SAMADPOUR, M., BOTRGER, E.C., (1992). Laboratory aspects of *Mycobacterium genavense*, a proposed species isolated from Aids patients. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 3210-3212.
- CROMIE, R.L., BROWN, M.J., PRICE, D.J., STANFORD, J.L. (1991). Susceptibility of captive wildfowl to avian tuberculosis: The importance of genetic and environmental factors. *Tubercle*, **72**: 105-109.
- CROMIE, R.L., BROWN, M.J., FORBES, N.A., MORGANS, J., STANFORD, J.L. (1993). A comparison and evaluation of techniques for diagnosis of avian tuberculosis in wildfowl. *Avian Dis.* **22**: 617-630.
- CROMIE, R.L., ASH, N.J., BROWN, M.J., STANFORD J.L. (2000). Avian immune responses to *Mycobacterium avium*: The wildfowl example. *Devel. and Comp. Imm.* **24**: 169-185.
- DABORN, C.J., GRANGE, J.M. (1993). HIV/AIDS and it's implication for the control of animal tuberculosis. *British Vet. J.*, **149**: 405-417.
- DAVIS, D.E., CARPENTER, J.L., TREVINO, S., KOCH, J., OGNIBENE, A.J. (1987). In vitro susceptibility of *Mycobacterium avium* complex to antibacterial agents, *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* **8**: 149-155.
- DHAMA, K., MAHENDRAN, M., GUPTA, P.K., RAI, A. (2008). DNA vaccines and their applications in veterinary practice: Current perspectives, *Vet. Res. Comm.*, **32**: 341-356.
- DHAMA, K., MAHENDRAN, M., TIWARI, R., SINGH, S.D., KUMAR, D., SINGH, S., SAWANT P.M. (2011). Tuberculosis in birds: Insights into the *Mycobacterium avium* infections. *Vet. Med. Int.*, **2011**: 1-14.
- DVORSKA, L., MATLOVA, L., AYELE, W., FISCHER, O.A., AMEMORI, T., WESTON, R.T., ALVAREZ, J., BERAN, V., MORAVKOVA, M, PAVLIK, I. (2007). Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the *Ardeideae* and *Threskiornithidae* families studied by serotyping, IS901 Rflp typing and virulence for poultry. *Vet Microbiol.* **31**: 366-374.
- FALKINHAM, J.O. (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 177-215.
- FALKINHAM J.O., GROSS, W.B., PIERSON, F.W. (2004). Effect of different cell fractions of *Mycobacterium avium* and vaccination regimens on *Mycobacterium avium* infection. *Scand. J. Immunol.* **59**: 478- 484.

- FULTON, R.M., THOEN, C.O. (2003). Tuberculosis. In: *Diseases of Poultry*. Ed: B. W. Calnek, H. J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, Y.M. Saif, Iowa State University Pres. p.: 836-844.
- GOLDMAN, E., GREEN, L.H. (2009). *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press. 2. ed. FL, Ed: *Emanuel Goldman*, ABD. p.: 41.
- GRANGE, J.M., YATES, D.M., BOUGHTON, E. (1990). A review: The avian tubercle bacillus and it's relatives. *J. App. Bacteriol.* **68**: 411- 431.
- GRANGE, J.M., YATES, M.Y., KANTOR, H.N. (1996). Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. 2nd ed. WHO/EMC/ZOO/96.4. p.: 1- 10.
Erişim: (whqlibdoc.who.int/hq/1996/WHO_EMZ_ZOO_96.4.pdf). Erişim tarihi: 20.07.2011.
- GRUFT, H., LODER, A., OSTERHOUT, M., PARKER, B.C., FALKINHAM, J.O. (1979). Postulated sources of *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum* infection: Isolation of mycobacteria from estuaries and ocean waters. *Am. Rev. of Resp. Dis.* **120**: 1385-1388.
- GUERRERO, C.C., BERNASCONI, D., BURKI, T., BODMER, T., TELENTI, A. (1995). A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J.Clin. Microbiol.* **33**: 304- 307.
- GUREL, A., ARUN, S.S, YESILDERE, T. (1997). Üc farkli evcil güvercin sürüsünde spontan tüberkülozis olguları. *S.Ü.Vet. Fak. Derg.* **23**: 131-139.
- GÜMÜŞSOY, K.S., BEYAZ, L., AYDIN, F., ÖZCAN, M., ATASEVER, A. (2006). Avian tuberculosis in Kayseri Zoo. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **3**: 25-28.
- HEJLÍCEK, K, TREML, F. (1994). Epizootiology and pathogenesis of avian mycobacteriosis in domestic pigeons (*Columba livia f. domestica*). *Vet. Med.* **39**: 615-624.
- HERZOG, H. B. (1998). History of tuberculosis. *Respiration*, **65**: 5-15.
- HILLEBRAND-HAVERKORT, M. E., KOLK, A.H., KOX, L.F., TEN VELDEN, J.J., TEN VEEN J.H., (1999). Generalized *Mycobacterium genavense* infection in HIV-infected patients: Detection of the *Mycobacterium* in hospital tap water. *Scand. J. Infect. Dis.* **1**: 63-68.
- HINES, M.E., KREEGER, J.M., HERRON, A.J. (1995). Mycobacterial infections of animals: Pathology and pathogenesis. *Lab. Anim. Sci.* **45**: 334-351.

