



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KÜMES HAYVANLARINDA *MYCOPLASMA*
GALLISEPTICUM'UN TESPİTİ İÇİN LAM
AGLÜTİNASYON, ELISA VE PCR
TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Mümtaz Recep TEKKALAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Mayıs-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Mümtaz Recep TEKKALAN

Mayıs 2020

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜMES HAYVANLARINDA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*'UN TESPİTİ İÇİN LAM AGLÜTİNASYON, ELISA VE PCR TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Mümtaz Recep TEKKALAN

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emrah TORLAK

2020, 74 + xii Sayfa

Mycoplasma gallisepticum, kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde önemli bir hastalık etkeni olarak tanımlanmaktadır. Tavuklarda kronik solunum yolu hastalığına, hindilerde enfeksiyöz sinüzite sebep olmaktadır. Yüksek mortaliteye sahip olmamasına rağmen diğer hastalıklarla kombine olduğunda büyük maddi hasarlara yol açmaktadır. Bu nedenle, etkenin en kısa zamanda ve en doğru yöntemle tespit edilmesi önemlidir.

Bu çalışmada, 300 adet kanatlıya ait svab-doku örnekleri PCR testi, kan serumları ise serolojik testler için kullanılmıştır. Lam aglütinasyon testi ile 148 örnek pozitif, 152 örnek ise negatif olarak değerlendirilmiştir. ELISA testi ile 128 örnekten pozitif, 172 örnekten ise negatif sonuç elde edilmiştir. Svab-doku örneklerinin 180 adedinden *M. gallisepticum* spesifik DNA izole edilmiştir. Testlerin karşılaştırılmasında kullanılan Kappa metodunda, test sonuçları arasında iyi düzeyin üzerinde bir uyum saptanmamıştır. PCR pozitif örneklerin önemli bir bölümünü, trakeal svabların oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, hastalığın ileri döneminde yapılan PCR testleri için trakealardan svab alınmıştır.

Hastalık belirtileri devam eden 100 kanatlıdan 21 gün sonra tekrar trakeal svab ve serum örnekleri alınmıştır. Bu örnekler ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon testinde, 55 örnek pozitif, 45 örnek ise negatif olarak değerlendirilmiştir. ELISA testi ile 55 örnekten pozitif, 45 örnekten ise negatif sonuç elde edilmiştir. Svab-doku örneklerinin 75 adedinden *M. gallisepticum* spesifik DNA izole edilmiştir. Kappa metodu uygulandığında test sonuçları arasında önemli düzeyde uyum tespit edilmemiştir.

Elde edilen sonuçlar *M. gallisepticum* tespitinde sadece bir metot kullanılmasının yeterli olmadığını ve serolojik test metotları ile elde edilen sonuçların PCR ile doğrulanması gerektiğini ortaya koymuştur. PCR ile elde edilen sonuçlar, PCR testi için trakeal svabların tercih edilmesi gerektiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: ELISA, kümes hayvanları, lam aglütinasyon testi (LAT), moleküler mikrobiyoloji, *Mycoplasma gallisepticum*, seroloji, PCR

ABSTRACT

MS THESIS

COMPARISON OF SLIDE AGGLUTINATION, ELISA AND PCR TESTS FOR THE DETECTION OF *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* IN POULTRY

Mumtaz Recep TEKKALAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
OF NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Advisor: Prof. Dr. Emrah TORLAK

2020, 74 + xii Pages

Mycoplasma gallisepticum is defined as an important disease causative agent in poultry farming. It causes chronic respiratory disease in chickens and infectious sinusitis in turkeys. Although it does not have high mortality, when combined with other diseases, it causes great financial damage. For this reason, it is important to identify the agent in the shortest time and with the most accurate method.

In this study, swab-tissue and serum samples from 300 poultries were used for the PCR test and serological tests, respectively. According to the slide agglutination test, 100 serum sample was negative and 200 serum samples were evaluated as positive. ELISA test yielded positive results from 128 samples and negative results from 172 samples. *M. gallisepticum* specific DNA was isolated from 180 of the swab-tissue samples. In the Kappa method used for comparing the tests, there was no good correlation between the test results. It was determined that a significant part of the PCR positive samples consisted of tracheal swabs. Therefore, swabs from the trachea were taken for PCR tests in the progressive stage of the disease.

Tracheal swab and serum samples were collected 21 days later from 100 poultries with disease symptoms. In the slide agglutination test performed with these samples, 55 samples were evaluated as positive and 45 samples as negative. With the ELISA test, positive results were obtained from 55 samples and negative results from 45 samples. *M. gallisepticum* specific DNA was isolated from 75 of the swab-tissue samples. When the Kappa method is applied, there is no significant agreement between the test results.

The obtained results revealed that the results obtained with a single test method are questionable in the detection of *M. gallisepticum* and the results obtained with serological test methods should be confirmed by PCR. Results obtained with PCR showed, that tracheal swabs should be preferred for PCR testing.

Keywords: ELISA, Molecular Microbiology, *Mycoplasma gallisepticum*, Poultry, Serology, Serum Plate Agglutination (SPA), PCR

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, bilgisiyle yoluma ışık tutan, danışman hocam Prof. Dr. Emrah TORLAK'a teşekkür ederim. Moleküler Biyoloji ve Genetik anabilim dalı öğretim üyeleri; Doç. Dr. Ceyda Özfidan KONAKÇI, Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU ile İstatistik anabilim dalı öğretim üyelerinden kıymetli hocalarım Ülkü ERİŞOĞLU ve değerli eşi Murat ERİŞOĞLU'na saygılarımı sunuyorum.

Dört yıla yakın bir zamandır çalıştığım MG Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi arz ediyorum. Laboratuvar kurucusu Melih GÜLER, laboratuvar kurucu yöneticisi ve hocam Prof. Dr. Leyla GÜLER ve eşi Prof. Dr. Mehmet GÜLER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Geldiğim bu aşamada manevi olarak büyük katkılar sunan, iş arkadaşlarım Begüm Seher CANLI, Diler ŞAKIRZHANOVA, Mustafa SOYDEMİR ve Ceren BEKDİK'e yardımları için minnettar olduğumu bildiririm.

Her zaman olduğu gibi bugün de yanımda olan, ömrümü emanet ettiğim eşsiz aileme de sevgi ve saygılarımı sunuyorum.

Mümtaz Recep TEKKALAN
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TABLO DİZİNİ	xi
GRAFİK DİZİNİ	xii
ŞEKİL DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. <i>Mycoplasma gallisepticum</i> ve Özellikleri.....	3
2.1.1. Mikoplazmalar, Yaşam Formları ve Döngüleri.....	3
2.1.2. Gelişme Özellikleri.....	6
2.1.4. <i>Mycoplasma gallisepticum</i> 'un Genel Özellikleri.....	8
2.1.5. Klinik Belirtiler ve Hastalığın İlerleme Süreci.....	10
2.1.6. <i>M. gallisepticum</i> 'a Özgü İmmün Yanıt ve Oluşturulan Antikorların Yapısı.....	12
2.1.7. Hastalığın Eradikasyonu ve Tedavi Süreci	14
2.2. Kronik Respiratuvar Hastalığın Kanatlı Endüstrisine Etkisi	15
2.3. <i>Mycoplasma gallisepticum</i> Enfeksiyonlarının Diğer Hastalıklar İle İlişkisi .	16
2.4. <i>Mycoplasma gallisepticum</i> 'un Tespitine İlişkin Metotlar	17
2.4.1. Serolojik Yöntemler	17
2.4.2. Moleküler Yöntemler	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Serolojik Testler	26
3.1.1. Kan Serumu Örnekleri.....	26
3.1.2. Lam Aglütinasyon Testi	27
3.1.3. ELISA Testi	28
3.2. rPCR Testi	30
3.2.1. Örnekler.....	30
3.2.2. DNA İzolasyonu	31
3.2.4. DNA Amplifikasyonu	32
3.3. Sonuçların İstatistikî Analizi	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	36

4.1. Serolojik Test Sonuçları	36
4.2. rPCR Test Sonuçları.....	37
4.3. Test Sonuçlarının Karşılaştırılması	40
4.3.1. Test Sonuçlarının İstatistikî Karşılaştırması	41
4.4. Tartışma.....	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	74



SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

AI: Avian Influenza
aMPv: Avian Metapneumovirus
BHQ: DNA probuna ait quancher özellikli molekül
bp: Baz Çifti
CD: Farklılaşma Kümesi
CRD: Chronic Respiratory Disase
CV: Varyasyon Katsayısı
ÇSA: Çubuk Serum Aglütinasyon
C_T: Cycle of Threshold
EDTA: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAM: Carboxyflourescein
FTS: Serum Fizyolojik
g: Göreceli Santrifüj Kuvveti
HI: Hemaglütinasyon İnhibisyon
HRM: High Resolution Melting
IB: Infectious Bronchitis
ICC: İmmünohistokimyasal Boyama
Ig: İmmunoglobulin
IHC: İmmünohistokimyasal Boyama
IL: İnterlökin
ILT: Infectious Laryngotracheitis
IS: Enfeksiyöz Sinüzit
kb: Kilobaz
LOD: Tespit Limiti
MHC: Major Histokompatibilite Kompleksi
MIC: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MLST: Multi Lokus Sekanslama Tekniği
ND: Newcastle Disase
OD: Optik Dansite
OIE: Office International des Epizooties
PBS: Phosphohate Saline Buffer
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDRC: Kanatlı Teşhis ve Araştırma Merkezi
PPLO: Plorpnömoni Benzeri Organizma
PSA: Pleyt Serum Aglütinasyon
RAPD: Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
rPCR: Real Time PCR
Rpm: Rotation Per Minute
S/P: Serum/Pozitif Oranı
SPR: Yüzey Plazmon Rezonansı
TAMRA: DNA probunda bulunan quancher molekülü
TBE: Tris + Borik Asit + EDTA
TL: Toll-like
VKAE: Veteriner Kontrol Araştırma Enstitü

