

VET 503
KANATLI HAYVAN HASTALIKLARI DERSİ
UYGULAMA KİTAPÇIĞI



2021

Uygulamanın adı	Biyogüvenlik uygulamaları, <i>Salmonella gallinarum</i> seroloji, izolasyon ve PCR
Yapılacağı hafta	1
Uygulamanın temel hedefi	<i>Salmonella gallinarum</i> identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Kanatlı Salmonellozisi *Salmonella* cinsindeki etkenlerden ileri gelen, kanatlıların büyük çoğunluğunda önemli hastalık tablolarına neden olan zoonoz bir enfeksiyondur. *Salmonella* Enfeksiyonları (SE) halk sağlığı açısından oldukça önemlidir; çünkü, infektif mikroorganizma doğada yaygın olarak bulunur ve pek çok serotipi vardır. Sahada planlı eradikasyon programlarının uygulanması SE'nden ileri gelen ekonomik kayıpları azaltmıştır. *Salmonella* etkenleri (SE) Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella* genusuna ait türlerin içerdiği serotiplerdir. E familyasının genel özelliklerini taşıyan Salmonellalar Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz, kısa çomaklardır. Kanatlılardan izole edilen S'ların çoğunluğu *S. enterica subsp. enterica* alt grubuna dahil olup çok fazla sayıda serovar veya serotip içermektedirler.

Nekropsi bulguları açısından

Gençlerde, Akut enfeksiyonlarda

Karaciğer, dalak, böbrek hemorajik görünümlü olup, karaciğerde küçük nekrotik odaklar göze çarpar. Karaciğer hipertroftiktir,

Asites gözlenebilir,

Civcivlerde yumurta sarısı emilmemiştir,

Böbrekler solgun ve ürat kristalleri ile doludur,

Rektum ishale eklenen ürat kristalleri nedeni ile beyazımsıtrak bir sıvı ile dolu olup genişlemiştir,

Erişkinlerde,

Karaciğer hipertrofik olup, yeşilimsi bronz renkte gevşek kıvamda kolay parçalanır,

Safra kesesi genişlemiştir, içi safra ile doludur,

Dişilerde ovaryum foliküllerinde lezyonlar görülür, ovidukt lumeni kazeöz bir içerik ile doludur,

buralardaki dejeneratif bozukluklara bağlı olarak peritonitis ve perikarditis görülebilir,

Erkeklerde testislerde beyaz odak ve nodüller, hava keselerinde kazeöz granülomlara rastlanır.

S. pullorum (civcivlerin beyaz ishali) enfeksiyonlarında akciğerlerinde grimsi beyaz nekrotik odaklar vardır, benzer lezyonlar kalp ve karaciğerde de bulunur.

S. pullorum enfeksiyonlarında tavuklarda bacak eklemlerinde synovitis

Salmonella enfeksiyonlarında erişkinlerde ovaryum sıklıkla en çok etkilenen organdır.

Dejenere olmuş ovaryumlar organın tabanına uzun bir bağ ile tutunurlar, böyle ovaryumların rengi bozulmuş ve içeriklerini kaybetmişlerdir.

S. gallinarum (kanatlı tifosu) enfeksiyonlarında akciğerler kahverengi bir renk almıştır.

S. gallinarum enfeksiyonlarında hastalıktan etkilenen kanatlıların karaciğerleri tipik olarak hava ile temasta bronz bir renk alır ve dalakda ciddi düzeyde kanlanmış.

Karıştığı Hastalıklar:

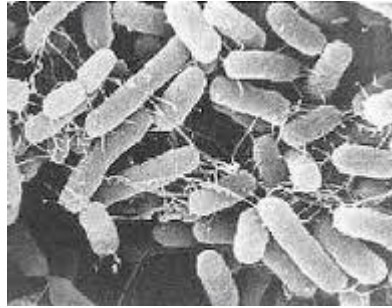
- *Pastörellozis,
- *Kolibasillozis,
- *Paratifo,
- *Mikoplasmosis,
- *Aspergillus,
- *Newcastle.

1- Bakteriyoskopi: Bakteriyolojik muayene materyallerden hazırlanan preparatlar, Gram boyama yöntemi ile incelenmelidir. Gram negatif etkenlerin görülmesi, *S. gallinarum* düşündürmesine rağmen mutlaka kültür yapılmalıdır.

2-Kültür: Laboratuvara gelen taze materyallerden kanlı agar, MacConkey agar nutrient, buyyon gibi besi yerlerine ekim yapılarak üreyen etkenler *Salmonella* yönünden değerlendirilir. Biyokimyasal testlerle identifiye edilebilen *S. gallinarum* kesin teşhisi, tip spesifik antiserumlardan yararlanılarak doğrulanmalıdır.

3-Hayvan deneyi: Laboratuvarlarda izole edilen *S. gallinarum* şüpheli koloniler veya kontamine atık materyallerinden hazırlanan inokulumlar kobaylara injekte edilmekte ve enjeksiyon sonucu oluşan lezyonlardan yapılan kültürel yoklamalarla etken izolasyon ve identifikasyonu kesin olarak yapılabilmektedir.

4-Serolojik testler: Bakteriyolojik muayenelerin yapılmadığı durumlarda veya portör kısırakların belirlenmesi amacıyla serolojik yoklamalardan yararlanılmaktadır. *S. gallinarum* 'a karşı oluşmuş antikorların saptanması için kan alınarak, "O" ve "H" antijenleri kullanılmak suretiyle aglütinasyon testleri yapılmaktadır.



Salmonella gallinarum

Uygulamanın adı	Kanatlılarda <i>E. coli</i> izolasyonu
Yapılacağı hafta	2
Uygulamanın temel hedefi	Kanatlılarda <i>E. coli</i> izolasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

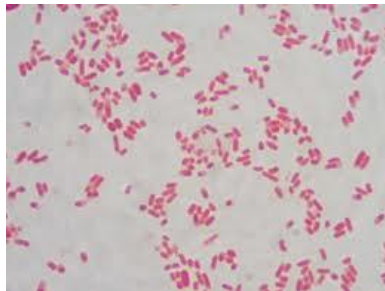
Enterobacteriaceae familyasının *Escherichia* genusuna ait *E. coli* Gram negatif, sporsuz, genellikle hareketli bir mikroorganizmadır. Kanatlılarda hastalık yapan *E. coli*'lere Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) denmektedir.

1-Bakteriyoskopi: Septisemiden ölen hayvanlara ait organlardan yapılan preparatlarda Gram negatif çomakların görülmesi *E. coli*'yi düşündürebilir.

2-Kültür: Bu amaçla kanlı agar, MacConkey agar ve EMB agar gibi besi yerlerine ekimler yapılır ve 24-48 saat 37°C'de inkubasyondan sonra üreyen koloniler *E. coli* yönünden değerlendirilir. Buyyon kültüründe 24 saatte homojen bulanıklık yapan *E.coli* biyokimyasal testlerle (karbonhidrat fermentasyon testleri, H₂S, Indol, MR, VP, Nitrat, vs) identifiye edilir. Üreyen *E. coli*'lerin virulans faktörlerinin PCR gibi moleküler yöntemlerle de doğrulanması yapılabilir.

3-Hayvan deneyi: Özellikle ETEC suşlar belirlenmesi amacıyla, bağırsak lup testi, fare testi ve doku kültürü testlerinin kullanılması gerekmektedir.

4-Serolojik testler: Kanatlılarda hastalık yapan *E. coli* serotiplerine karşı hazırlanmış antiserumlarla üreyen kolonilerin lam üzerinde yapılan aglütinasyon testi ile hangi serogruba ait oldukları, dolayısıyla antijenik özellikleri kesin olarak saptanabilir.



E. coli

Uygulamanın adı	İnfeksiyöz koriza tanısı
Yapılacağı hafta	3
Uygulamanın temel hedefi	İnfeksiyöz koriza tanısı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

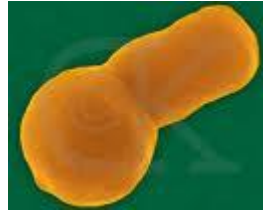
Hastalık adını infeksiyöz karekteri ve ilk olarak nazal bölgeleri etkilemesinden almaktadır. Gelişme hızını ve yumurtacılarda yumurta verimini olumsuz etkiler.

Haemophilus paragallinarum Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, çomak şekilli bir bakteridir.

Hemofilusların üremeleri için gerek duydukları X ve V faktörleri kanda bulunur.

Özel olarak hazırlanan çikolata agarda Hemofiluslar bol ürer ve çok küçük şeffaf koloniler oluştururlar.

Özel olarak hazırlanan Levinthal besi yeri ve Filles besi yerinde hemofiluslar, çikolata agarda olduğu gibi, bolca üremektedir. Bu besi yerleri ısı ile veya peptik enzimlerle parçalanmış alyuvarlarla hazırlanan besi yerleridir.



Haemophilus paragallinarum

Uygulamanın adı	Kampilobakter infeksiyonlarında tanı
Yapılacağı hafta	4
Uygulamanın temel hedefi	Kampilobakter infeksiyonlarında tanı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Broyler sürülerinde oldukça yaygın bulunan bu bakteriler tavuklarda infeksiyöz hepatitis'in primer etkenidir.

Son yıllarda insanlardaki kampilobakter nedenli infeksiyonlarda büyük artış sağlanması, bu grup bakterilere olan ilgiyi artırmıştır. Termofilik Campylobacterler kanatlı hayvanların bağırsaklarına erken dönemde kolonize olmakta ve kesime kadar geçen sürede kolonizasyon yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Campylobacterler ile infekte sürülerin kesilmesi aşamasında karkaslarda kontaminasyon şekillenmekte ve bu etkenler insanlar için potansiyel bir infeksiyon kaynağı olmaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle tavuklar başta olmak üzere yetiştiriciliği yapılan tüm kanatlı hayvanların bağırsaklarında ve tüketime sunulan kanatlı etlerinde campylobacter kontaminasyonu belirlenmiştir.

BAKTERİYOSKOPI: Organlardan hazırlanan sürme preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyandığında "S" veya daha uzun spiral şekilli gram negatif bakteriler görülebilir.

KÜLTÜR: Organlardan ve lezyonlu bölgelerden %7 defibrine kan ilave edilmiş BHI agar, kolombiya agar, brusella agar, tiyoglukonat agar gibi besiyerlerine ekim yapılır.