- HOEFER, H.L., KIEHN, T.E., FRIEDAN, T.R. (1996). Systemic *Mycobacterium tuberculosis* in a green-winged macaw. In: *Proc. Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*, Tampa, FL. p.:167–168.
- HOLSBOER-BUOGO, C., BACCIARINI, L., ROBERT, N., BODMER, T., NICOLET, J. (1997). Presence of *Mycobacterium genavense* in birds. *Sch. Arc. Tierh.* **139**: 397-402.
- HOOP, R. (1997). Public health implications of exotic pet mycobacteriosis. *Semin. Avian. Exotic. Pet. Med.* **6**:3-8.
- HOOP, R.K., BÖTTGER, E.C., OSSENT, P., SALFINGER, M., (1993). Mycobacteriosis due to *Mycobacterium genavense* in Six Pet Birds. *J. Clin. Microbiol.* **31**:990–993.
- HOOP, R.K., BÖTTGER, E.C., PFYFFER, G.E., (1996). Etiological agents of Mycobacteriosis in pet birds between 1986 and 1995. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 991-992.
- HSIEH, Y.C., TSAI, K.Y., WANG, C.Y., HUNG, C.N., TSAI, S.S., LIU, H.J. (2009). Diagnosis of avian tuberculosis in swinhoe's pheasants using conventional and molecular-based techniques. *Avian Dis.*, **53**:629-33.
- HUARD, R.C., LAZZARINI, C.O., BUTLER, W.R., VANSOOLINGEN, D., HO, J.L. (2003). PCR-based method to differentiate the subspecies of MTB on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1637-1650.
- HUEBNER, R.E., GOOD, R.C., TOKARS, J.I. (1993). Current practices in mycobacteriology: Results of a survey of state public health laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **31**:771-775.
- IKONOMOPOULOS, J., FRAGKIADAKI, E., LIANDRIS, E., SOTIRAKOGLU, K., XYLOOURI, E., GAZOULI, M. (2009). Estimation of the spread of pathogenic mycobacteria in organic broiler farms by the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **133**: 278-282.
- INDERLIED, C.B., KEMPER, C.A., BERMUDEZ, L.E.M. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 266-310.
- JACKSON, K., SIEVERS, A., ROSS, B.C., DWYER, B. (1992). Isolation of a fastidious *Mycobacterium* species from two AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2934-2937.
- KAPAKIN TERIM, K., A., ALÇIĞIR, G. (2009). Bir güvercinde tüberküloz olgusu. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **15**: 477-479.
- KAUPPINEN, J., HINTIKKA, E., IIVANAINEN, E., KATILA, M. (2001). PCR-Based typing of *Mycobacterium avium* isolates in an epidemic among farmed lesser white-fronted geese (*Anser erythropus*). *Vet. Microbiol.* **3**: 41-50.