Simgeler

$^{\circ}\text{C}$: Santigrad Derece

CHCl_3 : Kloroform

$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$: Fenol

$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$: İzoamil Alkol

C_T : Cycle of Threshold

κ : Kappa Katsayısı

kDA: Kilodalton

L: Litre

log: Logaritma

M: Molar

MgCl_2 : Magnezyum Klorür

m_k : Molekül Kütlesi

Na_2HPO_4 : Disodyum Fosfat

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Sodyum Fosfat Monobazik Dihidrat

NaCl : Sodyum Klorür

nm: Nanometre

s: Saniye

σ : Standart Sapma

X: Solüsyon Yoğunluğu Katsayısı

μ : Mikro

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Kanatlılarda bulunan patojenik dört mikoplazma türüne ait bazı suşlar ve kaynakları.....	5
Tablo 3.1. Transport solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları.....	30
Tablo 3.2. rPCR testi reaksiyon karışımı.....	33
Tablo 3.3. rPCR testinde kullanılan sıcaklık profili.....	33
Tablo 3.4. Ortak oransal uyum oranı hesaplaması.....	34
Tablo 3.5. Test sonuçlarının değerlendirilmesinde κ katsayısının belirlenmesi için kullanılan taslak.....	35
Tablo 4.1. Erken dönem ELISA ve lam aglütinasyon test sonuçları için κ değerinin hesaplanması.....	42
Tablo 4.2. Erken dönem rPCR ve lam aglütinasyon test sonuçları için κ değerinin hesaplanması.....	42
Tablo 4.3. Erken dönem rPCR ve ELISA test sonuçları için κ değerinin hesaplanması.....	43
Tablo 4.4. İleri dönem ELISA ve lam aglütinasyon test sonuçları için κ değerinin hesaplanması.....	43
Tablo 4.5. İleri dönem rPCR ve lam aglütinasyon test sonuçları için κ değerinin hesaplanması.....	44
Tablo 4.6. İleri dönem rPCR ve ELISA test sonuçları için κ değerinin hesaplanması.....	44
Tablo 4.7. Erken dönem test sonuçlarına ilişkin κ değerleri.....	45
Tablo 4.8. İleri dönem test sonuçlarına ilişkin κ değerleri.....	45

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 3.1. Kan örneklerinin ait olduğu kanatlı türlerinin dağılımı.....	26
Grafik 3.2. Svab-doku örneklerinin dağılımı.....	31
Grafik 4.1. Serolojik testlerden elde edilen sonuçlar.....	36
Grafik 4.2. İleri döneme ait seroloji test sonuçları.....	37
Grafik 4.3. Doku ve svablardan elde edilen rPCR sonuçları.....	39
Grafik 4.4. Kanatlı türüne göre pozitif sonuçların değişimi.....	39
Grafik 4.5. Erken dönem rPCR sonuçlarına göre serolojik test sonuçları.....	40
Grafik 4.6. İleri dönemde rPCR sonuçlarına göre serolojik test sonuçları.....	41
Grafik 4.7. Hastalık belirtisi gösteren kanatlılara ait erken ve ileri dönem seroloji test sonuçlarının ortak oransal uyum grafiği.....	46

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. İnkübasyonun ikinci gününün sonunda 100 kat büyütme ile görüntülenmiş mikoplazma kolonileri.....	7
Şekil 2.2. <i>M. gallisepticum</i> 'un elektron mikroskobu ile görüntülenmiş yaşam döngüleri.....	9
Şekil 2.3. Hastalığın kanatlılarda oluşturduğu klinik belirtilere ait görsel.....	11
Şekil 4.1. rPCR testine ait sonuç.....	38

1. GİRİŞ

Mikoplazmalar ilk defa 1898 senesinde, sığırlarda bulaşıcı bir hastalık olan kontagiyöz ploröpnömoninin etkeni olarak izole edilmiştir. Solunum yollarına yerleşen bu etkenlerin tümü daha sonra ploröpnömoni benzeri organizma (PPLO) olarak tanımlanmıştır (Davis ve ark., 1973, Mendonça ve ark., 2000). Birçok canlı türünde tespit edilebilen mikoplazmalar, genellikle kanatlı ve büyükbaş hayvanlarda ciddi birer hastalık etkeni olarak kabul edilmektedir. *Mycoplasma gallisepticum*, kümes hayvanlarında önemli klinik belirtilere sahip olan patojenik bakteriyel mikroorganizmalardandır (OIE, 2008). *Mollicutes* sınıfı, *Mycoplasmataceae* ailesindedir ve Genus I'de yer almaktadır (Mercia, 2001). Bu grubun özellikleri arasında; 580 - 1350 kilobaz (kb) büyüklüğünde bir genoma sahip olmaları ve kolesterol bulunan, 37 °C bir ortamda kolaylıkla üremeleri bulunmaktadır (Kleven, 2003). Genetik materyallerinin yüzde 23 - 40 gibi düşük bir kısmını guanin ve sitozin nükleotitleri oluşturmaktadır (Parte ve ark., 2011). Zayıf moleküler yapısı ve bu yapıdan kaynaklı konakçıya aşırı bağımlılık nedeniyle son dönemlerde *M. gallisepticum* için prokaryotik parazit tabiri de kullanılmaktadır (Nicholas ve ark., 2016).

M. gallisepticum hindilerde önemli klinik sorunlara sebep olmakla birlikte tavuk, bıldırcın ve kazlarda da tespit edilebilen bir bakteridir. Bilhassa bıldırcınlarda ciddi defektlere yol açmaktadır. Kargalarda izolasyonu mümkün olmasa da perikardit ve pnömoni etkeni olduğu düşünülmektedir. Kronik solunum yolu hastalığının (CRD) etkeni olan *M. gallisepticum*'un tespiti ve erken teşhisi, ilgili klinik belirtilerin azalmasında ve ortadan kaldırılmasında önem taşımaktadır. Hastalığa ait klinik belirtilerin tümü aynı dönemde ortaya çıkmamakta ve dönemsel olarak değişmektedir. Bu nedenle teşhiste metot farklılıkları oluşmaktadır (Çarlı, 2018). Metotların seçimi, uygulama yöntemi ve sıralaması hastalığın hangi döneminde ne tür tedbirler alınacağına ilişkin bilgi vermektedir. Antibiyotik tedavisi, kümes dezenfeksiyonu ve hastalığın eradikasyonu tümüyle bu bilgilere bağlıdır. *M. gallisepticum*'un tespitinde birçok metot kullanılmaktadır. Bu metotlardan en yaygın olanları kültürel, serolojik, DNA biyosensör tekniği ve moleküler metotlar olarak sınıflandırılabilir (İnanç, 2008). Klasik kültürel mikrobiyolojik metotlar ile izolasyon ve identifikasyonun zahmetli ve zaman alıcı olmasından dolayı alternatif metotlara olan ilgi artmıştır (Luttrell ve ark., 2001; Gürbüz,

2008). Serolojik metotların yaygınlaşması ve moleküler metotların ortaya konması ile kültürel yöntemler geri planda kalmışlardır. (Salisch ve ark., 1998).

Kontrol laboratuvarları tarafından serolojik metotlar sıklıkla tercih edilirken, moleküler metotların kullanımı henüz serolojik metotlar kadar yaygınlaşmamıştır (Özgün, 2015). Bununla birlikte, serolojik metotların hassasiyet ve spesifikliklerinin düşük olduğu bildirilmiştir (Kleven ve ark., 1998). Bu nedenle moleküler yöntemlerin teşhis çalışmaları içerisine dâhil edilmesi gerekmektedir. Kanatlılarda CRD etkeninin moleküler tespitinde PCR reaksiyonu, mikroerey teknolojisi veya DNA parmak izi tekniği kullanılmaktadır (Lauerman, 1998). Yeni DNA mikroerey tekniği ile aynı anda kırk çeşit mikoplazma tipi ayırt edilebilmektedir (Bottinelli ve ark., 2017). Sahada yaygın olarak, DNA amplifikasyonu yönteminde real time PCR (rPCR) tekniği tercih edilmektedir (Çarlı, 2018).

Bu tez çalışmasında, kümes hayvanlarına ait farklı örneklerde *M. gallisepticum* tespiti amacıyla; serolojik test metotları arasında yer alan lam aglütinasyon ve enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) tekniği ile PCR tekniği metot performansı açısından karşılaştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Mycoplasma gallisepticum* ve Özellikleri

2.1.1. Mikoplazmalar, Yaşam Formları ve Döngüleri

Mikoplazmalar, bakteriler içerisinde bilinen en basit mikroorganizmalardandır. (Esendal, 2002). Boyut ve şekil olarak diğer bakterilerden daha farklı yapıda olmalarının yanı sıra çok küçük bir genom organizasyonuna sahiptir (Ferguson-Noel, 2013; El Aziz ve ark., 2014). Bu durum mikoplazmaların konakçıya aşırı bağımlı olmasına yol açmakla birlikte adaptasyon geliştirmesini de sağlamaktadır (Pitcher ve ark., 2005; Doosti ve ark., 2011). Sığır mikoplazmasının keşfinden 28 yıl sonra hindi iç organlarında, 1936 senesinde de bir tavukta hastalık etkeni olarak tespit edilmişlerdir (Charlton ve ark. 1996). Tüm bu çalışmalar, 1905 yılında epizootik pnömoenteritis sanılan hastalıkların etkeninin *M. gallisepticum* olduğunu göstermiştir (Dodd, 1905; Ley, 2008). Bu keşiflerin akabinde mikoplazmanın sebep olduğu solunum hastalıklarının tümüne CRD ismi verilmiştir (Delaplane ve ark., 1943; Shah, 2018).