Eğer daha sonra ekim yapılacaksa bu besiyerlerine SKIRROW veya BUTZLER selektif suplemanları konulur. Besiyerleri mikroaerofilik ortamda 37 °C de 3-5 gün inkube edilir. Daha sonra biyokimyasal testlerle tanıya gidilir.



Kampilobakter türleri

Uygulamanın adı	Klostridial infeksiyonlarda tanı
Yapılacağı hafta	5
Uygulamanın temel hedefi	Klostridial infeksiyonlarda tanı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Klostridiumlar çomak şeklinde, anaerobik, Gram pozitif bakterilerdir. Pek çoğu sporludur. Birçok kanatlı türünde infeksiyöz hastalıklara neden olurlar. Başlıcaları botulismus, nekrotik enteritis, gangrenli dermatitis, ülseratif enteritis ve göbek-yumurta sarısı kesesi infeksiyonudur. Bütün kanatlı türleri hastalığa duyarlıdır. Toksinle kontamine yemlerin, kokuşmuş kadavraların, ölü hayvanların üzerindeki sinek veya böceklerin tüketilmesi veya bunlarla bulaşık suların içilmesi, kanibalismus gibi nedenler infeksiyona yol açmaktadır. Genellikle 3 haftalıktan büyük piliçler daha duyarlıdır. Botulismusta morbidite ve mortalite alınan toksinin miktarına göre değişir. Nadir olarak mortalite broylerlerde %40'ı geçer. Hastalık broylerlerde daha çok kış aylarında meydana gelmektedir. Klinik belirtiler teşhise yardımcı olur ancak diğer toksisitelerle (monsein zehirlenmesi, su kuşlarında Aeromonas zehirlenmesi) karıştırılabilir. Botulismus toksininin varlığı laboratuvar farelerine serum veya kursak ekstraktının ya da gastrointestinal içeriğin injeksiyonu ile saptanabilir. Muayene materyali olarak canlı hayvanlar veya taze kadavralardan yararlanılmalıdır. Toksin nötralizasyonu ile kesin teşhis yapılabilir.

GANGRENLİ DERMATİTİS

Tavuk ve hindilerde deri altında ödem, çıtırtı ve bazı durumlarda septisemiyle seyreden bir hastalıktır. Gangrenöz dermatitis *C. septicum* ve *C. perfringens* tip A'nın tek başına ya da birlikte etkisi ile meydana gelir. Bazı durumlarda *Staphylococcus aureus* bu etkenlerle birlikte infeksiyona neden olmaktadır. Postmortem görüntü patognomoniktir ancak CAV'nun neden olduğu mavi kanat hastalığı ile karıştırılmamalıdır. Bakteri kültürleri kanatlıların normal deri florasında bulunan Klostridiumlar nedeniyle yanıltıcı olabilir. Gangrenöz Dermatitis, deri yangılı, ıslak bir görünümündedir. İnfeksiyona genellikle Stafilokoklar ile birlikte Clostridium'lar da katılmışsa derinin yeşil bir renk aldığı dikkati çeker. Gangrenöz dermatistide lezyonlar. Deri yüzüldüğünde alttaki dokunun jelatinöz kıvamda olduğu ve kanlı olduğu görülebilir. Gangrenöz dermatitis vakalarında akciğerler kısmen veya tamamen etkilenir.

ÜLSERATİF ENTERİTİS

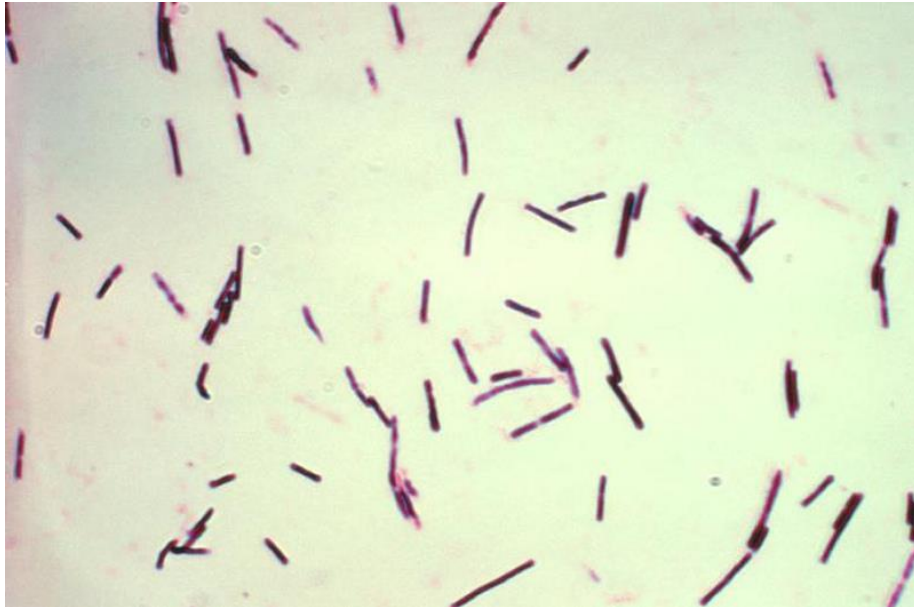
İlk olarak bildiricilerde saptandığı için bildiricin hastalığı olarak da adlandırılan bu hastalık

kanatlılarda akut olarak seyreder ve yüksek mortaliteye neden olur. Hastalık *Clostridium colinum* tarafından meydana getirilir. Etken Gram pozitif sporlu ve çomak şeklindedir. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde ürer.

C. colinum sporları kimyasal ve fiziksel ajanlara oldukça dirençlidir. Kloroformdan etkilenmez. 70°C'de 3 saat, 80°C'de 1 saat ve 100°C'de 1 dakika canlı kalabilir.

Klinik belirtiler yetersizdir. Hastalık özellikle Histomoniasis ve Koksidiozis ile karışır. Nekropsi bulguları çoğunlukla yeterlidir; ancak, kesin teşhis için bağırsak, karaciğer veya dalaktan *C. colinum*'un kültür veya immunfluoresan tekniği ile belirlenmesi gerekir.

Nekrotik enteritiste ise klinik bulgular çoğu zaman yetersizdir. Nekropsi bulguları ve ayrıntılı anamnez (hazırlayıcı nedenlerin araştırılması) tanıda oldukça önemlidir. Çoğu zaman koksidiozis ile karışır. Kesin teşhis bakteriyolojik yoklamalar ve toksin nötralizasyon testleri ile mümkündür. Bağırsak lezyonlarından hazırlanan natif preparatlarda koksidi oositlerine rastlanabilir. Boyalı preparatlarda da çok sayıda Gram pozitif çomak'a rastlanabilir. Bazen her iki durum birlikte görülür. *C. perfringens* anaerobik olarak izole ve identifiye edilebilir.



Kanatlılardan izole edilen Klostridium türleri

Uygulamanın adı	Mycoplasma gallisepticum Pleyt aglutinasyon(RSA), HI, izolasyon ve PCR, M. synoviae
Yapılacağı hafta	6
Uygulamanın temel hedefi	Mycoplasma gallisepticum identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

M. gallisepticum, Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz olan bu bakterinin de diğer Mikoplazmalar gibi hücre duvarı yoktur. Bu nedenle mikroskopta genellikle oval, halka, yüzük, kokoid, dallı, yıldız şeklinde pleomorfik olarak görünürler. Hücre duvarından yoksun olan bu bakterinin, sitoplazmik membranı üç tabakalı “ünit membran”dan oluşmuştur. Orta tabakasında lipid, diğer iki tabaka ise protein ve karbonhidratlardan meydana gelmiştir. Ünit membrandaki karbonhidrat molekülleri komplemantın fikse edilmesinde, nötralizan antikorların saptanmasında, aynı zamanda diğer suşlarla kros-reaksiyonlarda rol oynar. *M. gallisepticum*’da diğer mikoplazmalardan farklı olarak bu ünite membranının üzerinde myxoviruslarınkine benzer çıkıntılar bulunmaktadır. Bu çıkıntılarla hemaglutinasyon oluşturabilmektedir.

Yukarda açıklanan nekropsi tablosu da kesin teşhis için her zaman yeterli değildir. Akciğerlerde rastlanan bozukluklar pastörellozis, nekrobasillozis ve embolik nekrozlarda da görülebilir.

Hastalardan alınan kan, ölen hayvanlardan lezyonlu akciğer parçaları ve plörada toplanan sıvı muayene için gönderilir.

Tek başına *M. synoviae* tarafından oluşturulan hastalık genellikle 4-14 haftalık tavuklarda, 10-14 haftalık hindilerde görülmekte ve mortalite %1-10 arasında değişmektedir. Doğal infeksiyonu takiben hayvanlarda koruyucu bir bağışıklık şekillenir.

Hastalığın bulaşması *M. gallisepticum*’da olduğu gibi vertikal, sindirim ve solunum yolları olup; ND, IB gibi hastalıkları bulunanlarda çok şiddetli seyretmektedir. İnfeksiyonun vücuttaki yayılması yine hematogen yolla olmakta, eklem veya solunum sistemi dokularının hastalığına ek olarak hayvanlarda anemi, tüm vücutta retiküler hücre proliferasyonu ve vaskülitis görülür.

Lezyonlu organlardan yapılan ve Giemsa ile boyanan preparatlarda etkeni görmek ve buna dayanarak kesin bir tanıya gitmek olanaksızdır.

Fluoresan antikor tekniği ve ELISA, etkeni saptamada yardımcı olabilirler.

Doku süspansiyonlarından ve plöra sıvısından katı ve sıvı ortamlara ekimler yapılarak %5-10 CO₂’li ortamda 37°C’ de bir hafta süre ile inkubasyona bırakılırlar.

Katı ortamda üreyen ve ortası düğmeli gibi görülen koloniler, agarla birlikte alınarak sıvı PPLO besi yerlerine ekilir ve saf kültürleri yapılır.

Sıvı besi yerlerinde üretilen saf kültürlerden de Giemsa ile boyamalar yapılır ve incelenir. Mikroskop altında, belli bir şekli olmayan, oval, kokoid, halka, vs formların görülmesi PPLO’ dan şüphelendirir. İdentifikasyon için gerekli biyokimyasal testler yapılır.