- KEYMER, I.F., JONES, D.M., PUGSLEY, S.L., WAFSWORTH, P.E. (1982). A survey of tuberculosis in birds in the Reagent's Park Gardens of the Zoological Society of London. *Avian Pathol.*, **11**: 563-568.
- KIEHN, T.E., HOEFER, H., BÖTTGER, E.C., ROSS, R., WONG, M., EDWARDS, M., ANTINOFF, N., ARMSTRONG, D. (1996). *Mycobacterium genavense* infection in pet animals. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1840-1842.
- KIRSCHNER, P., VOGEL, U., HEIN, R., BÖTTGER, E.C. (1994). Bias of culture techniques for diagnosing mixed *Mycobacterium genavense* and *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 828-831.
- KOCK, N.D., KOCK, R.A., WAMBU, J., KAMAU, G.J., MOHAN, K. (1999). *Mycobacterium avium*- related epizootic in free-ranging lesser flamingos in Kenya. *J. Wildl. Dis.* **35**: 297-300.
- KOVALEV, G.K. (1983). The role of wild birds and their ectoparasites (ticks) in the circulation and distribution of *m. avium* and possible formation of natural foci of avian tuberculosis. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **27**: 281-288.
- KRIZ, P., SLANA, I., KRALIK, P., BABAK, V., SKORIC, M., FICTUM, P., DOCEKAL, J., PAVLIK, I., (2011). Outbreak of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infection in one flock of domestic pigeons. *Avian Dis.*, **55**: 503-508.
- KUL, O., TUNCA, R., HAZIROGLU, R., DIKER, K.S., KARAHAN, S. (2005). An outbreak of avian tuberculosis in peafowl (*Pavo cristatus*) and pheasants (*Phasianus colchicus*) in a zoological aviary in Turkey. *Vet. Medic.* **50**: 446-450.
- KUTSAL, O., SAGLAM, M. (1988). Tuberculosis in pigeons. *Vet. J. Ankara Univ.* **35**: 545-552.
- KUZE, F., UCHIHIRA, F. (1984). Various colony formers of *Mycobacterium avium* – *intracellulare*. *Europ. J. Resp. Dis.* **65**: 402-410.
- LANTERI, G., MARINO, F., REALE, S., VITALE, F., MACRÌ, F., MAZZULLO, G. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* in a red-crowned parakeet (*Cyanoramphus novaezelandiae*). *J. Avian. Med. Surg.* **25**: 40-43.
- LEÃO, S.C., PORTAELS, F. (2007). History. In: *Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care*. Ed: J.C. Palomino, S.C. Leão, V. Ritacco. Flying Publisher. p.: 25-51.
- LEDERER, E. (1971). The mycobacterial cell wall. *Pure. Appl. Chem.* **25**: 135-165.

- LEDWON, A., SZELESZCZUK, P., ZWOLSKA, Z., AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E., SAPIERZYNSKI, R., KOZAK, M. (2008). Experimental infection of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) with five *Mycobacterium* species. *Avian Pathol.* **37**: 59-64.
- LENNOX, A.M. (2007). Mycobacteriosis in companion psittacine birds: A review. *J. Avian Med. Surg.* **21**: 181-187.
- LUCAS, J., LUCAS, A., FURBER, H., JAMES, G., HUGHES, M.S., MARTIN, P., CHEN, S.C.A., MITCHELL, D.H., LOVE, D.N., MALIK, R. (2000). *Mycobacterium genavense* infection in two aged ferrets with conjunctival lesions. *Aust. Vet. J.* **78**: 685-689.
- MAFFUCCI, A. (1894). II. Experimental researches upon the products of the tubercle bacillus. *Ann. Surg.* **20**: 556-560.
- MANAROLLA, G., LIANDRIS, E., PISONI, G., MORONI, P., PICCININI, R., RAMPIN, T. (2007). *Mycobacterium genavense* and Avian polyomavirus co-infection in a european goldfinch (*Carduelis carduelis*). *Avian Patolh.* **36**: 423- 426.
- MANAROLLA, G., LIANDRIS, E., PISONI, G., SASSERA, D., GRILLI, G., GALLAZZI, D., SIRONI, G., MORONI, P., PICCININI, R., RAMPIN, T. (2009). Avian mycobacteriosis in companion birds: 20-year survey. *Vet. Microbiol.* **133**: 323-327.
- MATTHEWS, P.R.J., McDIARMID, J.A., COLLINS, P., BROWN, A. (1977). The dependence of some strains of *Mycobacterium avium* of mycobactin for initial and subsequent growth. *J. Med. Microbiol.* **2**: 53-57.
- MENDENHALL, M.K., FORD, S.L., EMERSON, C.L., WELLS, R.A., GINES, L.G., ERIKS, I.S. (2000). Detection and differentiation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium genavense* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**: 57-60.
- MIYAZAKI, Y., KOGA, H., KOHNO, S., KAKU, M. (1993). Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 2228-2232.
- MIYOSHI H., TAMURA G., SATOH T., HOMMA R., OMOTO E., NAKANO N., WADA R. (2010). Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in a healthy boy. *Hum. Pathol.* **41**: 1646-1649.
- MONTALI, R.J., BUSH, M., THEON, C.O., SMITH, E. (1976). Tuberculosis in captive exotic birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **169**: 920-927.
- MONTEIRO, L., BONNEMAISON, D., VEKRIS, D., PETRY, K.G., BONNET, J., VIDAL, R.J., CABRITA, J., MÉGRAUD, F. (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 995-998.