Mikoplazmalar, plazma membranı haricinde hücre duvarına benzer bir yapıya sahip olmamaları ile diğer prokaryotlardan ayrılırlar. Bahsi geçen hücresel bileşene sahip olmaları için peptidoglikan sentezini engelleyerek bakteriyel üremeyi sonlandıran penisiline ve sefalosporin grubu antibiyotiklere dayanıklılık gösterirler (Kleven, 2003). Antibiyotiklere gösterdikleri dirençten dolayı L form bakterilere benzemektedirler ve 4.5×10^{-5} mm por çapında filtrelerden geçebilmektedirler (Razin ve ark., 1984). Yüksek tuz şoku, alkol ve organik solventler ile antijenlerine uygun antikor komplementlerine karşı dayanıksızdır. Birçok farklı hücre şekli gösterebilirler ve 3.10^{-4} - 8.10^{-4} mm gibi çok küçük boyutlara sahiptirler. Yuvarlak, uzun uçlu ya da dallı şekillerde bulunmaktadırlar. 70-80 angström kalınlığında olan üç katlı membranlarında, steroller bulunur, kolesterol barındıran ortamlarda çoğalırlar ve 37 °C optimum çoğalma sıcaklığıdır (Esendal, 2002, Kleven 2003). Membran lipidlerini etkileyen benzen, dietiler ve asetona karşı dayanıksız oldukları bilinmektedir (Bloor, 1920).

Mikoplazmalar kısa zamanda hızla diğer kanatlılara bulaşabilmekte ve sorunlara neden olabilmektedir. Kümes içinde yayıldığı gibi kümesler arasında ve yırtıcı kuşların iyi muhafaza edilmeyen yemlerden hastalık taşınması ile dağılımı mümkün olmaktadır (Arda, 2002). Mikoplazmaların canlı vücuduna yerleşimi ve hayatta kalma mekanizması

halen tam olarak anlaşılammamakla birlikte esasen akciğerlerde çoğalmakta, nazal, bronşiyal ve trakeal dokularda da tespit edilebilmektedirler (Papazisi ve ark., 2003). Kronik ve büyük boyutlara ulaşan lezyonlara sebep olmakla birlikte öksürme, akıntı ve hareket kabiliyetlerinde azalma gibi bir hastalık tablosu göstermektedirler (Gondal ve ark., 2015, Gharibi ve ark., 2018). Etkenin sürüye bulaşması durumunda, uzun süre terk etmediği bilinmekte ve tedavisi diğer bakteriyel mikroorganizmalara göre daha zor olmaktadır. Tedavi sürecinde hastalık kalıcı olma eğilimi göstermektedir. Enfeksiyonla mücadelede antibiyotik tedavisinin önemi olmakla birlikte aşılama teknikleri de yer tutmaktadır. Mevcut mikoplazma aşıları etkili olmasına karşın bazı türlerde saha suşlarına karşı yeterli olamamaktadır (Alessandri ve ark., 2005).

Kanatlılarda bulunan en önemli mikoplazma türlerinden olan *M. gallisepticum*, bu etkenlerin en hızlı yayılan ve kolaylıkla sürüleri terk etmeyen türü olarak bilinmektedir. *M. gallisepticum*'un yanı sıra *M. synoviae* da çok ciddi solunum ve eklem problemlerine sebep olmaktadır. Bazı çalışmalarda *M. synoviae*'nin eradikasyonunun, *M. gallisepticum*'un eliminasyonu kadar önemli olduğu ifade edilmiştir (Landman, 2014). Bugüne kadar yapılan mikoplazmozis çalışmalarında sinovit ve sinüzit etkeni olan bu iki bakterinin mikoplazma grubunun en patojenik mikroorganizmaları olduğu ortaya koyulmuştur (Buim ve ark., 2009). Bu patojenisite ve hastalığa karşı oluşan duyarlılık kanatlıların türlerine ve tiplerine göre değişmektedir. Leghorn tip tavuklarda vücut sıcaklık kontrol mekanizmasının olması ve yüksek sıcaklıklara karşı tolerans göstermesi bakteriyel etkenlere karşı doğal bir direnç sağlamaktadır (Bohren ve ark., 1982). Buna karşın hindilerde *M. gallisepticum* ve *M. meleagridis* diğer kanatlılardan daha kuvvetli reaksiyonlara sebep olmaktadır (Esendal, 2002).

Tablo 2.1. Kanatlılarda bulunan patojenik dört mikoplazma türüne ait bazı suşlar ve kaynakları (Wang ve ark., 1997)

<i>M. gallisepticum</i>	A5969	Massachusetts Üniversitesi – Referans suş
	S6	Kaliforniya Üniversitesi – Tipik suş
	F2F10	Kaliforniya Üniversitesi – Aşı suşu
	96-3179	Auburn Üniversitesi – Saha suşu
	Y9	Georgia SEPRL, USDA – Varyant suş
	Y10	Georgia SEPRL, USDA – Varyant suş
	K810	Georgia PDRC – Aşı suşu
	K-1501-S	Georgia PDRC – Aşı suşu
	K1486-S1	Georgia PDRC – Aşı suşu
	K-2221 (383T)	Georgia PDRC – Aşı suşu
93-49	Connecticut Üniversitesi – Deneysel enfeksiyon	
93-55	Connecticut Üniversitesi – Deneysel enfeksiyon	
<i>M. meleagridis</i>	E-2	Kaliforniya Üniversitesi – Aşı suşu
	vic-44	Kaliforniya Üniversitesi – Aşı suşu
	vic-60	Kaliforniya Üniversitesi – Aşı suşu
	RY 39	Kaliforniya Üniversitesi – Referans suş
<i>M. synoviae</i>	K3416	Georgia PDRC – Aşı suşu
	K3505	Georgia PDRC – Aşı suşu
	K3181	Georgia PDRC – Aşı suşu
	Alabama	Georgia PDRC – Aşı suşu
	K-1415	Georgia PDRC – Aşı suşu
	WVU1853	Kaliforniya Üniversitesi – Referans suş
	FMT	Auburn Üniversitesi – Saha suşu
	96-8228	Auburn Üniversitesi – Saha suşu
<i>M. iowae</i>	K-1805	Kaliforniya Üniversitesi – Referans suş
	NL-12	Kaliforniya Üniversitesi – Referans suş
	695	Kaliforniya Üniversitesi – Referans suş
	96-624-8	Kaliforniya Üniversitesi – Saha suşu
	96-633-13	Kaliforniya Üniversitesi – Saha suşu
	96-793-4	Kaliforniya Üniversitesi – Saha suşu

2.1.2. Gelişme Özellikleri

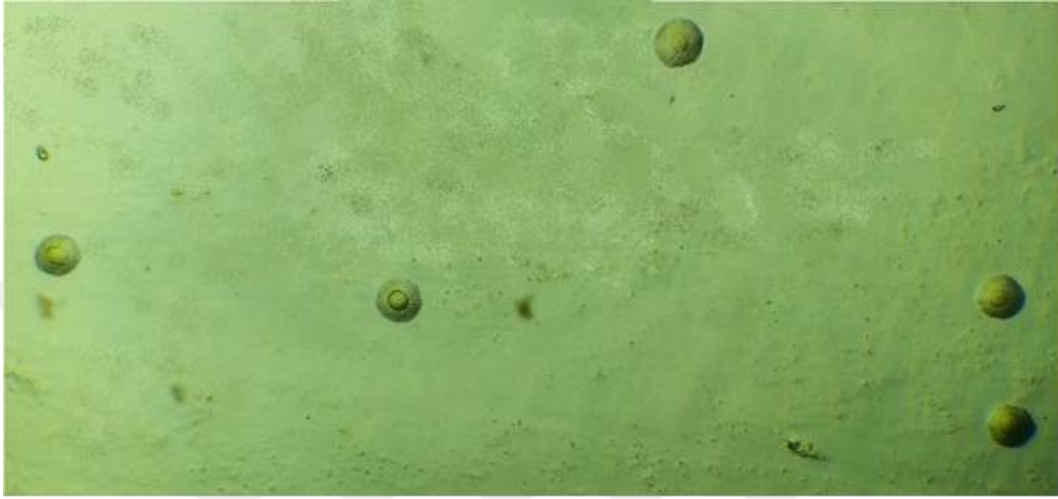
Mikoplazmaların kanatlı türünden bağımsız olarak solunum sistemine çok ciddi bir adaptasyonu mevcuttur. Hatta embriyolara *M. gallisepticum* suşu enjekte edildiğinde, gelişim esnasında hava keselerine yerleştiği tespit edilmiştir (Tan ve ark., 2016). Bu özelliğine ek olarak canlı vücudundan tamamen elimine edilemediği için yeni aşılama sonrası dahi nüksetme imkanı vardır (Hofacre ve ark., 2001). Mikoplazmalara ait türlerin tamamı hastalık yapıcı özellikte değildir. Hastalığa neden olanları ise konakçılarda şiddetli immün yanıtı sebep olurlar. Bu zayıf mikroorganizmalar antibiyotiklerle vücuttan kolaylıkla elimine edilebilmektedir. Buna karşın tedavi sonrası klinik belirtilere sebep olmayacak kadar az sayıda mikoplazma bazı dokularda kalabilmektedir. Bu durum, daha sonra gerçekleşebilecek kronik enfeksiyonların temelini oluşturmaktadır. (Donnelly, 2004).

Mikoplazma türleri, direkt temas, aşılama ve dış etkenler yolu ile kanatlılarda enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Raviv ve ark., 2013). Ayrıca bireyler ve kullandıkları ekipmanlar aracılığı ile aşılama işleminden bağımsız olarak horizontal, enfekte yumurtalar ile in ovo bulaşma gösterebilmektedirler (İzgür, 1983; Çarlı, 2018). Kıyafetlerde oluşabilecek bir kontaminasyon halinde dördüncü güne kadar canlı kalabileceği bildirilmiştir (Ley, 2003). Deri döküntüleri, ter ve vücuttan salgılanan asidik maddeler nedeniyle insan cildinde bir veya iki gün yaşayabildiği not edilmiştir (Tan ve ark., 2016).

Yapılmış çalışmalarda etken izolasyonu için % 10 CO₂ içeren inkübasyon ortamının uygun olduğu bildirilmiştir. Buna karşın, % 5 CO₂ içeren inkübasyon ortamlarında da yeterli üreme sağlanabilmektedir. Normal şartlarda iki günlük bir inkübasyon süresinin sonunda yüz kat büyütme ile besiyeri yüzeyinde zayıf bir ışık yardımıyla görüntülenebilir koloniler oluşmaktadır. Bununla birlikte, kolonilerin gözle görülebilir olduğu inkübasyon süresi 7 güne kadar çıkabilmektedir (Ferguson-Noel ve ark., 2011; Khalifa ve ark., 2013).