Mycoplasma gallisepticum

Uygulamanın adı	Kanatlılardan Stafilocok izolasyonu
Yapılacağı hafta	7
Uygulamanın temel hedefi	Kanatlılardan Stafilocok izolasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

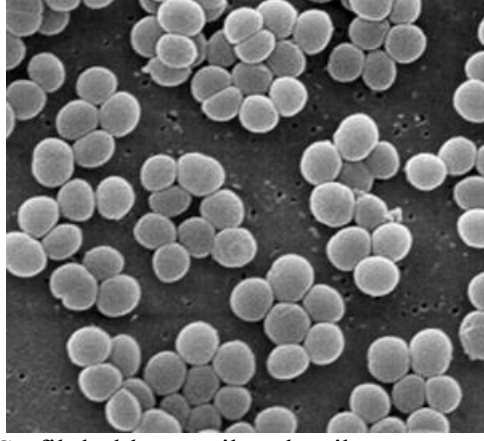
UYGULAMA BİLGİSİ

Micrococcaceae familyasının bir üyesi olan *Staphylococcus* cinsi içerisinde kanatlı hayvanlarda hastalık yapan en yaygın ve patojenik tür *S. aureus*'tur. *S. aureus* Gram pozitif, kok şeklinde, hareketsiz ve sporsuzdur. Katı kültürlerde salkım, sıvı ortamlarda kısa zincirler şeklinde görülürler. Aerobik-fakültatif anaerobik olan etkenler %5 kanlı agarda, 18-24 saatte beta-hemolitik, smooth, 1-3 mm pigmentli koloniler oluştururlar.

Tüm kanatlı türleri Stafilocok infeksiyonlarına duyarlıdırlar. Sağlıklı hayvanların deri-mukoz membranlarında ve çevrede bulunan stafilocoklar her yerde bulunduklarından hastalığın epidemiyolojisinde bulaşmanın önemi çok azdır. Etkenler kanatlı hayvanların kuluçka, kümes, kesimhane, paketleme ortamlarında yaygın olarak bulunurlar.

Konakçının doğal savunma mekanizmalarının kırılması ile çoğu durumlarda deri ve mukoz membranlar gibi bariyerlerin hasarı söz konusu olduğunda infeksiyon oluşmaktadır. *S. aureus* kırılan bariyerlerden içeri girerek iç bölgelere ulaşır ve osteomyelitis gibi lokal infeksiyonlar oluşturur. Kuluçkadan yeni çıkmış civcivlerde göbeğin açık olması omfalitis ve diğer infeksiyonların oluşmasına yol açar. Küçük cerrahi işlemler ve parenteral aşılama stafilocoklar için diğer giriş yollarıdır.

Stafilocokların laboratuvar teşhisinde ise önce lezyonlu bölgelerden örnekler alınır ve soğuk zincir altında +4 °C'de laboratuvara getirilir. Öze ucu alevde sterilize edildikten sonra seyreltme metodu ile ekimi yapılır. Besiyeri 37 °C'de 1-2 gece inkubasyona bırakılır. Besiyerinde üreme durumuna bakılır. Üreyen koloni varsa morfolojik olarak incelenir. 1 mm çapındaki beyaz, krem rengi ve sarı renkli koloniler Stafilocok identifikasyonuna tabi tutulur. Daha sonra Gram boyama yöntem ile koloniler mikroskopik olarak incelenir. Koloni öze alındıktan sonra. Lam üzerine damlatılmış hidrojen peroksit ile katalaz testine tabi tutulur. Katalaz testinde eğer bakteride hidrojen peroksiti oksijen ve suya ayırtıran enzim bulunuyor ise gaz çıkışı gözlenir. Reaksiyonun pozitif olması üreyen koloninin Stafilocok türü olduğunu göstermektedir. Patojenik Stafilocok ve Koagulaz Negatif Stafilocok türlerinin ayrımı için koagulaz testi yapılır. Koagulaz testinde ise EDTA'lı tavşan serumu ile koloni homojenize edilir ve aglutine yapılar görüldüğü zaman reaksiyon pozitif olarak değerlendirilir. Eğer bakteride koagulaz enzimi yoksa herhangi bir değişiklik gözlenmez ve bakteri Koagulaz Negatif olarak değerlendirilir. Diğer bir identifikasyon metodu ise CAMP testidir.



Stafilokokların mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Kanatlılarda Tüberkülozis tanısı
Yapılacağı hafta	8
Uygulamanın temel hedefi	Kanatlılarda Tüberkülozis tanısı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Kanatlı hayvanların tüberkülozu, *Mycobacterium avium* tarafından oluşturulan bulaşıcı bir hastalık olup; kronik seyreder. Verim düşüklüğü ve zayıflama ile karakterizedir. Hastalık genellikle tavuklar arasında büyük kayıplara neden olmaktadır.

Karaciğer, dalak, bağırsak, kemik iliği, böbrek vs. organlarda görülen değişik büyüklükte düzeniz, grimsi-sarı veya grimsi-beyaz nodüller hastalığın teşhisini kolaylaştırır. Bazı olgularda dalak, karaciğer ve kalp yırtılması sonucu karın boşluğu kanla dolar. Tüberkülozlu hayvanlarda lezyonlar genellikle karaciğer, dalak, bağırsak, kemik iliği, akciğer, yumurtalık, böbrek gibi organlarda lokalize olur.

Tüberküloz lezyonlarının sırası ile

%95 karaciğer,
 %90 kemik iliği,
 %90-95 dalak,
 %70-80 bağırsak,
 %6 böbrek,
 %50 akciğerlerde,
 yerleştikleri belirlenmiştir.

Sarımsı kazeöz nodüller karaciğer, dalak ve bağırsakta bulunur.

Kemik iliğinde açık renkli granülomlar, özellikle femurun distal kısımlarındaki lezyonlar nedeni ile etkilenen kanatlılarda topallık görülebilir.

Teşhis klinik, nekropsi bulguları ve laboratuvar muayeneleri ile yapılır.

Bakteriyoskopi: Tüberkülozdan şüpheli organlardan preparatlar hazırlanarak Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanır.

Ehrlich-Ziehl - Neelsen (EZN) Mikobakterileri boyama yöntemi

- Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
- Lam üzerine ve bütün lâmi kaplayacak tarzda karbol fuchs solusyonu konur.
- Preparat alttan 4-5 dakika ve aralıklı olarak hafifçe ısıtılır. Preparatın yanmamasına ve kabarcıkların çıkmamasına dikkat edilir (preparat üzerinden hafif buharlar çıkabilir).
- Boya dökülür ve preparat asit-alkolde (% 95 alkol + % 3 HCl asit) dekolore edilir.
- Su ile yıkanır.
- Preparat üzerine metilen mavisi solusyonu konur ve 10-15 saniye boyanır.
- Boya dökülür ve su ile yıkanır.
- Kurutulur ve immersiyonla muayene edilir.

Mikobakteriler veya asidorezistens mikroorganizmalar pembe kırmızı renkte ve diğer mikroplar ise mavi renkte görülürler.

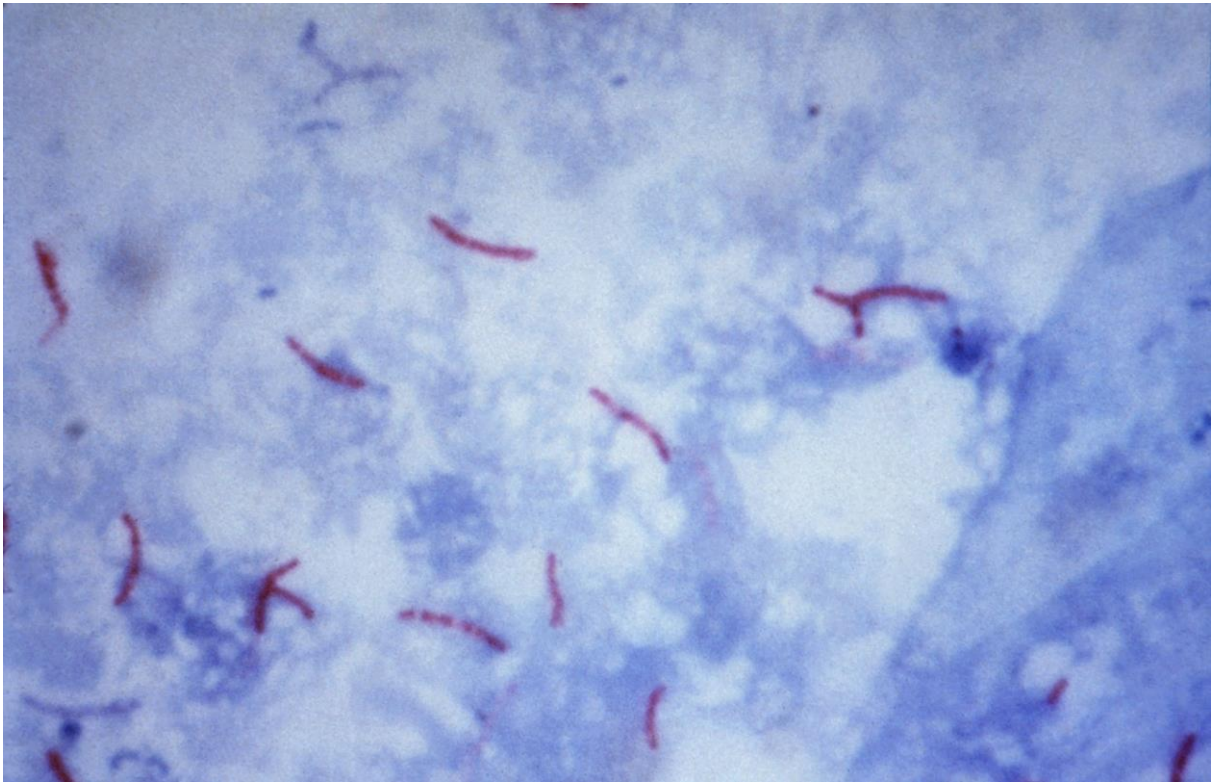
Kültür: Lezyonlu organlardan kültür yapılabilmesi için en çok tercih edilen yol % 4 NaOH metodudur.

Bunun için lezyonlu bölgelerden alınan marazi maddeler steril bir havan içerisine konur. Küçük parçalara ayrıldıktan sonra üzerine %4'lük NaOH ilave edilerek homojen hale getirilir. 37°C'de 30 dak. bekletilir.

Süspansiyon steril bir santrifüj tüpüne alındıktan sonra 3500 dev./dak. 15-20 dak. santrifüj edilir.