- MORITA, Y., ARAI, M., NOMURA, O., MARUYAMA, S., KATSUBE, Y., (1994). Avian tuberculosis which occurred in an imported pigeon and pathogenicity of the isolates. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 585-587.
- NADAL, D., CADUFF, R., KRAFT, R., SALFINGER, M., BODMER, T., KIRSCHNER, P., BÖTTGER, E.C. (1993). Invasive infection with *Mycobacterium genavense* in three children with the acquired immunodeficiency syndrome. *Cancer*, **73**:224-230.
- NICHOLS, G., FORD, T., BARTRAM, J. DUFOUR, A., PORTAELS, F. (2005). Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences: Monitoring and Management.
Erişim: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/en/patmycobact1.pdf
Erişim Tarihi: 19.01.2011.
- NOLTE, F.S., METCHOCK, B. (1995). *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM Press, 400-403.
- OIE, (2008). Avian Tuberculosis, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
Erişim:http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.06_AVIAN_TB.pdf.
Erişim Tarihi: 21.03. 2010.
- OZBEK, A, MICHEL, F.C., STROTHER, M., MOTIWALA, A.S., BYRUM, B.R., SHULAW, W.P., THORNTON, C.G., SREEVATSAN, S. (2003). Evaluation of two recovery methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR: Direct dilution centrifugation and C (18)-carboxypropylbetaine processing. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**: 145-51.
- ÖZCAN, K., BEYTUT, E., AYDIN, F., TUZCU, M. (2001). Tuberculosis in geese (*Anser anser*) in Turkey. *Avian Dis.*, **45**: 755-759.
- PAINTER, K.S. (1997). Avian tuberculosis caused by *Mycobacterium avium* serotype-3 in captive wildlife. *Vet. Rec.* **149**: 457-458.
- PANIGRAHY, B., CLARK, F.D., HALL, C.F. (1983). Mycobacteriosis in psittacine birds. *Avian Dis.*, **27**: 1166-1168.
- PARKER, B.C., FORD, M.A., GRUFT, H., FALKINGHAM, J.O. (1983). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerolisation of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. *Am. Rev. Resp. Dis.* **128**: 652-656.
- PAVLIK, I., SVASTOVA, P., BARTL, J., DVORSKA, L., RYCHLIK, I. (2000). Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**: 212-217.