Klasik kültürel mikrobiyolojik çalışmalar sonucunda L form bakterilere benzedikleri görülmektedir. Ekim yapıldığı alanın içine ve etrafına dairesel olarak yayılarak koloniler oluştururlar. Koloni etrafında oluşan dairesel yayılmaya bir merkez yükselti eklenmektedir. Besiyeri içine de nüfuz eden mikoplazmalar raptiye benzeri bir yayılma göstermektedirler (Arda, 2011). Mikroskop altında bakıldığında; koloni

morfolojisine genellikle sahanda yumurta benzetmesi de yapılmaktadır. Klasik kültürel metotlar ile mikoplazma izolasyonu ve sonrasında biyokimyasal test ile doğrulama çalışmaları bir aya kadar uzayabilmektedir. Bu işlemin sonunda tiplendirme için floresan antikor ve immünoperoksidaz testleri gibi uzmanlık gerektiren pahalı testler uygulanmakla birlikte sınırlı bir kullanım alanı bulunmaktadır (Salisch ve ark., 1998).



Şekil 2.1. İnkübasyonun ikinci gününün sonunda 100 kat büyütme ile görüntülenmiş mikoplazma kolonileri

Etken enfeksiyon boyunca konakçının besin alımından metabolik olaylarına kadar tüm yaşam döngülerine müdahale edebilmektedir. Özellikle glikoz metabolizması ve glikolizde *M. gallisepticum* ve *M. bovis*'in önemli sayılabilecek düşüşlere sebep olduğu ispatlanmıştır (Masukagami ve ark., 2017). Enerji mekanizmasının ele geçirilmesi kanatlılarda uyuşukluğa ve vücut direncinin düşmesine yol açmaktadır. Dirençsiz türler ve küçük yaştaki kanatlılarda hastalık daha etkin rol oynamaktadır. Özellikle civciv ölümlerinde *M. gallisepticum* etkinliğinin yüksek olduğu rapor edilmiştir. Enfeksiyon düzeyi yüksek olan sürülerde genellikle ölüm yumurtadan çıkma safhasında olmaktadır. Yaşamını sürdüren civcivlerde ise *M. gallisepticum* enfeksiyonlarının teşhisinde ELISA testlerinin daha çok maternal antikorlar ile reaksiyon vermesinden dolayı lam agltinasyon veya DNA temelli testlerin kullanımı önerilmektedir (Güler, 1992).

Mikoplazmalar konakçıda protein sentezinde ve miRNA indüklenmesinde görev almaları açısından önemli bakterilerdendir. Kanatlılarda az miktarda ya da hiç sentezlenmeyen proteinlerin üretilmesinde etkili olmaktadır (Arda ve ark., 2002). Ayrıca konakçı hücrelerinde *gga-miR-146c* isimli miRNA'nın hedef olarak seçtiği

MMP16 bölgesi aracılığı ile apoptozu inhibe ederek proliferasyonu arttırdığı ve NFκB yolağını aktifleştirdiği bilinmektedir (Zhang ve ark., 2019). Ürettikleri protein ve diğer metabolik kaskat ürünleri ile kanatlı vücudunda çeşitli birincil odaklar oluştururlar. Erken teşhis yoluyla bu odakların kurutulması durumunda sürü içindeki yaygın mikoplazmozisin önüne geçilmesi mümkündür (Gökçelik., 2008).

2.1.4. *Mycoplasma gallisepticum*'un Genel Özellikleri

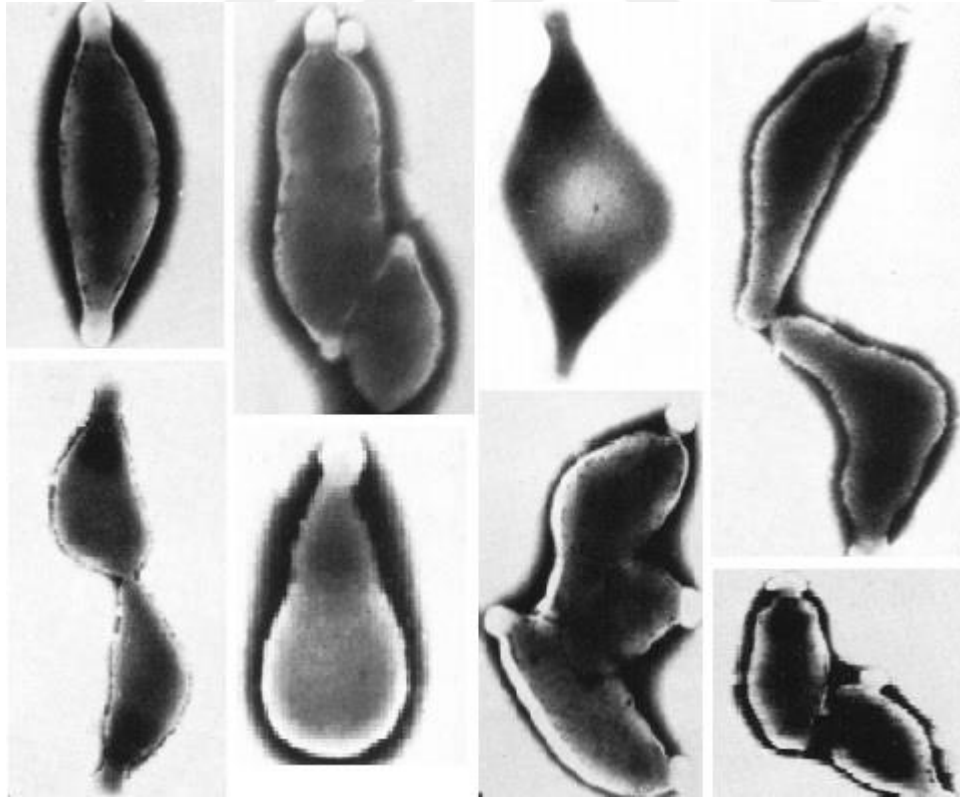
M. gallisepticum, tedavisi zor hastalıklara sebep olmakla birlikte en az tavuklar kadar bu etkenden etkilenen hindilerde de enfeksiyöz sinüzite yol açmasıyla bilinmektedir (Arda, 2011; Bokhari ve ark., 2007). Diğer kanatlılarda ise kronik solunum yolu hastalığı etkeni olarak izole edilmektedir (Başkaya, 1981). Türler içerisinde yumurtacı, damızlık ya da et üretiminde kullanılan kanatlılarda da ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır (Çarlı, 2018). Önceleri sadece tavuk ve tavuk benzeri canlılarda (Galliformes) olduğu düşünülmekteyken, uçabilen kuşlardan da izole edilmiştir. Buna örnek verilebilecek ilk vaka 1994 yılında yabani ispinozlarda *M. gallisepticum* tespit edilmesidir (Raviv ve ark., 2013). Sadece bu kanatlı türünde değil birçok yabani kuş türünde etken olarak izole edilmiştir ve filogenetik çalışmaları yapılmıştır. (Dhondt ve ark., 2014).

Endüstriyel üretimde, kümeslerdeki yumurtaların hızlıca alınması ve anne-yavru ilişkisinin hemen kesilmesi nedeniyle horizontal geçişler sınırlandırılmaya çalışılmaktadır. Yabani hayvanlarda ise bu durum farklılaşmaktadır. Doğa şartlarından dolayı anne çoğunlukla taşıyıcı konumda bulunmaktadır. Bluebird gibi 18. güne kadar anneye aşırı bağımlı olan kanatlılarda herhangi bir kaynaktan alınan mikoplazma besin yoluyla horizontal olarak geçebilmektedir. Yabani hayvanların taşıdığı mikoplazmalar hem endüstriyel üretim hattındaki kanatlılarda enfeksiyona sebep olabilmekte hem de gelecekteki varlıklarını olumsuz yönde etkilemektedir (Gowaty ve ark., 2015).

M. gallisepticum kanatlılarda solunum sistemine yerleşmekte ve hareket kabiliyetine sahip olmaması nedeniyle burada kalmaktadır. Üreme, yaşam ve diğer birçok metabolik süreçleri için birkaç organelle ihtiyaç duymaktadır. Bunun dışında diğer yaşamsal faaliyetlerini, konakçı vücudunda üretilen organik bileşikler ve metabolitler aracılığı ile sağlamaktadır. Göstermiş oldukları bu fonksiyonel özelliklerin

mekanizması, yapılan genomik ve metabolomik çalışmalar ile belirlenmiş ve tanımlanmıştır (Masukagami ve ark., 2017).

M. gallisepticum'u diğer mikoplazmalardan ayrılan bir özelliği ise bir ya da iki uç kısmında kabarcık şeklinde “miksovirüs benzeri çıkıntılar” olarak adlandırılan ve bakterinin tutunmasını sağlayan yapılara sahip olmasıdır (Esendal, 2002, Timms ve ark., 1974). *M. gallisepticum* hücresel farklılıklarının yanı sıra, antijenik özellikleri açısından da diğer mikoplazma türlerinden ayrılmaktadırlar. Membranlarında bulunan kendine has proteinlerin tespiti için serolojik metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte özellikle lam aglütinasyon testinde yanlış pozitif sonuçlara neden olan çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir. Çapraz reaksiyon gösteren mikoplazma türlerine *M. imitans* örnek gösterilebilir. Lam aglütinasyon testi ile *M. gallisepticum* olarak tanımlanan bazı izolatlar, PCR'a tabi tutulduğunda negatif sonuç elde edilmiştir. Yanlış negatif sonuçlara neden olan izolatların genomu sekanslandığında farklı bir mikoplazma türü olduğu anlaşılmıştır. Bu tür, *M. gallisepticum*'u taklit etmesi özelliğinden dolayı *M. imitans* olarak isimlendirilmiştir (Bradbury ve ark., 1993).