Üst sıvı içinde dezenfektan bulunan bir kaba aktarıldıktan sonra sediment üzerine 1-1.5 ml. steril distile su konur, pH 7.2'ye ayarlanır.

Hazırlanan inokulumdan besiyerlerine 0.05-0.1 ml ekilir, aerobik şartlarda 37-40 °C'de inkübe edilir. Genellikle üremeler inokülasyondan 7-9 gün sonra görülmeye başlar.



Ziehl-Neelsen boyamada Tüberküloz basillerinin görünümü

Uygulamanın adı	Avian influenza klinik ve laboratuvar tanısı
Yapılacağı hafta	9
Uygulamanın temel hedefi	Avian influenza klinik ve laboratuvar tanısı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Embriyolu tavuk yumurtası, Phosphat Buffer Solution, Besiyeri, serum fizyolojik, bünzen beki, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Avian Influenza, kanatlıların solunum ve sinir sistemlerine ait belirtilerle birlikte yüksek bir morbidite ve mortalite ile karakterize akut infeksiyöz ve kontagiyöz viral bir hastalıktır.

Influenza virusunun neden olduğu hastalıklar arasında en önemlisi tavuk vebası olup bu virus ayrıca hindi, ördek, kaz, bıldırcın ve bir çok vahşi kanatlılarda da infeksiyon oluşturmaktadır.

Nekropside, ölüm sertliği, ölümü takiben hemen şekillenir.

Şiddetli hastalık olgularında lezyonlar septisemi için tipiktir.

Karkas kırmızı renktedir ve hayvanların deri, karaciğer, dalak, kalp, böbrek ve akciğerlerinde konjestif ve hemorajik lezyonlar görülür.

Karakteristik lezyonlar, ince bağırsaklara kadar uzanabilen, proventriculus'daki ve taşlıktaki hemorajilerdir ve karaciğer, dalak ve böbreklerde sarıdan griye kadar değişen odaklar görülebilir.

Aniden ölen hayvanlarda bu lezyonlar çoğunlukla görülmez. Düşük virulanslı influenza virusları tarafından oluşturulan ve özellikle, solunum kanalını etkileyen uzun süreli infeksiyonların görüldüğü bazı olgularda, çoğunlukla sinüsitis görülmesine karşın, bazen de mukopurulent veya kazeöz eksudat ile karakterize solunum sistemi lezyonları ile birlikte fibrinöz perikarditis, peritonitis ve böbrek bozuklukları da şekillenebilir.

Yüzdeki ve gaga altındaki ödem oldukça yaygındır.

Derinin karkastan sıyrılması ile subkutan dokularda saman sarısı renkte berrak bir sıvıya rastlanır.

Kan damarları çoğunlukla tıkanmıştır

Histopatolojik muayenelerde, dalak, karaciğer ve böbrek gibi iç organlarda ödem, hiperemi, hemoraji ve dejeneratif nekrotik odaklar görülür.

Oldukça patojenik viruslar tarafından oluşturulan infeksiyonların bazılarında miyokardiyal nekroz ve miyokarditis şekillenir.

Bazı viruslar da hayvanlarda belirgin merkezi sinir sistemi bozukluklarına neden olurlar ve bu tip infeksiyonlarda nöronal hücrelerde yaygın perivasküler lenfoid hücre infiltrasyonu ve nekroz ortaya çıkar.

Sinir dokusunda nadiren de ödem ve hemorajiler dikkati çekebilir.

Kesin teşhis için laboratuvara yeterli sayıda hasta veya yeni ölmüş hayvan gönderilerek klinik ve nekropsi bulguları dikkatlice gözden geçirilir ve virus izolasyonu, serolojik muayeneler ve histopatolojik yoklamalara başvurulur.

Virus izolasyonu:

Bu amaçla canlı veya ölü hayvanlardan ayrı ayrı örnekler alınır.

Ölü hayvanlardan virus izolasyonu amacıyla dışkı veya bağırsak içeriği ve trachea ile birlikte akciğer, hava kesesi, dalak, beyin, karaciğer ve kalp gibi organlardan da örnekler alınabilir.

Canlı hayvanlardan ise tracheal ve kloakal svab örnekleri alınır.

Marazi maddelerden hazırlanan inokulumlar antibiyotiklerle muamele edildikten sonra 10-11 günlük embriyolu yumurtaların allantoik boşluklarına inokule edilirler.

Yumurtaların 48 saat süreyle 35-37°C'de inkübasyonundan sonra allantoik sıvı alınarak HA testi uygulanır. Bazı virus suşları embriyoyu 48 saat içinde öldürebilir. Bazıları ise daha uzun bir süre inkübasyona ihtiyaç gösterir.

48 saat içinde ölmeyen embriyolu yumurtalar 4°C'de 8-12 saat bekletilerek embriyo öldürülür ve allantoik sıvıları toplanır. Allantoik sıvıya kan karışmamasına özen gösterilmelidir.

Bakteriyolojik yönden steril olan allantoik sıvıda saptanan HA aktivitesi, influenza virusu veya diğer herhangi bir kanatlı paramyxovirusu tarafından oluşturulmuş olabilir.

Bu aşamada, Newcastle hastalığı virusunun (NDV) ekarte edilmesi için allantoik sıvıya spesifik NDV antiserumu ile HI testi uygulanmalıdır.

Allantoik sıvıda Influenza A virusunun varlığını göstermek amacıyla da, virusun tip antijenlerinden olan matrix ve nükleokapsid proteininden bir veya ikisine karşı hazırlanmış spesifik antiserum ve konsantre virusla uygulanan immunodiffüzyon testi yapılır.

İzole edilen virusun daha ileri karakterizasyonu için alt tip identifikasyonu ve virusun patojenitesi belirlenir.

Alt tip identifikasyonu için, farklı H ve N alt tip kombinasyonlarına karşı hazırlanmış antiserumlardan yararlanılır.

Hastalık olgularından izole edilen bir influenza virusunun patojenitesi mutlaka belirlenmelidir.

Serolojik Testler

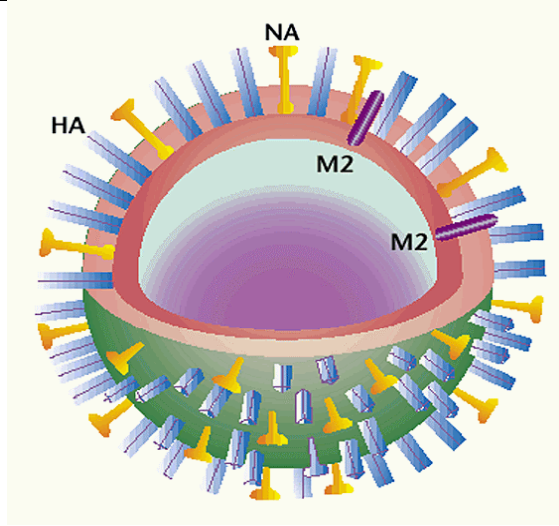
Yüzey antijenlerindeki farklılıklardan dolayı Influenza A viruslarının neden oldukları infeksiyonların tanısında konvansiyonel serolojik testler çok kısıtlı olarak kullanılırlar.

Virusun çok sayıda alt tipinin bulunması ve alt tipler içinde de varyasyonların görülmesinden dolayı, ancak infeksiyonda rol oynayan virusun H alt tipi bilindiği takdirde HI testi teşhis amacıyla kullanılabilir.

HI testi, özellikle, Newcastle hastalığının elimine edilmesi gereken durumlarda çok önemlidir.

Tip antijenlerinden bir tanesini saptamaya yönelik olarak yapılan agar-jel diffüzyon testi, genel anlamda influenza infeksiyonlarının tanısında daha yararlı olabilmektedir.

Bazı kanatlı hayvanların, özellikle de, su kuşlarının Influenza A infeksiyonu sonucunda presipite edici antikor oluşturmamaları, bu testin en büyük dezavantajıdır.



AI virusunun şematik görünümü

Uygulamanın adı	Avian Klamidyozis ve Egg Drop Syndrome laboratuvar tanısı
Yapılacağı hafta	10
Uygulamanın temel hedefi	Avian Klamidyozis ve Egg Drop Syndrome laboratuvar tanısı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, Hücre Kültürü, Phosphat Buffer Solution, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Avian Klamidyozis, evcil kanatlıların özellikle hindi, güvercin, ördek, daha az olarak tavukların, psittacinae familyasına ait kanatlıların (muhabbet kuşları, papağan, kanarya vs.)ve yabani kuşların, Chlamydia psittaci'den ileri gelen solunum, sindirim ve sinir sistemlerine, göze ve eklemlere yerleşerek gizli, akut, subakut, kronik ve asemptomatik enfeksiyonlara, bazende ölümlere yol açan bulaşıcı bakteriyel hastalığıdır.

C. psittaci, Gram negatif, oval-yuvarlak, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, hücre duvarında muramik asit bulunmayan obligat intrasellüler bir bakteridir.

Cansız sıvı ve katı besi yerlerinde üreyemez. Embriyolu yumurtalarda (sarı kesesinde), deneme hayvanlarında ve hücre kültürlerinde çoğalabilirler.

Giemsa, stamp, macchiavello, castenada,gimenez boyamaları ile boyanırlar.

Kanatlıları infekte eden 6 serotip(A,B,C,D,E,F)belirlenmiştir.

C. psittaci'nin hücre içinde üremesi, oksitetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, penisilin ve tylosin tarafından inhibe edilir.

Dezenfektanlara da değişik derecede duyarlıdırlar.

Hastalığı klinik olarak saptamak pek mümkün değildir. Sadece akut ve subakut olgularda yararlı ipuçları elde edilebilir.

Birçok bakteriyel, viral ve mantar enfeksiyonu ile karıştırılabilir.

Teşhis için laboratuvara hasta hayvan ve kan gönderilir. Hasta hayvanlardan nasal ve oküler eksudatlar ve ayrıca taze gaita örnekleri alınabilir.

Giemsa, modifiye Ziehl-Neelsen yöntemleri ile boyanırlar. Mikroorganizma antijenlerinin görüntülenmesinde IFA veya insitu immunperoksidaz tekniklerindende yararlanılabilir.

Aseptik koşullar altında alınan çeşitli taze muayene materyallerinden usulüne uygun inokulumlar (streptomisinli) hazırlanır.