- PEAVY, G.M., SILVERMAN, S., HOWARD, E.B., COOPER, R.S., RICH, L.J., THOMAS, G.N. (1976). Pulmonary tuberculosis in a sulfur-crested cockatoo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **169**: 915-919.
- POCKNELL, A.M., MILLER, B.J., NEUFELD, J.L., GRAHN, B.H., (1996). Conjunctival mycobacteriosis in two emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.* **33**: 346-348.
- POND, C.L., RUSH, H.G. (1981). Infection of white carneau pigeons (*Columbia livia*) With *Mycobacterium avium*. *Lab. Anim. Sci.*, **31**: 196-199.
- PORTAELS, F., REALINI, L., BAUWENS, L., HIRSCHHEL, B., MEYERS, W.M., de MEURICHY, W. (1996). Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium genavense* in birds kept in a zoo 11-year Survey. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 319-323.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, M.E., CARTER, G.R. (1999). Clinical Veterinary Microbiology. MOSBY, London, U.K. p.: 161.
- RAMIS, A., FERRER, L., ARANAZ, A., LIÉBANA, E., MATEOS, B.A., DOMÍNGUEZ, B.L., PASCUAL, B.C., FDEZ-GARAYAZABAL, J., COLLINS, M.D. (1996). *Mycobacterium genavense* Infection in Canaries, *Avian Dis.* **40**: 246-251.
- REALINI, L., de RIDDER, K., HIRSCHHEL, B., PORTAELS, F. (1999). Blood and charcoal added to acidified agar media promote the growth of *Mycobacterium genavense*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **34**: 45-50.
- REALINI, L., de RIDDER, K., PALOMINO, J., HIRSCHHEL, B., PORTAELS, F. (1998). Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. *J. Clin. Microbiol.*, **36**: 2565-2570.
- REALINI, L., VAN der STUYFT, P., de RIDDER, K., HIRSCHHEL, B., PORTAELS, F. (1997). Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 2791-2794.
- RISTOLA, M.A., VON REYN, C.F., ARBEIT, R.D., SOINI, H., LUMIO, J., RANKI, A. (1999). High rates of disseminated infection due to nontuberculous mycobacteria among AIDS patients in Finland. *J. Infect.* **39**: 61-67.
- ROSENSTRAUS, M., WANG, Z., CHANG, S.Y., DEBONVILLE, D., SPADORO, J.P., (1998). An internal control for routine diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance, *J. Clin. Microbiol.* **36**: 191-197.
- SALFINGER, M., KAFADER, F.M. (1987). Comparison of two pretreatment methods for the detection of mycobacteria of BACTEC and Löwenstein-Jensen slants. *J. Microbiol. Methods.* **6**: 315-321.

- SCHMIDT, V., SCHNEIDER, S., SCHLÖMER, J., KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.E., RICHTER, E. (2008). Transmission of tuberculosis between men and pet birds: A case report. *Avian Pathol.* **37**: 589-592.
- SHINNICK, T.M., GOOD, R.C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 884-901.
- SHITAYEA, E.J., BERANA, V., SVOBODOVAB, J., MORAVKOVAA, M., BABAKA, V., PAVLIK I., (2009). Comparison of the conventional culture, the Manual Fluorescent MGIT System and the Automated Fluorescent Mgit 960 Culture System for the detection of *Mycobacterium avium ssp. avium* in tissues of naturally infected hens. *Folia Microbiol.* **54**: 137-141.
- SILVIA-KROTT, I., BROCK, M.K., JUNGE, R.E. (1998). Determination of the presence of *Mycobacterium avium* on guam as a precursor to the introduction of indigenous bird species. *Pac. Conserv. Biol.* **4**: 227-231.
- SIRIUDOM, S., CHAICUMPAR, K., LULITANOND, V., NAMWAT, W. (2008). Detection and differentiation of mycobacterium species in clinical specimens by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Sci. Technol.* **27**: 291-297.
- SMITHWICK R.W., BIGBIE M.R., FERGUSON R.B., KARLIX M.A., WALLIS C.K. (1995). Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2763-2764.
- SMIT, T., EGER, A., HAAGSMA, J., BAKHUIZEN, T. (1987). Avian tuberculosis in wild birds in the Netherlands. *J. Wildl. Dis.* **23**: 485-487.
- SOLER, D., BRIEVA, C., RIBÓN, W., (2009). Mycobacteriosis in wild birds: The potential risk of disseminating a little-known infectious disease. *Rev. Salud. Pub.* **11**:134-144.
- STAGER, C.E., LIBONATI, J.P., SIDDIQI, S.H. (1991). Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 154-157.
- TELL, L. A., FERRELL, S.T., GIBBONS, P.M. (2004). Avian mycobacteriosis in free-living raptors in california: 6 Cases (1997–2001). *J. Avian Med. Surg.* **18**: 30-40.
- TELL, L.A., FOLEY, A.J., NEEDHAM, M. L., WALKER, R L., (2003a). Diagnosis of avian mycobacteriosis: Comparison of culture, acid-fast stains, and polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium avium* in experimentally inoculated japanese quail (*Coturnix Coturnix Japonica*), *Avian Dis.* **47**: 444–452.
- TELL, L.A., LEUTENEGGER, C.M., LARSEN, R.S., AGNEW, D., KEENER, L., NEEDHAM, L., RIDEOUT, B. (2003b). Real-Time polymerase chain reaction testing