Şekil 2.2. *M. gallisepticum*'un elektron mikroskobu ile görüntülenmiş yaşam döngüleri. Bakterilerin uç kısımlarında “mixovirus like” çıkıntılar görülmektedir (Morowitz ve ark., 1966)

Kanatlılarda bakteriyel hastalık etkenleri arasında *M. gallisepticum* önemli bir yer tutmaktadır. *M. gallisepticum*'un sebep olduğu kronik solunum yolu hastalığı canlıyı oldukça duyarlı hale getirmektedir. Viral hastalıklardan olan enfeksiyöz avian influenza (AI), bronşit (IB) ve laringotrakeitis (ILT) etkenlerinin mikoplazma ile aynı anda bulunması enfeksiyon tablosunu şiddetlendirmektedir. Mikoplazmalar genellikle lokal enfeksiyonlara sebep olmasına karşın, kimi zaman konakçının durumuna bağlı olarak farklı dokulara yayılış göstermektedirler. Sürü içinde yayılımı önlemek için ilk alınan önlemlerden birisi yumurtaların imha edilmesidir. Bu önlemin alınmasında enfeksiyonun boyutu çok büyük önem taşımaktadır (Tan ve ark., 2016). Önleyici tedavi seçenekleri de bu aşamada kullanılmaktadır. Bununla birlikte çoğu bilim insanı ve işletmeci *M. gallisepticum*'un tek başına canlı üzerinde fazla etkisi olmadığını düşünmektedir. Ev ispinozları üzerinde yapılmış bir çalışmada bu durumun tedavi sürecine ilişkin ihmalleri de beraberinde getirdiği not edilmiştir (Osnas ve ark., 2015).

2.1.5. Klinik Belirtiler ve Hastalığın İlerleme Süreci

M. gallisepticum'un neden olduğu enfeksiyonların klinik bulgularının görülmesi için dokuz ila yirmi bir gün gerekmektedir. Konakçılardaki hastalık etkeninin görünür etki yapabilmesi için hedef dokularda kolonizasyonu gerekmektedir. *M. gallisepticum* sıklıkla olan hava keselerine sitadezyon molekülü de denilen yapışma molekülleri ile yerleşim sağlamaktadır. Bazı çalışmalarda bu mekanizma aracılığıyla yerleşim için tercih edilen ilk yerin hava keseleri olduğu gösterilmiştir (Sarkar ve ark., 2005; Ammar ve ark., 2016). Kanatlı türü, konakçı yaşı, ortam koşulları, diğer enfeksiyonların etkileri ve gaita kaynaklı amonyak miktarı bu sürenin artmasına ya da azalmasına sebep olabilmektedir (Çarlı, 2018).



Şekil 2.3. Hastalığın kanatlarda oluşturduğu klinik belirtilere ait görsel (Bu çalışma için, hastalık belirtileri gösteren kanatlılar fotoğraflanmıştır)

Hastalık trakeal ve bronşiyal dokuların şişmesinin akabinde konjunktivit ve kazeus eksudatların solunum yolunu kaplaması ile seyretmektedir (Bokhari, 2007). *M. gallisepticum* broylerlerde dördüncü ila sekizinci hafta arasında klinik belirtiler gösterir. Daha ağır seyretmekle beraber mortalite ve morbiditesi daha yüksektir (Ley, 2003). Broyler sürülerde de karakteristik özellikler genel klinik tabloya benzemektedir ve temel belirtiler trakeal tıkaçlarla seyreden öksürük ve burun akıntılarıdır (Branton ve ark., 1997). Bunun yanı sıra yumurtacı sürülerde bu özellikler belirgin bir şekilde gözlenmemekle birlikte ölüm vakalarında artış gerçekleşebilmektedir (Stipkovits ve ark., 1996). Ayrıca kanatlarda büyümenin azalması ve sürülerde bir araya toplanma eğilimi olduğu bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2009).

M. gallisepticum'un neden olduğu hastalıkların etkisi canlının vücut direncine göre değişmektedir. Yabani kuşlarda genellikle kış ve sonbahar aylarında enfeksiyon daha yaygın olmakta ve uzun sürmektedir (Altizer ve ark., 2004). Bu durum soğuk aylarda metabolik faaliyetlerin yavaşlaması ve direncin azalması ile açıklanabilir. Bazı araştırmacılar hastalığın kronik seyretmesini konakçının vücut direncinin düşüklüğü ile açıklamaktadır (Papazisi ve ark., 2003; Gerchman ve ark., 2011; Ammar ve ark., 2016). Uzun süren enfeksiyonlar iç organlarda iltihap oluşumuna sebep olmaktadır ve kalp ile

karaciğer en çok etkilenen organlardır. Karaciğer dokusu bütünlüğünü kaybetmekte ve kalp üzerinde önemli lezyonlar oluşmaktadır. Diğer dokularda da deformasyona yol açmaktadırlar. Klinik belirtilerin görüldüğü kanatlıların derhal sürüden ayrılması ve eliminasyon programı oluşturulması tavsiye edilmektedir (Abbas ve ark., 2018).

Kontrollü yumurta enfeksiyonu sonrası civcivlerde cücelik, ayaklarda kıvrılma ve kafa yapısında belirgin şişlikler görüldüğü bildirilmiştir. Karaciğerin soluk olduğu ve bir miktar büyüdüğü, dalağın ise yeşile çaldığı raporlanmıştır (Tan ve ark., 2016). Hastalıktan en çok etkilenenler genç gruplardır. Etken yumurtadan çıkmış civcivlerde sık görülmesine de yarka dönemindeki kanatlıları ciddi bir biçimde hastalığa sürükleyebilmektedir (Seifi ve ark., 2012). Annenin etkeni taşıması durumunda, civcivlerde 18. güne kadar maternal antikorlar tespit edilebilmektedir (Tan ve ark., 2016). Etkenin horizontal geçiş prevalansına dair kapsamlı bir araştırma yapılmamıştır (Levisohn ve ark., 2000).

2.1.6. *M. gallisepticum*'a Özgü İmmün Yanıt ve Oluşturulan Antikorların Yapısı

M. gallisepticum konakçı dokularını enfekte ettikten sonra canlı hareketi ve organ devinimleri ile yayılım göstermektedir. Konakçıda yerleştiği doku ile sistemlerde, geçirgenliği ve iletim hızını arttırarak çoğalma göstermektedirler (Schmid-Hempel, 2009). Buldukları dokuda, lokal bağışıklık sistemi aracılığı ile oluşturulan inflamasyon bu mekanizmanın zayıflatılmasını sağlamaktadır. (Sharma, 1994; Ashley ve ark., 2012). İnflamatuar etki, mikoplazmaların permeabiliteyi arttırması ile bir süre sonra yetersiz kalmaktadır. Uzun süren enfeksiyonlarda ise konakçının direnç mekanizması kırıldığından enfeksiyon tablosu da giderek ağırlaşmaktadır (Vinkler ve ark., 2018).

Bağışıklık sistemi canlı vücudunda çeşitli organlar aracılığı ile faaliyet göstermektedir. Sistemin iki önemli elemanı olan bursa fabricius ve timüs dokularından hücreler üretilmektedir. Memelilerde bursa fabricius'un yerini kemik iliği almaktadır (Arda, 2011). T ile B hücreleri bu primer dokulardan ikincil organlara yerleşirler. Hümmoral tip bağışıklıkta B, hücresel olanda ise T hücreleri görev alır. En büyük mücadelenin trachea ve akciğerlerde olduğu, dokularda oluşan hasar nedeniyle anlaşılabilir (Özdemir ve ark., 2008). Eliminasyon aşamasında hem hücresel

hem de hümmoral yanıt aynı anda gerçekleşebilmektedir. T lenfositlerin mekanizmasında, özellikle akut aşamada; CD8'in daha fazla işlev gördüğü, CD4'ün ise enfeksiyon sonrası üçüncü haftaya kadar sabit kaldığı görülmüştür (Gaunson ve ark., 2000).

M. gallisepticum'a karşı geliştirilen immün yanıt neticesinde özellikle trakeal dokuda inflamatuvar maddelerin arttığı belirlenmiştir. Toll-like (TL) reseptör tepkilerinin önemli ölçüde yükseldiği bilinirken, TL40, TLR15 veya IL1 ile sitokin ve kemokin üretiminin trakeal dokuda yoğunlaştığı tespit edilmiştir (Majumder ve ark., 2014). Bu bilgilerin ko-patojenik hastalıkların mekanizmasının anlaşılmasında da önemli rol oynayacağı bildirilmiştir. Patojen mikroorganizmalara ek olarak viral etkenlerin de bu kapsam içinde olduğu kabul edilmektedir (Canter ve ark., 2019).

Hümmoral bağışıklık sonucunda kanatlı vücudunda çeşitli immünoglobulinler (Ig) oluşmaktadır. Western Blot tekniğinin kullanıldığı bir çalışmada kontrollü enfeksiyona tâbi tutulmuş kanatlılarda; ilk 21 günde Ig'lerin M ve A tipi tespit edilirken sonraki süreçte G tipleri görülmüştür (Ellenkany ve ark., 1998). Bu süreç aynı zamanda immünoglobülinlerde M, A ile G dönüşümüne de bir örnek olarak verilebilmektedir. *M. gallisepticum* enfeksiyonlarında ilk üretilen antikordardan olan immünoglobulin M'nin (IgM) lam aglütinasyon testi ile kan serumundan tespit edildiği bilinmektedir. (Roberts, 1969). İlerleyen süreçte ELISA testi ile de immünoglobülin G (IgG)'nin saptanması mümkün olmaktadır (Arda, 2002).

Hümmoral bağışıklıktan daha karmaşık bir sistem olan hücresel bağışıklığın temel elemanı T hücre mekanizmasının kanatlı tipine göre değişmediği görülmüştür. Hindilerde daha şiddetli klinik belirtilere yol açan *M. gallisepticum*'a karşı gelişen immün yanıtın aynı olduğu ispatlanmıştır. Hücresel ve hümmoral cevap mekanizmasındaki değişikliğin metabolizma ile alakalı olduğu bilinmektedir. Bu ağır klinik farklılığın ise tavuklarda kullanılan aşuların hindilerde etkili olamamasından kaynaklı olduğu ifade edilmiştir (Wijensurendra ve ark., 2017).