Bu inokulumlardan ETY (embriyolu tavuk yumurtası), doku kültürlerine ya da deneme hayvanlarına ekimler yapılır.

Deneme hayvanlarında görülen enfeksiyon ve ölümler, ETY larda oluşan ölümler ve kültürlerde görülen dejenerasyonlar *C. psittaci* yönünden incelenir.

Dokulardaki cinse özel ortak LPS karakterindeki antijenleri ve serumdaki antiklamidial spesifik antikorları saptamak için ELISA dan yararlanılır.

Ayrıca IFA, in situ immunperoksidaz, indirekt komplement fikzasyon,agar jel diffüzyon,

lateks aglütinasyon testleride kullanılabilir.

EDS 76 ise, özellikle tavuklarda yumurta veriminde düşme, yumurtanın iç ve dış kalitesinde bozukluklar, yumurta yolunun yangısı (salpingitis) ile karakterize bulaşıcı viral bir hastalıktır.

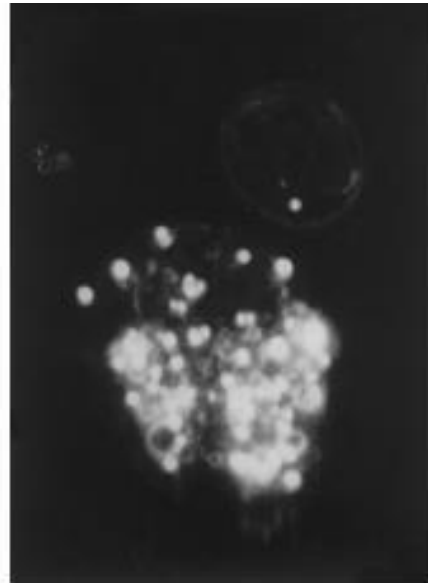
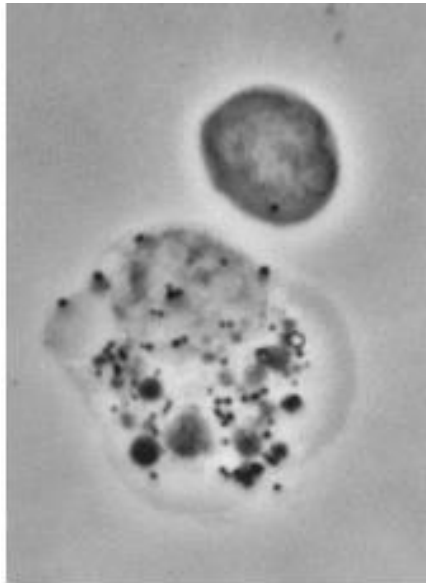
Klinik ve Nekropsi Bulguları: Yumurta veriminin ani düşmesi ve yumurta kalitesindeki bozulmalar.

İnfeksiyöz bronşitis, infeksiyöz laringotracheitis, ND, AE, CRD, Gumboro, Tavuk Kolerası, Tavuk Tifosu ile karışabilir.

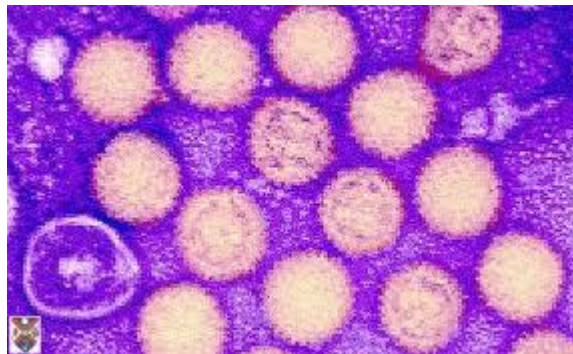
Virus İzolasyonu: Ördek böbrek, ördek embriyo karaciğer ve ördek fibroblast hücre kültürlerinde yüksek titrede ürer. Embriyolu ördek ve kaz yumurtalarında çok yüksek titrede ürer.

Serolojik Testler: HI, FA, SN, AGD ve ELISA

Hayvan Deneyi: SPF civcivler göz ve kloakal yolla infekte edildiklerinde virus 7. günden sonra bursa Fabricius ve bağırsaklardan izole edilebilir.



Chlamydia psittaci



Egg Drop Syndrome Virusu

Uygulamanın adı	İnfeksiyöz bursal hastalık ve İnfeksiyöz bronşitis laboratuvar tanısı
Yapılacağı hafta	11
Uygulamanın temel hedefi	İnfeksiyöz bursal hastalık ve İnfeksiyöz bronşitis laboratuvar tanısı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Embriyolu tavuk yumurtası, Phosphat Buffer Solution, Triptoz Fosfat Buyyon, Steril kaplar, Besiyeri, serum fizyolojik, bünzen beki, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

İnfeksiyöz bursal hastalık (*Infectious bursal disease*, IBD) veya Gumboro Hastalığı infeksiyöz bursal hastalık virusu (IBDV) tarafından meydana getirilen, 3 haftalıktan büyük piliçlerde akut seyreden, çok bulaşıcı viral bir hastalıktır.

Yüksek düzeyde mortalite ile seyreden IBD, hastalığı geçiren piliçlerde immunsupresyona, sekonder infeksiyonlara ve aşılamayla oluşturulan bağışıklık düzeyinin düşük olmasına sebep olmaktadır.

IBDV birçok ülkede kanatlı sektöründe endemiler oluşturan zarfsız bir virustur.

Virus dezenfektanlara karşı uzun süre dirençlilik gösterebilme özelliğine sahiptir. Etken, eter ve kloroform ile muameleye dirençli bulunmuş, pH 12'de inaktive edilmiş, pH 2'de etkilenmemiştir.

Teşhiste Virus izolasyonu; BF ve dalaktan izolasyon gerçekleştirilir

ETY, hücre kültürü

AGID, IFA, SN test, ELISA.

In/situ hybridization non-radioactive problemler kullanarak

İnfeksiyöz bronşitis (IB), tavukların özel bir virustan ileri gelen, çok bulaşıcı ve akut seyirli salgın bir hastalıktır.

Bu infeksiyon tavuklarda tracheal sesler, öksürme ve aksırma ile karakterizedir.

Solunum sistemi dışında, hayvanlarda yumurtalıklar ve böbrekler de etkilenebilir.

Özellikle hastalık civcivlerde çok daha şiddetli seyreder ve bu hayvanlarda genel semptomlara ilaveten burun akıntısı da görülür.

İnfeksiyon yumurta prodüksiyonundaki hayvanlarda verimde ve yumurta kalitesinde düşümlere, broylerlerde ise performans bozukluklarına neden olarak ticari işletmelerde büyük ekonomik kayıplara yol açar.

İnfeksiyöz bronşitis hastalığını klinik ve nekropsi bulgularına göre teşhis etmek oldukça güçtür.

Solunum sistemi belirtileri ve bu sisteme ait saptanan makroskopik ve mikroskopik lezyonlar IB'den şüphe ettirse de, benzer bozukluklar diğer birçok hastalıkta da görülmektedir.

Hastalığın solunum sistemi formu Newcastle, infeksiyöz laryngotracheitis, CRD, syngamus trachea ve infeksiyöz koriza ile karışabilmektedir.

Yumurta verim ve kalitesindeki bozukluklar başta EDS-76 olmak üzere infeksiyöz ve yönetim hataları gibi infeksiyöz olmayan faktörler tarafından da meydana getirilebilir.

Oviduktteki gelişme bozuklukları başka sebeplerden kaynaklanabileceği gibi, hastalığın üremi formu da, beslenme noksanlıkları ve bilinmeyen diğer bazı nedenlerden kaynaklanabilir.

Hastalığın kesin tanısı, şüpheli hayvanlarda virus varlığının gösterilmesi veya kan serumlarında spesifik antikorların saptanmasıyla konur.

Virusun en hızlı üreme gösterdiği akut enfeksiyon dönemi, dokularda virus varlığını göstermek için en uygun zamandır.

İnfeksiyondan 7-10 gün sonra ise etkenin belirlenmesi zorlaşır.

IBV, hasta hayvanların trachea, akciğerler, hava kesesi, sekal tonsil ve üremi formunda da böbreklerinden izole edilebilir.

Ancak doku örneklerinin hastalığın başlangıç döneminde alınması gerekir.

Hayvanlardan alınan muayene örnekleri hemen işlenmeyecek ise -20°C'de saklanır. Organlardan alınan parçalar steril bir kaba alınarak üzerine hacminin 1/5 veya 1/10 oranında antibiyotikli triptoz fosfat buyyonu veya PBS konularak süspanse edilir veya filtreden geçirilerek inokulum için hazırlanır.

Saha materyallerinden etkenin izole edilmesi için en uygun yöntem, hazırlanan inokulumdan embriyolu tavuk yumurtalarına veya civciv embriyo tracheal organ kültürlerine ekim yapılmasıdır.

Hazırlanan bu inokulum 9-11 günlük ETY'nın allantoik boşluğuna veya civciv embriyo tracheal organ kültürüne inokule edilir.

İnfekte hayvanlarda IB virusunun gösterilmesinde kullanılan diğer bir yöntem de, hasta hayvanların trachea kesitlerinin veya tracheal kazıntılarının immunofluoresans tekniği ile incelenmesidir.

Özellikle, virusun bol miktarda bulunduğu enfeksiyon sonrası ilk 7 günlük dönem içinde uygulanması basit ve tatmin edici bir yöntemdir.

Özellikle son yıllarda IBV'nin çabuk identifikasyonu için PCR tekniği ve DNA problemleri ile birlikte, suşların identifikasyonu amacıyla oligonükleotid fingerprinting ve nükleik asit sekanslama teknikleri gibi moleküler teknikler geliştirilmiştir.

İnfeksiyöz bronşitis'in serolojik tanısı serumda bu virusa karşı oluşan antikorların saptanmasına dayanmaktadır.

■Serolojik reaksiyonlar arasında en çok kullanılanları; serum (virus) nötralizasyon (SN veya VN), agar-jel diffüzyon (AGD), fluoresans antikor (FA) tekniği, hemaglutinasyon inhibisyon (HI) ve ELISA teknikleridir.