- for the detection of *Mycobacterium genavense* and *Mycobacterium avium* complex species in avian samples. *Avian Dis.* **47**:1406–1415.
- TELL L.A., WOOD L., CROMEI R.L. (2001). Mycobacteriosis in birds. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* **20**: 180-203.
- THOEN C.O. (1994). *Mycobacterium avium* infections in animals. *Res. Microbiol.* **145**: 173-177.
- THOEN, C.O. (1997). Tuberculosis, in *Diseases of Poultry*, Ed. B. W. Calnek, Ed., London, UK, Mosby-Wolfe, p.: 167-178.
- THOREL, M.F., HUCHZERMEYER, H., WEISS, R., FONTAINE, J.J. (1997). *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet. Res.* **28**: 439-447.
- UZUN, M. (2003). Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu*, Samsun, s: 285-290.
- VAN der HEYDEN, N. (1997a). Clinical manifestations of mycobacteriosis in pet birds. *Semin. Avian Exot. Pet Med.* **6**:18-24.
- VAN der HEYDEN, N. (1997b). New strategies in the treatment of avian mycobacteriosis. *Semin. Avian Exot. Pet Med.* **6**:25-33.
- WASHKO, R.M., HOEFER, H., KIEHN, T.E., ARMSTRONG, D., DORSINVILLE, G., FRIDEN, T.R. (1998). *Mycobacterium tuberculosis* infection in A green-winged macaw (*Ara chloroptera*): Report with public health implications. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1101-1102.
- WAYNE, L.G., KUBICA, G.P., (1986). Family *Mycobacteriaceae* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, J.G. Holt, Baltimore, p.: 1599.
- WAYNE, L.G., SRAMEK, H.A. (1992). Agents of newly recognised or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 1-25.
- WHO, Global Tuberculosis Control, WHO Report 2010. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069-eng.pdf>. Erişim Tarihi: 19.01.2011.
- WILSON, M.L., STONE, B.L., HILDRED, M.V. (1995). Comparison of recovery rates for mycobacteria from BACTEC 12B Vials, Middlebrook 7H11-selective 7H11 biplates, and Löwenstein-Jensen slants in public health mycobacteriology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2516-2518.
- WITTE C.L., HUNGERFORD L.L., PAPENDICK R., STALIS I.H., RIDEOUT B.A., (2008). Investigation of characteristics and factors associated with avian mycobacteriosis in zoo birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* **20**: 186-196.

YARDIMCI H. (2006). *Mycobacterium* İnfeksiyonları. In: *Veteriner Mikrobiyoloji: Bakteriyel Hastalıklar*.Ed.: N. Aydın, J. Paracıkoğlu. Medisan Yayınevi, Ankara, s.: 87-107.

ZSIVANOVITS, H. P. (2001).Control and management of avian tuberculosis in a captive collection of wildfowl. *Doctoral Thesis*, Hannover.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Nihan
 Soyadı : ALTINSOY DUYGU
 Doğum yeri ve tarihi : Bafra - 1982
 Uyrugu : TC
 Medeni durumu : Evli
 İletişim bilgileri : (506) 380 5247

II- Eğitimi

2006- 2012 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Doktora Öğrencisi
 2000-2006 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 1993-2000 Bafra Anadolu Lisesi
 1989-1993 Bafra Atatürk İlköğretim Okulu

Yabancı dili : İngilizce

III- Ünvanları

2006 Veteriner Hekim

IV- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimler Derneği
 Türkiye Tabiatını Koruma Derneği
 Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

V- Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları:

- AYDIN, N., ALTINSOY, N. (2006). Liyofilizasyon. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi. 6:45-51.

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar : Tübitak Yurtiçi Doktora Bursu (2006-2011)

Seminerler : Tarihî Bakış Açısından Hayvanlarda Leptospirozis (A.Ü.V.F. Mikrobiyoloji ABD - 2007)
 Leptospirozisin Laboratuvar Teşhisi (A.Ü.V.F. Mikrobiyoloji ABD 2008)

Kongreler : - YARDIMCI, H., ALTINSOY, N. (2007). Göl Kuşlarında Kuş Gribi (Avian Influenza). Goller Kongresi, 09-10 Haziran, s:111, Isparta.
 - SAREYYUPOGLU, B., AYDIN, N., ALTINSOY, N., CANTEKİN, Z. (2008). *Chlamydophila psittaci*'nin Moleküler Tanısı İçin Real-Time PZR Teknikleri Geliştirilmesi. VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 07-09 Ekim, s:108, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kampüsü, Van.