Son yıllarda *M. gallisepticum*'un ev ispinozlarında da iltihaplı immün yanıtı neden olduğu anlaşılmıştır. Diğer kanatlı immün sisteminin aksine immünoglobulin yerine interlökinlerle bağışıklık mekanizmasını çalıştırmaktadırlar (Vinkler ve ark., 2018). İnterlökinler (IL) savunma sisteminde önemli bir yer tutmakla birlikte natural killer (NK) hücre gelişiminde ve B hücrelerine ait bazı özelliklerin oluşmasında da rol oynamaktadırlar (Waldmann ve ark., 1999). Plazma hücrelerine dönüşümde ve hafıza

hücreleri oluşumunda olgun T lenfositler bu molekülü salgılamaktadırlar (Shafer-Weaver ve ark., 1996).

Hücrel ve hümmoral immün yanıtın yanı sıra kompleman sistemi denilen serum proteinleri aracılı bir bağışıklık kaskatı da mevcuttur. Serum proteinlerinin onda birini oluşturan bu kaskat mikoplazmalarla benzer bir şekilde damar geçirgenliğini arttırmaktadır. Bununla birlikte permeabilite kimi zaman ters etki yaparak konvertazlar oluşturabilmektedir. Bu yapılar her bir birimle birleştikçe farklı konvertazlara dönüşerek bakteriyi uzun süreli stres ve ardından şoka sokmaktadır. Opsonizasyon aşamasından sonra kaskat ilerleyip son aşamada lizis yolu ile hücreler elimine edilmektedir (Romagnani, 1994; Abbas ve ark., 2007).

2.1.7. Hastalığın Eradikasyonu ve Tedavi Süreci

M. gallisepticum enfeksiyonları, kolaylıkla yok edilememekte ve sürü içinde kaldıkça ölüm olgusunu arttırmaktadır. Bu nedenle öncelikli hedef ölümü durdurmak ve ticari kaybı olabildiğince sınırlandırmaktır (Gary, 2004). Mikoplazma tespit edilen kanatlılarda öncelikli tedavi, temizlik ve antibiyotik uygulamasıdır. Hasta kümeslerin sağlıklı kümeslerden ayrılmasıyla başlayan süreç; henüz enfekte olmamış kümeslerde gübre bandının temizlenmesi ve ardından antibiyotik uygulamasıyla devam etmektedir. Bu temizlik esnasında antibiyotik uygulaması yapılmamakta, antimikrobiyal tedavi süreci daha sonra gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalarda hastalığın eliminasyonu için genellikle tilmikosin, gentamisin ve taylozin kullanılmıştır (Garmyn ve ark., 2018). Solunum yollarında birikmesi ve hastalığın respiratuvar klinik etkilerini hafifletmesi nedeniyle enrofloksasin ve tiyamulin de tercih edilmektedir (Nascimento ve ark., 1999).

Kullanılan ya da kullanılması ihtimal dâhilinde bulunan antibiyotikler için MIC testi yapılması gerekmektedir. Bununla ilgili bazı çalışmalarda testin belirli zaman aralıkları ile saha suşlarına yapılması önerilmiştir (Gerchman ve ark., 2008). Bunun yanı sıra yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin büyük bir kısmının dozu belirlenmiş bir şekilde bulunmaktadır. Bu antibiyotikler içinde *M. gallisepticum*'un eliminasyonu için yapılan minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) testlerinde en iyi performans tiyamulin, spiramisin ve tilmikosinde ölçümlenmiştir (Younis ve ark., 2018). Bununla birlikte MIC testi mikoplazmalar için rutinde uygulanabilirliği kısıtlı bir yöntemdir.

Çalışma için saf mikoplazma izole edilmesi gerekmektedir. Bu da son derece naif ve zor üreyen mikoplazmalar için oldukça zordur (Hannan, 2000). Bu nedenle, daha kolay ve genel antibiyotik tedavi yöntemlerinin uygulanması tercih edilmektedir. Son zamanlarda mikoplazmaların makrolid grubundaki antibiyotiklere karşı dirençli oldukları gösterilmektedir. Bu grubun en önemli temsilcisi olan eritromisine oluşan direnç bakterinin sahip olduğu genetik yapıyla açıklanabilmektedir. Üç önemli gen grubu bu mekanizmanın temelini oluşturmaktadır. 23S ribozomal RNA'da (rRNA) oluşan transversiyon tipi mutasyonlar sonucu bu özellikle *M. gallisepticum* ile karakterize olmuştur (Ammar ve ark., 2016).

2.2. Kronik Respiratuvar Hastalığın Kanatlı Endüstrisine Etkisi

Mikoplazmalar tüm dünyada kanatlı hayvan yetiştiriciliği ve yumurtacılık endüstrisinde ciddi problemlere ve kayıplara neden olmaktadır (Zanella, 1998). Damızlık yetiştirme, yumurta ve et üretim tesislerinin sayılarındaki artış ile mikoplazma enfeksiyonları doğru orantı göstermektedir (Mukhtar ve ark., 2012) Sadece büyük işletmelerde değil bireysel yetiştiricilerin sürülerinde de *M. gallisepticum* oldukça yaygındır (Talha 2003). Ayrıca bireysel işletmelerin büyük işletmelere de *M. gallisepticum* bulaştırma ihtimalinin yüksek olduğu da kanıtlanmıştır (Jibrill ve ark., 2018).

Mikoplazmaların dört türü yapılmış olan çalışmalarda önemli görülmüştür. Kanatlılarda ciddi hastalıklara sebep olan bu dört tür *gallisepticum*, *synoviae*, *iowae* ve *meleagridis*'tir (Bradbury, 2001). Bu hastalıkların içerisinde en önemli olanları ise CRD, sinüzit ile sinoviyal enfeksiyonlardır (Sareyyüpoğlu, 2014). Ülkemizde yapılan çalışmalar doğrultusunda, kanatlılarda mikoplazma etkenlerinin bulunma sıklığının % 8.3 ile % 16.3 arasında seyrettiği ifade edilmiştir (Akan, 2008, Ülgen, 1991). Farklı yaş aralıklarındaki sürülerde *M. gallisepticum* enfeksiyonun yüzdesi değişmektedir. Damızlıklarda bu oranın düşük olduğu söylenebilmekle beraber yumurtacılar da verimin düşmesi, damızlıklardaki ölümlerden her zaman daha önemli görülmüştür (Ley, 2008)

Kanatlı yetiştiriciliğinde *M. gallisepticum* eradikasyonunda çeşitli stratejiler takip edilmektedir. Temizlik, imha, antibiyotik tedavisi ve aşı uygulaması bunlara örnek olarak verilebilmektedir. *M. gallisepticum*'un elimine edilmesinde inaktif aşuların yanı

sıra canlı aşılar da kullanılmaktadır (Evans ve ark., 2005). Bunun yanında, canlı aşılar daha önce aşılanmamış olan sürüler ile enfekte sürülerin laboratuvar testleri ile ayırt edilememesine yol açmaktadır. Bu durum eradikasyon ve kontrol programlarının uygulanması önünde bir engel oluşturmaktadır (Landman, 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hindilere uygulanmış bazı canlı aşuların enfeksiyon sonucu oluşan antikörlere nazaran anlamlı bir fark oluşturduğu ve iyi bir teknik olabileceği ifade edilmiştir (Wijesurendra ve ark., 2017). Antikör titresindeki bu değişiklik canlı aşuların dışında faktörlerle de mümkün olmaktadır. Yumurtalarda oluşan *M. gallisepticum* kalıntıları da benzer etkiyi oluşturabilmektedir (Khalifa ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar kültürel izolasyon temelli aşı üretiminin modifiye edilmesi sonucu transpozon mekanizması ile aşı üretilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir (Tseng ve ark., 2017).

2.3. *Mycoplasma gallisepticum* Enfeksiyonlarının Diğer Hastalıklar İle İlişkisi

M. gallisepticum kanatlı vücudunda önemli klinik belirtilere sahip olmakla birlikte mortalitesi düşük bir hastalık etkenidir. Diğer mikoplazma etkenleri ile aynı zaman aralığında bir arada bulunabilmektedir. Konakçı dokularına benzer tutunma özelliklerine sahiptirler (Balish ve ark., 2005). İmmünojenisitesi düşük aşular hastalığı tetiklemez, buna karşın viral etkenli aşular mikoplazmozis etkilerini arttırmaktadırlar (Whithear ve ark., 1996). Bakteriyel hastalık etkenleri kimi zaman mikoplazmalarla kombine olabilmektedir. *E. coli* enfeksiyonlarında *M. gallisepticum* bulaşması durumunda hastalık tablosu ağırlaşmaktadır (Bradbury ve ark., 1998).

Mikoplazmozisin ölümle sonuçlanmasında bir diğer faktör viral hastalık etkenleridir. Hastalığın klinik belirtileri diğer hastalıklara ait belirtiler ile benzeşmektedir. ND ve IB virüslerinin yalnız başına ya da kombine olduğu hastalıklarda hava kesesi lezyonları oluşmaktadır (Kleven ve ark., 2003). Bunun dışında, *A. paragallinarum* (koriza), avian metapneumovirüs (aMPv), *B. avium*, klamidya ve kriptosporidyum gibi etkenler de özellikle hindilerde önemli etkilere neden olmaktadır (Ferguson-Noel ve ark., 2016). Bu nedenle, mikoplazmozis, veba ve bronşit tanılarının spesifik testler ile gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

2.4. *Mycoplasma gallisepticum*'un Tespitine İlişkin Metotlar

Mikoplazmaların ve *M. gallisepticum* tespitinde klasik kültürel izolasyon, serolojik yöntemler, hücre boyamaları, floresan teknikleri ve moleküler metotlar kullanılmaktadır. Serolojik ve moleküler metotların haricindeki testler oldukça zor ve zahmetlidir (Yoder ve ark., 1991). *M. gallisepticum* tanısında bakteriyoskopik metotlardan olan immünohistokimyasal (IHC) ve immünohistokimyasal (ICC) boyama yöntemleri de yeterince bilgi vermektedir. Trakealardan yapılan bu boyamalar sonucunda en az serolojik metotlar kadar güvenilir metotlar oldukları ispatlanmıştır (Özdemir ve ark., 2019). Bu yöntemlerin dezavantajı ise yakın zamanda hazırlanmış antiserumların temininin zor olması ve uzun müddet muhafaza edilememesidir. Floresan testler bu nedenle yaygın olarak tercih edilmemektedir (Kesler ve ark., 2013).