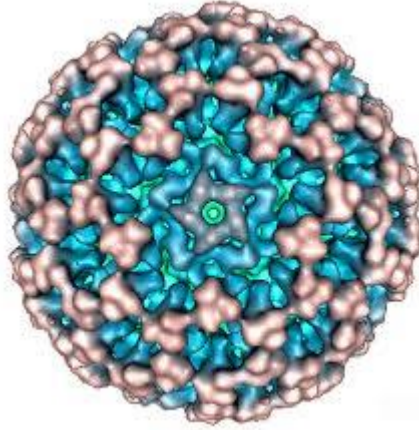
SN testi güvenilir yegane suş-spesifik testtir.

HI testi, primer antikor yanıtında genellikle suş-spesifik iken, AGD, FA ve ELISA tekniklerinde hem grup- hem de tip-spesifik antijenlerle reaksiyonlar meydana gelmektedir.

Virus izolasyonu ve hayvanlarda IBV ile deneme enfeksiyonu oluşturmak için, hastalıktan şüpheli hayvanların trachea ve akciğerlerinden hazırlanan inokulum veya izole edilen IB şüpheli virus, duyarlı hatlardan sağlanan civcivlere intranasal, intratracheal veya intraoküler

yolla verilir.

Virusun verilmesini takiben hayvanlarda 18-36 saat içinde solunum güçlüğü başlar.



Bursal Hastalık etkeni



İnfeksiyöz Bronşitis etkeni

Uygulamanın adı	İnfeksiyöz laringotraheitis ve İnfeksiyöz anemi laboratuvar tanısı
Yapılacağı hafta	12
Uygulamanın temel hedefi	İnfeksiyöz laringotraheitis ve İnfeksiyöz anemi laboratuvar tanısı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Embriyolu tavuk yumurtası, Phosphat Buffer Solution, Besiyeri, serum fizyolojik, bünzen beki, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

ILT, tavukların, hindi ve sülünlerin, üst solunum sisteminin yangılanması, öksürük, solunum güçlüğü ve konjunktivitis ile karakterize olan, genellikle subakut veya kronik seyirli, bulaşıcı ve bazen de öldürücü bir viral hastalıktır

Her yaştaki tavukları infekte eder.

Kümeslerdeki hijyenik koşulların kötü olduğu zamanlarda hastalık görülebilir.

Virus, solunum sisteminden ve göz konjunktivasından girerek infeksiyon oluşturur.

Damlacık enfeksiyonu görülebilir

Klinik ve nekropsi bulguları:

Bu hastalık birçok yönleri ile;

Mikoplazmosis, koriza, kronik pasteurellosis, salmonellozis, sinusitis (bakteriyel hastalıklar)

IB, ND, Çiçek (Viral hastalıklar)

Aspergillosis (mantar hastalıkları)

A avitaminosis ile karışabilir.

Virus İzolasyonu: Tracheal eksudat, tracheal epitel hücrelerinden hazırlanan inokulumlar ETY sınıfı CAM'ları üzerine ekilirler.

Serolojik Testler: AGPT, ELISA, IFA, VN vb.

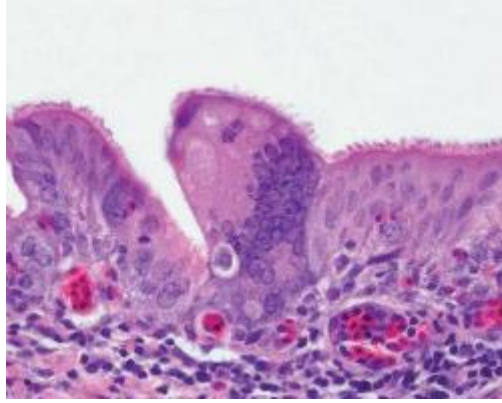
Hayvan Deneyi: İntratracheal inokulasyonlar ile deneysel infeksiyon oluşturulur.

İnfeksiyöz anemi ise şiddetli immunsupresyon ile sonuçlanan aplastik anemi, timus ve bursa Fabricius'un atrofisi ve kemik iliğinin hipoplasisi ile karakterize bir circovirus infeksiyonudur.

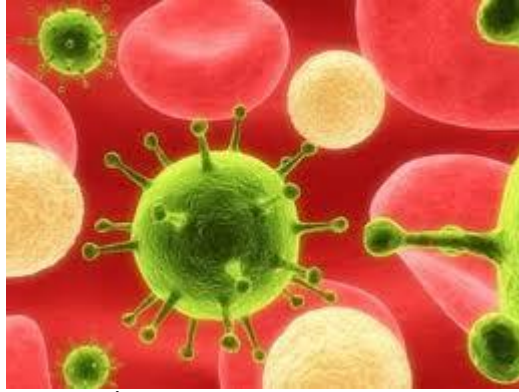
İnfekte sürülerde sekonder bakteriyel, viral veya mantar infeksiyonları hızla artar. Bu sendrom öncelikle 3-9 haftalık yaştaki (örneğin gangrenöz dermatitise bağlı olarak %15 mortalite gösteren) piliçlerde görülür.

Virus izolasyonu: Virus hastalıklı hayvanların tüm organlarından (karaciğer, dalak, timus, akciğer, kalp, kemik iliği) ve dışkıdan yapılabilmektedir. Etkenin izolasyonu için günlük civcivlere inokulasyon yapılabilmektedir. Ayrıca etken embriyolu tavuk yumurtalarının yumurta sarısı içinde embriyonal ölüm ve

spesifik bir embriyopati'ye neden olmadan üreyebilmektedir.



ILT virusu



İnfeksiyöz anemi virusu

Uygulamanın adı	Lökozis, Marek Hastalığı, Newcastle hastalığı laboratuvar tanısı
Yapılacağı hafta	13
Uygulamanın temel hedefi	Lökozis, Marek Hastalığı, Newcastle hastalığı laboratuvar tanısı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Embriyolu tavuk yumurtası, Phosphat Buffer Solution, Besiyeri, serum fizyolojik, bünzen beki, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Lökozis/Sarkoma hastalık grubunun etiyolojik etkenleri Retroviridae familyasına ait retrovirus cinsi üyeleridir.

Retroviruslar, Lenfoid lökozis, erythroblastosis, myeloblastosis, myelocytomatosis, endothelioma, nephroblastoma, hepatocarcinoma, fibrosarcoma ve osteopetrosis enfeksiyonlarını meydana getirirler.

Klinik ve nekropsi bulguları:

Virus İzolasyonu: Plazma, serum, tümör virus izolasyonu için en iyi materyallerdir. Ayrıca KC, yumurta albumini, embriyo, oral yıkantılar ve dışkıdan da izolasyon yapılabilir.

RIF (Resistance Inducing Factor) Testi

Cofal (Complement Fixation Tests for Avian Leucosis Viruses) Testi

NP (Non Producer Test) Testi

FAT

PCR

Marek Hastalığı (MH) tavukların çok bilinen tümöral ve öldürücü viral bir enfeksiyondur. MH periferik sinirler, eşeylik organı, iris, iç organlar, kas ve deride lenfoproliferatif sonu oluşan tümöral bozukluklar ve ölüm ile karakterizedir.

1907 yılında Dr. Marek tarafından tanımlanmıştır.

Özellikle piliçlerde immunsupresif etkisi ile tavuk yetiştiriciliğini etkileyen bir enfeksiyondur.

Klinik Nekropsi Bulguları: Kesin tanı için lab. muayeneleri zorunludur.

Gumboro, Lenfoid Lökozis, Aspergilosis, Kolibasillozis, Tüberküloz, Epidemik Tremor ile karıştırılabilir.

Virus İzolasyonu: Virus izolasyonunda deri lezyonları, tüy folikülleri, epitel hücreleri ve döküntü kepekler, kan lenfositleri, heparinli taze kan, dalak dokusu ve tümör hücreleri kullanılır. Doku kültürüne ekim yapılır.

Hastalıktan şüpheli tavukta MHV antijeni aranması: Spesifik monoklonal antikörlerle aranır. FAT, İmmunoperoksidaz, AGPT, NT ve ELISA kullanılan testler

Histopatolojik ve sitolojik muayeneler: MH tümörlerinde küçük büyük lenfositlerde oluşan karışık bir lenfosit popülasyonu, lenfoblastlar, plazma hücreleri MH hücreleri görülür.

Newcastle hastalığı (Yalancı veba) evcil kanatlıların ve diğer kuşların akut seyirli, hızlı yayılan viral bir hastalığıdır.

Hastalığa bağlı olarak hayvanların solunum, sindirim ve sinir sistemlerinde ciddi bozukluklar şekillenir, çok bulaşıcı ve öldürücüdür.

Hastalık kanatlı hayvan yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde büyük bir problem olarak yer tutmaktadır.

TEŞHİS

Newcastle hastalığıyla karışabilecek infeksiyonlar arasında;

İnfeksiyöz bronşitis,

infeksiyöz laringotraheitis,

İnfeksiyöz bursal hastalığı,

Avian ensefalomyelitis,

Marek,

Tavuk çiçeği,

İnfluenza A,

Tavuk kolerası,

Kronik solunum yolu hastalığı,

Pullorum hastalığı,

Psittakozis,

İnfeksiyöz koriza,

İnfeksiyöz sinuzitis,

Hemorajik sendrom yer almaktadır.

Bunlar yanında, zehirlenmeler ve Aspergillozis ile birlikte Riboflavin, Vit. E ve Vit. A noksanlıkları sonucu ortaya çıkan semptomlar da infeksiyonla en fazla karışabilen bozukluklar arasında bulunmaktadır.

Nekropside en önemli lezyonlara solunum sisteminde rastlanır.

Burun boşluğunda, larinkste ve trahea'da seröz, kataral veya peynirimsi bir eksudatın bulunması infeksiyon için dikkat çekicidir.

Bazen trahea ve bronşlarda yangısel reaksiyonlarla birlikte hemorajilere ve akciğerlerde de pnömونيye rastlanır.

Genç piliçlerde hava keselerinin kalınlaştığı, bulanıklaştığı ve matlaştığı, bu bölgede bazen sabun köpüğü gibi kataral veya kazeöz eksudatın bulunduğu görülür.

Sindirim sisteminde ise duodenumun son bölümünde, jejunum, ileum ve özefagusta değişik büyüklükte nekrotik odaklar ve hemorajiler saptanır.

Diğer önemli bir lezyon da proventrikulus, sekal tonsiller ve peyer plaklarında görülen hemorajiler ve yangısel bozukluklardır. Nokta tarzında kanama odaklarına diğer organlarda da rastlanabilir.