2.4.1. Serolojik Yöntemler

Kültürel etken izolasyon metotlarının sonuçları çoğu kez serolojik metotlar ile elde edilen sonuçlar kullanılmadan anlamlandırılmaz ve yorumlanamaz (Kahya ve ark., 2010). Bununla beraber serolojik metotlar düşük hassasiyetleri ve yeterince spesifik olmamaları nedeni ile nihai teşhis için genellikle tek başlarına kullanılmamaktadırlar. Kanatlı örneklerinde *M. gallisepticum* tespitine yönelik bir metot karşılaştırma çalışmasında kültürel izolasyon, PCR, lam aglütinasyon, hemaglütinasyon inhibisyon (HI) testleri ile birçok ticari ELISA kiti değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar *M. gallisepticum* tanısında bir metoda bağlı kalınamayacağını ortaya koymuştur (Ferberwee ve ar., 2005).

Serolojik testlerin sonuçlarını kanatlılardaki antibiyotik kullanımı önemli ölçüde etkilemektedir. Antibiyotik kullanılan örneklerde sero-pozitifliğin ciddi olarak düştüğü ifade edilmektedir (Jordan ve ark., 1998). Tedavi sürecinin sonunda diğer mikoplazma türlerine karşı oluşturulan antikorlar, *M. gallisepticum*'a ait ELISA sonucunu değiştirmektedir. Bu nedenle, *M. synoviae* gibi diğer mikoplazma etkenlerinin *M. gallisepticum* tedavisinden önce; kanatlı sürülerinden elimine edilmesi gerektiği düşüncesi oluşmaktadır (Rajkumar ve ark., 2018).

2.4.1.1. Lam Aglütinasyon Testi

Lam aglütinasyon testinde esas amaç etkenin ya da oluşturduğu antikorun canlı vücudunda bulunduğunu ispat etmektir (Levisohn ve ark., 2000). Lam aglütinasyon testlerinde genellikle kontrol serumları kullanılmaktadır. Pozitif ve negatif olduğu bilinen iki serumun test sonucuna göre yapılan testin geçerliliği sağlanmaktadır (Shoaib ve ark., 2019). Lam aglütinasyon testleri *M. gallisepticum* antikorlarına özel antijenler ile gerçekleştirilmektedir. Pek çok özel boya maddesini de ihtiva eden bu antijenler, bakteriyel mikroorganizmaların kültürel metotlarla çoğaltılması yoluyla elde edilmektedir. En yaygın kullanılan antijenler, ilk defa 1961 yılında bir hindinin sinir sisteminden izole edilmiş S6 ismi verilen bir suştan hazırlanmaktadır (Zander, 1961). *M. gallisepticum* enfeksiyonlarında verilen ilk immün cevap immunoglobulin M antikorlarıdır. Bunları ise en erken dönemde tespit eden test yöntemi lam aglütinasyon testidir. Bu nedenle, hastalığın ilk dönemlerinde lam aglütinasyon yöntemi tercih edilmektedir. Uygun kontroller ile yapılan testlerde genellikle güvenli sonuçlar alınmaktadır. Tarama testlerinde ELISA ile birlikte en çok tercih edilen metottur. ELISA tekniği yaygınlaşsa da lam aglütinasyon testi olmadan değerlendirme yapma konusunda soru işaretleri mevcuttur (Levisohn ve ark., 2000).

Son zamanlarda immünohistokimyasal boyamalarda monoklonal antikorların poliklonal antikorlara tercih edilmesi gerektiği ifade edilmektedir (Yılmaz ve ark., 2011). Bu bilgi aslında lam aglütinasyon tekniğinin boyama çalışmaları için de bir temel oluşturduğunu göstermektedir. Antijenler de tıpkı bu boyamalarda olduğu gibi monoklonal antikorlarla hazırlanırlar ve spesifiklerdir. *M. gallisepticum*'un canlıda bu denli kronik olmasına sebep olarak, antijenik yapılarını değiştirmesi olarak ifade edilmektedir. (Grodio, 2013). Böylece immün cevapta çeşitli gecikmeler olurken enfeksiyon süresi uzamakta ve canlı vücudu buna adapte olmaktadır. Bu nedenle antijen üretim çalışmalarının güncel olması önem taşımaktadır.

2.4.1.2. ELISA

M. gallisepticum'un tespiti için yapılan lam aglütinasyon testinin kontrolü ELISA ile yapılmaktadır (Stipkovits ve ark., 1996). ELISA metodunun yanı sıra aynı amaçla HI testi de tercih edilmektedir. Bununla birlikte, HI testinin en önemli

dezavantajı antijene özgü spesifik antikorların çok zor bulunmasıdır. HI testinin dezavantajları nedeniyle ELISA testi lam aglütinasyon testi ile birlikte en çok tercih edilen test metodu olmuştur. Kolay uygulanabilmesi, iki saat gibi bir zaman aralığında sürüye ait genel durumun anlaşılmasını sağlaması, maliyetinin az olması ve genellikle güvenilir sonuçlar vermesinden dolayı kullanımı zamanla yaygınlaşmıştır. Serum örneklerinin yanı sıra, yumurta sarısından da ELISA testi ile *M. gallisepticum*'a özgü antikorlar tespit edilebilmektedir (Elfaki ve ark., 1992).

ELISA testi ile enfeksiyonun yedinci gününden sonra oluşan antikorların, 56 kDa boyutunda *M. gallisepticum* spesifik antijen ile kaplı mikropleytlerle saptanması mümkündür (Czifra ve ark., 1993). Buna karşın lam aglütinasyon testinin enfeksiyonun beşinci gününden sonra pozitif sonuç vermesi nedeniyle hastalığın erken safhasında ELISA'nın lam aglütinasyon testi kadar hassas olmadığı rapor edilmiştir (Talkington ve ark., 1985). Daha sonraki safhalarda yapılan çalışmalarda ELISA testinin duyarlılığının arttığı belirtilmiştir. Et tavukları, yumurtacı (layer) ve damızlıklarda yapılan bir çalışmada, en duyarlı serolojik test yönteminin ELISA olduğu da iddia edilmiştir (Esendal, 1994). Ekonomik bir yöntem olması ve temel tarama testlerinden biri olarak tercih edilmesi nedeniyle lam aglütinasyon testi ile kombine olarak uygulanması önerilmektedir (Kleven, 2003).

Kanatlılarda kullanılan ilaç tedavi yöntemlerinin ve önleyici tedbirlerin test sonuçları üzerinde etkili olduğu söylenebilmektedir. Ticari işletmelerde bu yolla *M. gallisepticum* antikor seviyesinin sabit tutulması ve ELISA testi için tüm kümesi temsil eden en az sayıda örneklem oluşturulması amaçlanmaktadır. Buna karşın bireysel yetiştiricilerde ise böyle bir çalışma olmadığından, *M. gallisepticum* prevalansı ve antikor düzeyi yükselmektedir. Hatta bireysel yetiştirmede kanatlılara ait antikor seviyesi, ticari yetiştirmeye nazaran iki katına kadar çıkabilmektedir (Jibrill ve ark., 2018). Klinik belirtilerde ve ölüm vakalarında artış olmadıkça, bireysel yetiştirmede tedavi yöntemleri sıklıkla kullanılmamaktadır. Bunun dışında ELISA testi ile elde edilen sonuçları etkileyen faktörlerin başında canlıdan canlıya Ig içeriğinin değişmesi gelmektedir. Kimi zaman serumdaki IgG değeri IgM miktarının iki ya da üç katına kadar çıkabilmektedir ve IgG'nin IgM'ye nazaran daha kalıcıdır (Arda, 2011).

ELISA testinde elde edilen pozitif sonuçların yüksek olduğu örnek gruplarında genellikle kültürel metotlarla izolasyon yapılabilmektedir (Jan ve ark., 2018). Bununla birlikte örneklerin tümü ELISA testi ile pozitif olarak sınıflandırıldığında dahi kültürel

metotlar ile bir izolasyon yapılması mümkün olmayabilir. Bu durum, antikor cevabı tamamen oluşuktan sonra izole edilebilecek bir bakteri hücrelerinin ortamda kalmamasıyla açıklanabilmektedir. Hastalığın geçirilmesinin akabinde antikorlar uzun dönem kanatlı vücudunda kalmaktadır. Buna karşın hücresel yapı uzun müddet bütünlüğünü korumayabilir. ELISA testi ile yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir ve olası yanlış pozitif sonuçları engellemek için monoklonal antikor, rekombinant antijen ya da yüksek oranda pürifiye edilmiş antijen kullanılabilir (Levisohn ve ark., 2000).

Klinik belirti olmayan kanatlılardan alınmış kan serumlarında sero-pozitiflik görülebilmektedir. Böylesi durumlarda sürünün izlenmesi ve halen klinik belirti görülmemesi halinde serolojik yöntemlerle teste devam edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle 30 gün sonra aynı kanatlılardan alınmış kan serumlarına yeniden ELISA testinin yapılması önerilmektedir (Arda ve ark., 2002). Bu bir aylık dönemin ardından serumda IgG miktarı artacağından dolayı ELISA testinin tercih edilmesi mantıklı olmaktadır. Daha erken dönemde antikorların tespiti için ELISA yerine lam aglütinasyon testi tercih edilmektedir. Mevcut ticari kitler genellikle antikor tespitine yönelik çalışmalar sonucunda üretilmektedir. Bununla birlikte antijen tespitine yönelik ELISA test kiti tasarımına yönelik çalışmalar mevcuttur (Morsy ve ark., 1991).