Ayrıca, dalak ve böbreklerin solgun, küçülmüş bir durumda bulunduğu, yumurta folliküllerinde ise kalınlaşmanın olduğu tespit edilmiştir.

İnfeksiyonun histopatolojik olarak incelenmesi sonucu

proventrikulusta, hemoraji, hiperplazi;

bağırsaklarda, hemorajik ve ülseratif nekrozlar,

sindirim ve solunum sisteminde, karaciğer, dalak, miyokardium, böbrek ve b. Fabricius'da lenfoproliferatif hiperplaziye rastlanır.

Solunum sisteminden akciğerlerde ödem, proliferatif ve eksudatif değişiklikler, bronşitis, pulmoner hava kesesinin infiltratif yangısı, kataral traheitis ve yüzeysel epitellerde dökülme görülür.

İnfeksiyonun sinir sistemine yönelik yayılım göstermesi sonucu beyin ve beyincikte hemoraji, nöron ve ganglion hücrelerinde dejenerasyon ve ensefalitis meydana gelir.

Hastalığın direkt ve indirekt yollarla kesin teşhisi için, laboratuvara yeteri miktarda hasta hayvanlar ve kan örnekleri gönderilir.

Virus izolasyonu:

Sürünün infeksiyona yakalanmasından 3-7 gün sonra viremi döneminde virus izolasyonunun yapılması teşhis açısından önemlidir.

Virus en çok traheadan izole edilir. Virulansı fazla viruslar ise trahea, akciğer, dalak, beyin, harderian bezi ve sekal tonsillerden izole edilebilir.

İzolasyon için infekte tavukların çeşitli organlarından alınarak hazırlanan inokulumlar, SPF sürülerden elde edilen 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtalarının korioallantoik boşluğuna inokule edilir.

Ölen embriyolu infekte yumurtalar açıldığında embriyolarda konjestif veya hemorajik intestinal lezyonlar tespit edilir. Virusun ürediği korioallantoik sıvı toplanır.

Lâm üzerinde bir damla korioallantoik sıvı ve bir damla %5'lik eritrosit süspansiyonunun karıştırılması ile hemaglutinasyon testi yapılır.

Patolojik materyallerde virusun varlığı, biyoteknolojik yöntemlerle de ortaya konabilir.

Teşhisde serolojik testlerden de yararlanılmaktadır.

Etkenin biyolojik bir karakteri olarak kabul edilen hemaglutinasyon yeteneği ve bunun bağışık serumlardaki spesifik antikorlar tarafından önlenmesi özelliği (HI) aşılama sonu hayvanlardaki bağışıklığı saptamada, infeksiyonun direkt ve indirekt teşhisinde kullanılmaktadır.

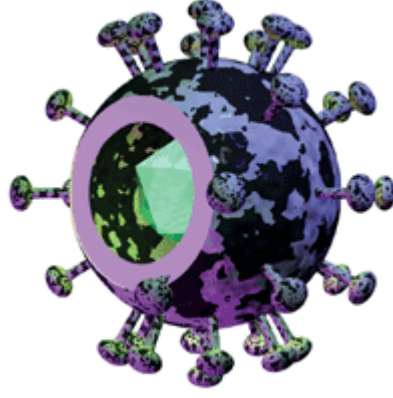
Bunlar; Hemaglutinasyon İnhibisyon, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Nötralizasyon, Agar Jel Presipitasyon (AGP), Floresans Antikor Tekniği (FAT), İndirekt İmmunperoksidaz monolayer yöntem ve Epruvasyon testleridir.

NHV'nin tavukların dokularından immunohistokimyasal olarak teşhis edilmesinde, monoklonal primer antikor kullanılarak immunoperoksidaz histokimyasal teknikten yararlanılmıştır.

İmmunoperoksidaz tekniği Newcastle hastalığında hızlı ve ayırıcı bir test olarak önem kazanmıştır.

Son yıllarda, NHV'nin teşhis edilmesinde biyoteknolojik metodlardan da yararlanılmaktadır. İnfekte allantoik sıvıdan, NHV'nin identifiye edilmesinde, polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) başarılı sonuç verdiği bildirilmiştir.

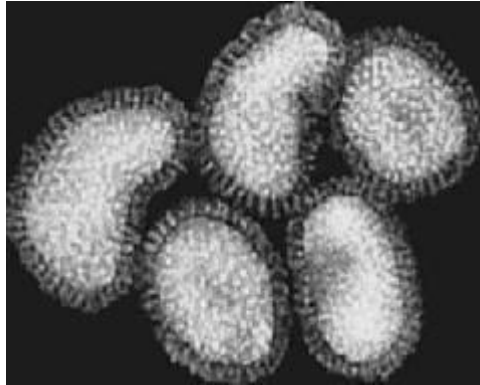
Ayrıca, NHV suşlarının identifikasyonunda oligonukleotid parmak izi (finger print) tekniğinden de yararlanılabileceği ortaya konulmuştur.



Avian Leukemia Virus



Marek hastalığında tipik balerin oturuğu



Newcatle Hastalığı etkeni

Uygulamanın adı	ELISA, Hemaglutinasyon İnhibisyon, Hemaglutinasyon testleri
Yapılacağı hafta	14
Uygulamanın temel hedefi	ELISA, Hemaglutinasyon İnhibisyon, Hemaglutinasyon testleri
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, ELISA enzimleri, antijen, substrat, konjugat, etüv, yıkanmış tavuk eritrositi
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

PRİMER BAĞLANMA TESTLERİ :Antijen ve antikorun reaksiyona girmesine müsaade edilir. Oluşan immun kompleksin miktarı direkt ya da dolaylı olarak ölçülür. Bu reaksiyonu ölçebilmek için Ag. veya Ab; radyoizotop, floresan boya ve ya enzim ile işaretlenir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra; birleşmemiş materyaller ortamdan uzaklaştırılarak, reaksiyona giren kısmın miktarı, işarete dayanılarak ölçülür.

KULLANILAN MATERYALLER ;

Mikroplate

Antijen → normalden az ya da fazla kullanılmamalıdır.

Wash buffer

Şüpheli serum

Substrat → renksizdir ve reaksiyona girince renk verir.

Konjugat → substrat'a bağlanır. Bağlanma sonucu renk oluşur.

Oluşan immunolojik reaksiyonun, enzim-substrat sistemi ile görünür hale getirilmesi esasına dayanan teknikleri kapsar. Hem antijen, hem de antikor varlığı ve miktarı hassas olarak ölçülür.

(n) sayıdaki serum için (n) sayıda sulandırma yapılır. Her göz bir serumu temsil etmektedir.

1 2 3 .. 1/25

0,6 ml FTS + 25 µl şüpheli serum → 1/25

1 2 3 .. 1/250

0,9 ml FTS + 100 µl I.sulandırma → 1/250

1 2 3 .. 1/500

200 µl serum diluent + 200 µl II. Sulandırma → 1/500

Bir tane IB için özel mikroplate kiti alınır.

Her örnek serum için 1 göz kullanılmaktadır.

Göze 0,1 ml en son sulandırmadan koyulur.

30 dk beklenir.

Sıvı dökülür.

4 kez yıkama solusyonu ile yıkanır.

0,1 ml konjugat koyulur

30 dk beklenir.

Yıkama

0,1 ml substrat koyulur

15 dk bekle

0,1 ml stop solusyonu koyulur.

650 nm de sonuçlar okunur.

Mikroorganizmaların izolasyonunda ve serumdaki antikorların tespitinde kullanılan çok duyarlı ve spesifik bir testtir.

Testin esası; şüpheli antijen veya antikorun homoloğu olan ve enzim ile işaretli bir konjugata bağlanması ve bu bağlantının substrat adı verilen kimyasal bir madde yardımı ile renginin değiştirilip görülür hale getirilmesidir.

DİREKT ELISA → şüpheli marazi maddede m.o. aranması için yapılır.

İNDİREKT ELISA → şüpheli serumda antikor aranması ve titre saptanması için yapılır.

NDV-IBV-IBD-Mg-Ms-ReoVirus v.b. için ticari kitler mevcuttur ve rutin olarak uygulanmaktadır.

ŞÜPHELİ SERUM daki antikor + antijen → birleşir.

Bu komplekse konjugat bağlanır ki enzim ile işaretlenmiştir.

Ortama substrat eklenir ve komplekse bağlanır.

Enzim substratı parçalar ve renk oluşur.

Stopper eklenerek reaksiyon durdurulur.

ELISA reader da okutulur.

KULLANILAN MATERYALLER

Şüpheli Serum

+/- kontrol

Serum sulandırıcısı

Ticari mikrolept

Wash buffer= yıkama solusyonu

Konjugat

Substrat

Stopper

Reader

TESTİN YAPILIŞI

Enfeksiyona spesifik ticari mikroleptler vardır ve mikroleptin her gözü taranacak olan enfeksiyonun etkeni ile yani antijen ile kaplıdır.

Mikrolept 8x12 olmak üzere 96 gözlüdür.

İlk göze negatif kontrol konur.

İkinci göze pozitif kontrol konur.

Diğer gözlere de serum sulandırıcısı ile 1/500 oranında sulandırılmış serumlar konur.

30 dk beklenir.

Wash buffer ile 4 defa yıkanır ve kurutulur.

Her göze konjugat eklenir.

30 dk beklenir.

Wash buffer ile 4 defa yıkanır ve kurutulur.

Her göze substrat eklenir.

15 dk beklenir.

Substratın üzerine stopper eklenerek, reaksiyon durdurulur.

ELISA reader da okutulur.

SONUÇ

Reader otomatik olarak renk değışikliklerini tespit eder ve bize antikor titresini verir. Böylece sürünün antikor titresi tespit edilir.

Hastalık durumu belirlenir.

Aşı zamanı belirlenebilir.

Yakın zamanda uygulanmış olan aşının sürüyü ne kadar koruduğı hakkında bilgi verir.

HEMAGLUTİNASYON TESTİ

Eritrositlerin serum ya da m.o. etkisiyle bir araya gelerek, kümeler halinde çökmeleridir. Pek çok bakteri ve viruslar; HA yeteneğine sahiptir. Burada olay bir ag-ab reaksiyonu değil; doğrudan doğruya mikroorganizmada bulunan ve eritrositlerdeki reseptörlere yapışma ve onları çöktürme özelliğidir.

MEKANİZMA: HA özelliğnde olan mikroorganizmaların duyarlı eritrositlerin yüzeylerine yapışma eğiliminde olduğı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda; HA özelliğı bulunan m.o.ların yüzeylerinde kısa ,çivi benzeri organeller bulunduğı gözlenmiştir. Bunların eritrositlerin yüzeylerindeki mukopolisakkarit içeren reseptör bölgelerine özgün olarak bağlandıkları saptanmıştır. HA sırasında pek çok virus partikülü duyarlı eritrosite etki eder. Virus 2 eritrosit arasında kalacak şekilde bağlanır.

Bu bağlanma sürekli değildir. Virus, salgıladığı Neuroamidase enzimi ile reseptör bölgelerini tahrip eder. Ve eritrositlerden ayrılır. Bu olaya ELUSYON denir. Ayrılmadan sonra eritrosit yüzeyindeki reseptörler tahrip olduğı için; aynı eritrosit ile aynı virus tekrar bağlanamaz. Ancak başka bir virus ile bağlanma olabilir. Çünkü eritrositler yüzeyinde her virus için ayrı bir spesifik reseptör bulunmaktadır.

AMAÇLARI :

etken varlığını saptamak

HI testinde kullanılacak olan virus ya da bakterinin HA ünitesini belirlemek.

KULLANILAN REAKTİFLER :

Yıkanmış Tavuk Eritrositi (YTE)

antijen

FTS

ÇABUK HA = LAMDA HA : virus yada bakterinin varlığını ortaya koymak için yapılır.

→ lamın üzerine → 1 damla Ag + 1 damla YTE → suspanse edilir → çökme varsa = HA +

YAVAŞ HA = TÜPTE/MİKROPLATE'TE HA : bu yöntemle virusun HA titresini de hesaplanır.

şüpheli virus log 2 tabanına göre sulandırılır.

bütün gözlere %2'lik eritrosit süspansiyonundan virus sulandırmalarına eşit miktarda konur. oda sıcaklığında 2 saat ya da 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakılır ve sonuçlar değerlendirilir.

DEĞERLENDİRME :

HA + → tüpün dibinde dantela tarzında irili ufaklı kümeleşme vardır.

HA - → düğme çöküntü oluşur.

HEMAGLUTİNASYON BİRİMİ (HB) : HA oluşturan en son sulandırma oranı, o virus için HA Birimidir.

HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON TESTİ = HI

HA yeteneğine sahip olan mikroorganizmaların bu yeteneklerini, bu mikroorganizmaya karşı oluşmuş spesifik ab. tarafından inhibe edilmesidir. Yani spesifik serum ile virus birleşerek, onun HA yeteneğini ortadan kaldırır.

AMAÇ :

HI özelliğindeki m.o.ların identifikasyonu
serumdaki antikorların titrelerinin ölçülmesi.

YAPILIŞI :

tüm gözlemlere FTS konur ve şüpheli serum log 2 tabanına göre sulandırılır.
serum sulandırmalarına eşit hacimde 4HB oranında sulandırılmış olan bilinen virustan ilave edilir.

37oC’de 45 dk inkubasyona bırakılır.

her göze virus+serum toplamı kadar %2’lik YTE ilave edilir.

37o’de 45 dk beklenip → sonuçlar değerlendirilir.

DEĞERLENDİRME :

HA meydana gelmesi bilinen virus ile ag nin birleştiğini yani bilinen virus ile şüpheli serum ab larının birleşmediğini gösterir. Dolayısı ile şüpheli serumda – bilinen virusa spesifik ab yoktur. HA (-) ise HI (+) tir. → düğme tarzındaki reaksiyonun görüldüğü son göz, tespit edilir. Ve 4 ile çarpılır. Bulunan rakam SERUM HI TİTRESİ’dir.

Uygulamanın adı	Kanatlı hastalıklarında Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanımı
Yapılacağı hafta	15
Uygulamanın temel hedefi	Kanatlı hastalıklarında Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanımı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Ticari PCR kitleri, primerler, enzimler, dNTP, Magnezyum Klorür, Tüpspor
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Temel olarak mekanizma yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak ,bir Thermo Cycler (Isı Düzenleyici) yardımıyla Dna replikasyonunu in vitro ortamda tekrarlanması sonucu dna nın çoğaltılmasını sağlamaktır.Bu mekanizma günümüzde moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarlarının sıkça kullandığı bir yöntemdir.

Genetik tanı, gen klonlaması , Babalık tayini ,Nokta mutasyonları analizi ,prenatal tanı da ve birçok diğer uygulama alanı olması nedeniyle çok önemli bir keşif olarak biyoloji biliminde yeni ufuklar açmıştır.

PCR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU)

Laboratuvar ortamında spesifik DNA dizilerinin; primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemidir Standart bir PCR Protokolü yoktur. Bileşenler çoğaltılacak DNA bölgesinin özelliklerine göre değişir.

KLASİK PCR: Hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü spesifik primerler kullanılarak termostabil DNA polimeraz yardımıyla uygulanan PCR çeşididir. Daha sonraki analizler için döngü sayısına göre üstel oranda artan düzeyde ürün elde edilir.Tipik bir PCR üç temel basamakta gerçekleşir:

*Denatürasyon:İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır(denatürasyon) .Çoğunlukla 94°C- 97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır.(İlk denatürasyon tek saykıl olarak 15 dakikaya kadar uygulanır)

*Annealing(Bağlanma):Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C- 60°C arasında 30-60 sn 'de gerçekleşir.(G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısısı 68°C'ye kadar artırılabilir)

*Elongasyon(uzama):Son aşamada ısı 72°C'ye kadar artırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30sn ile 3 dakika arasında değişir.

Termal saykılın bu üç basamağı her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve saykıl sayısına bağlıdır. 25-40 saykıl uygulanır.

Klasik PCR normalde sayısal (quantitatif) bir değerlendirme ölçüsü değildir fakat quantitatif dönüştürülür.Jel elektroforez de ürünler karşılaştırılarak veya most probable number (MPN) yardımıyla sonuca ulaşılır.MNP yönteminde ardarda seyreltmeler ve MNP hesaplayıcısı kullanılır. Tercih edilmeyen bir yöntemdir.Bir diğer yöntem de competitive (karşılaştırmalı) PCR'dir. Karşılaştırmada delesyon veya insersiyon taşıyan örneklerle (farklı uzunlukta bant oluştururlar) elde edilen ürün jel elektroforezde karşılaştırılır.

MULTİPLEX PCR: Klasik veya Real-time PCR'nin modifikasyonu ile iki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanır. Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir fakat her bir reaksiyonda çoklu primer setleri

kullanılır. Multiplex PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir. Fakat önemli derecede optimizasyon gerektirir. Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi, annealing ısılarının birbirine uygun olması, birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gibi bazı önemli şartları gerçekleştirilmesi gereklidir. Farklı primer çiftlerinin en iyi konsantrasyonlarının seçimi ve non spesifik amplifikasyonların önlenmesi birçok deneme gerektirir.

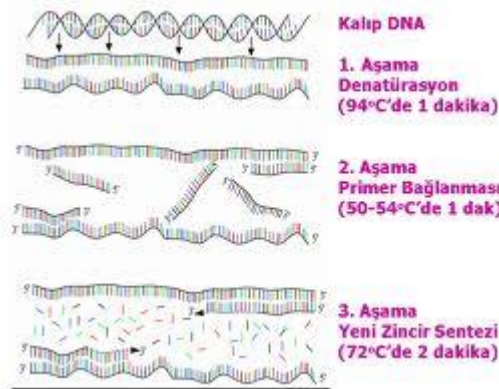
Reverse Transcription (RT)-PCR: mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır. Bu PCR çeşidinde bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. DNA primeri genellikle dT oligonükleotidi içerir (sadece hexamer yapıda thymidine nükleotidi) veya bir spesifik primerdir. dT messenger RNA' nın poli A kuyruğuna bağlanır (5' ucunda). dT hexameri tüm RNA çeşitlerinde bulunmakla birlikte dezavantajı 25°C de hibridize olması ve ortamda RNase inhibitörü bulunmaz ise çabuk bozunmasıdır.

Reverse transcription ve PCR amplifikasyonu bir veya iki aşamada uygulanabilir. Ayrı ayrı iki aşama halinde uygulanan RT-PCR daha hassas; tek aşamalı ise daha az kontaminasyon riski taşır çünkü tüp transkripsiyondan sonra açılmamaktadır. Hangi yöntemin kullanılacağına belirlenmesi bizim hassasiyetmi yoksa kontaminasyondan kaçınmak mı istediğimize bağlıdır. RT-PCR için birkaç çeşit reverse transcriptase enzimi vardır. Bir veya iki aşamalı reaksiyon seçimi ve daha sonraki aplikasyonlara göre enzim karakteristiği seçilir. Bu seçimde RNase aktivitesinin olup olmaması , iyon gerekliliği, dUTP ekleyebilme yeteneği ve optimum çalışma ısısı gibi etmenlerde önemlidir.

NESTED PCR: Kompleks mikrobiyal popülasyonlara ait hedef dizilerin spesifik bir şekilde amplifikasyonu klasik PCR yöntemleriyle bazen mümkün olmayabilir. Eğer amplifikasyonunu yapmaya çalıştığımız fragment uzunluğunda non-spesifik fragment(ler) amplifiye olmuş ise bu bizi yanlış sonuca götürebilir. Bundan kaçınmak için Nested PCR yöntemleri uygulanır. Bu metod ; klasik PCR'ye farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulamaktan ibarettir. İlk amplifikasyonda elde edilen ürün ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır. Kullanılan ikinci primer takımı diziye özgüdür.

KULLANILAN ENZİMLER: Termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz ve modifikasyonları neredeyse tüm DNA amplifikasyonlarında kullanılır. Diğer DNA polimerazlar da birbirlerinden nükleotid ekleme hızları, yarılanma ömürleri, ısı tolerans farklılıkları, eksonükleaz özelliklerinin olup olmaması gibi yönleriyle ayrılırlar. Hot-start DNA polimeraz enzimleri non-spesifik ürün oluşumunu engellemesi, yüksek ısılara dayanabilmesi, düşük annealing ısılarında da çalışabilmesi gibi nedenlerle tercih edilmektedir.

Enzim tipinin seçimini yapılacak amplifikasyonun koşulları belirler. Bir tek enzim kullanıldığı gibi kombinasyon da oluşturulabilir.



PCR aşamaları