Serumlardan elde edilen test sonuçlarının tamamen güvenilir olduğu söylenemez. Hatta tek bir test sonucunun kesinlikle hastalığın klinik tablosunu açıklamaya yetmeyeceği birçok çalışmada ortaya konulmuştur (Kleven, 1998; Esendal, 2002; Kesler ve ark., 2013; Koyuncu, 2014). Bu nedenle, birden fazla serolojik test metodunun kullanılması ve değerlendirilmenin bu sonuçlar temel alınarak yapılması tavsiye edilmektedir. İki farklı serolojik test metodu kullanılmaması durumunda pozitif sonuç bilgisinin nasıl değişeceğine ilişkin çok sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Lam aglütinasyon testi ile negatif bulunan serumların ELISA ile test edilmesine gerek olmadığı ifade edilmektedir. Lam aglütinasyon testinde elde edilen pozitif sonuçların ise ELISA testi ile doğrulanması ve sonucun negatif bulunması durumunda PCR metodu ile kesin sonucun belirlenmesi önerilmektedir (Çarlı, 2018).

2.4.2. Moleküler Yöntemler

M. gallisepticum'un moleküler tespitinde klasik, real time, arbitrarily PCR olarak da bilinen DNA parmak izi (RAPD) ve high resolution melting (HRM) gibi teknikler kullanılmaktadır (Geary ve ar., 1994; Fan ve ark., 1995; Osman ve ark., 2009; Gondal ve ark., 2015). Moleküler yöntemler arasında diğerlerine nazaran daha kolay ve maliyetinin düşük olması nedeniyle PCR tercih edilmektedir. Geçtiğimiz yıllarda laboratuvarlar tarafından en yaygın kullanılan teknik klasik PCR'dı. Buna karşın klasik PCR'ın zaman alıcı olması, sonrasında sonuçların değerlendirilebilmesi için elektroforez aşamasına olan ihtiyaç ve kimi klinik belirti görülen örneklerde pozitif sonuca ulaşmada yaşanan zorluklar nedeniyle günümüzde real time PCR (rPCR) daha yaygın hale gelmiştir. rPCR çalışması hassasiyeti arttırmakla birlikte zaman konusunda da tasarruf sağlamaktadır. Moleküler yöntemlerin hassasiyeti bazen örnekleme, örnek hazırlama ve test esnasında çapraz kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (Arda, 2011).

M. gallisepticum tespitinde kültürel izolasyon yöntemleri zahmetli ve zaman alıcı olması nedeniyle geçmişteki kadar yaygın olmamakla birlikte halen kullanılmaktadır. Kültürel mikrobiyolojik yöntemler çok uzun zamandır yapıldığından ve teknik tüm hususlar detaylı olarak dökümanite edildiğinden dolayı altın standart olarak değerlendirilmektedir (Abd El Ghany, 2008). Buna karşın gelişen moleküler teknikler aracılığıyla saha ile aşı suşlarının ayrımı dahi gerçekleştirilmektedir (Eissa ve ark., 2009). Saha suşlarında ise primer ve sekonder enfeksiyonlarda oluşan kronik tabloda moleküler teknikler, kültürel tekniklere nazaran daha avantajlı olarak değerlendirilmektedir (Hawley ve ark., 2010).

PCR çalışmalarının önemli bir örneği olan HRM tekniği de son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. *M. gallisepticum* tespiti ve tiplendirilmesi amacıyla hedef DNA bölgelerinden biri olan pvpA geni için HRM özellikli PCR tekniği geliştirilmiştir. İran'da bu HRM tekniği ile tavuk, keklik ve tavus kuşlarında *M. gallisepticum*'a ait izole edilmiş 14 suşun tiplendirilmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Tavus kuşları gibi endemik olan türlerin hastalığın yayılması ve yeni enfeksiyonlar oluşturması konusunda işlev gördüğü kanıtlanmıştır. Saha ve aşı suşu için ayırım sağlanmış, nükleotit delesyonları ile sübstitüsyonları belirlenmiş ve suşlara ait filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Hashemi ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalarda, PCR testi sonrasında *M. gallisepticum*'un genetik materyalleri sekanslanmıştır. DNA dizilerinin ortaya çıkarılmasıyla, hastalığa ilişkin gen bölgeleri belirlenmiştir. Hava kesesinde oluşan lezyonlar ile solunum sistemi hasarlarının kimi gen bölgelerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Gen bölgeleri de sekanslanarak her bir genin fonksiyonu bildirilmiştir. Aşırı gen ekspresyonu sonrasında birçok miRNA ve proteinin arttığı tespit edilmiştir (Vinkler ve ark., 2018).

2.4.2.1. Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Nükleik asitlerin klasik yöntem ile saf bir şekilde elde edilmesi zaman alıcıdır. Klasik yöntem ile, bakteri hücrelerinden 24:25:1 oranında fenol (CHCl_3), kloroform ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) ve izoamil alkol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$) solüsyonu kullanılarak DNA izole edilmektedir. Her bir sıvı materyal bir fazı temsil etmekte ve organik bileşikler bu fazlardan alınarak saflaştırılmaktadır. Klasik ekstraksiyon ile oldukça düşük hacimde ekstrakt elde edilebilmektedir (Sambrook ve ark., 1989). Az miktarda DNA elde edilmesi, insan hatasına çok açık olması ve yeterli saflıkta DNA eldesinde yaşanan zorluklar klasik yöntemin öne çıkan dezavantajlarıdır. Günümüzde, yüksek verim ve uygulama kolaylığı nedeniyle modern ekstraksiyon kitleri daha yaygın kullanılmaktadır.

M. gallisepticum tespiti için DNA ekstraksiyonunda genellikle trakeal svablar kullanılmaktadır. Ölüm sonrasında dokular hızla parçalanma ve otoliz sürecine girmektedir. Bu esnada parçalanan hücrelerden bakteriyosidal maddeler açığa çıkmaktadır. Bu da ölü dokunun zamanla üzerinde yer alan mikoplazmaları elimine etmesi anlamına gelir (Gondal ve ark, 2015). Bu nedenle, svab örnekleri daima doku örneklerinden daha iyi sonuç vermektedir (Zain, 1995; Kesler ve ark., 2013; Gondal ve ark., 2015). Kimi çalışmalarda doğrudan doku örneklerinden DNA ekstraksiyonunun svab örneklerinden yapılan ekstraksiyondan daha iyi sonuç verdiği ifade edilmiştir (Cengiz ve ark., 2011). Bununla birlikte çalışmaların genelinde, trakeal svabların kullanılması konusunda hemfikir olunmuştur (Kesler ve ark., 2013; Koyuncu, 2014; Ball ve ark., 2020)

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, mikoplazmaların kanatlıların çeşitli dokularından izole edilebileceği ortaya konulmuştur (Radi ve ark., 2000; Grodio ve ark., 2008; Eissa ve ark., 2009; Yılmaz ve ark., 2011). Dokuların özellikleri ve örnek tipleri

ekstrakte edilen DNA miktarını ve saflığını önemli ölçüde etkilemektedir. *M. gallisepticum* izolasyonunda dokular kadar dokulardan alınan svablar da kullanılmaktadır. Doku örnekleri lizis enzimlerini içermesinden dolayı PCR sonuçlarını etkilemektedir. Dokulardan svab alınması bu durumun elimine edilmesini sağlamaktadır. Buna karşın, svab örneklerinde doymamış yağ asitleri ve diğer bakteriler de bulunabilmektedir. Bu moleküller ile kontaminant bakteriler PCR reaksiyonunda inhibisyona yol açabilmektedirler. Ayrıca svab örneği transport sıvısı içerisinde tutuldukça pH değişimleri ile asidik bir ortam oluşturmaktadır (Zain ve ark., 1995). Bu nedenle ekstraksiyon yapılacağıında svabların belli bir süre sonunda ya sıvıdan alınması ya da -20 °C'ta muhafaza edilmesi gerekmektedir (Öngör ve ark., 2009).

2.4.2.2. PCR

Kanatlı dokularından *M. gallisepticum* izolasyonunda PCR yöntemi kullanılmaktadır. Canlı vücudunda fagosite edilmiş hücrelerin ya da antibiyotik tedavisi uygulanmış canlılardan alınan örneklerde mikoplazmaların tespitinde PCR metodunun kullanılması önerilmektedir (Gondal ve ark, 2015). Kültürel metotlarda parçalanmış bir hücrenin besiyerinde üreme imkânı yoktur. PCR tekniğinde ise nükleik asitler parçalanmadığı sürece hücresel lizis ya da bakteriyel kontaminasyon olsa dahi pozitif sonuç elde edilebilmektedir (Öngör ve ark., 2009; Tomar ve ark., 2017).

M. gallisepticum enfeksiyonunun teşhisinde kullanılacak en önemli organ trakeler, en etkili yöntem ise rPCR olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda kullanılabilir tüm dokulardan örnekleme yapılması ve örneklerin oldukça düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesi de önerilmiştir (Özdemir ve ark., 2019). Örneklerin kısa süreli ve 4 °C'ta muhafazasında, PCR reaksiyonunu engelleyecek inhibitörler etkisini arttırmaktadır. Seyreltme metodu ile inhibitör konsantrasyonu düşürülerek pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu durum test edilen örnek miktarının düşürülmesi demektir. Bu nedenle, seyreltme ile inhibitör etkisinin azaltılması uygun bir uygulama olarak değerlendirilmemiştir (Çarlı ve ark., 2003, Mekkes ve ark., 2005). Örnek konsantrasyonunun düşürülmesi, hastalık belirtisi gösteren kanatlılardan *M. gallisepticum* izolasyonunu etkileyebileceğinden çok tercih edilmemelidir.

M. gallisepticum için yapılan PCR testlerinde, diğer çalışmalarda olduğu gibi özel DNA bölgeleri kullanılmaktadır. Kullanılan metotlarda ya türü temsil eden bölgeler ya da özel bir serotipi tespit etmeyi sağlayan değişken bölgeler tercih edilmektedir. *M. gallisepticum* teşhisi için *mgc2*, *pvpA*, *gapA* ya da *MGA_0309* gibi gen bölgeleri kullanılmaktadır (Indikova ve ark., 2013). Bu yolla yapılan PCR çalışmaları, bakteriyolojik izolasyona ihtiyaç duymaksızın tür tanımlamasına yardımcı olmaktadır (Hong ve ark., 2005). Yapılan sekanslama çalışmalarının sonucunda, bu protin kodlayan bölgelerin rutin PCR ve alignment analiz testleri yapılacak en önemli bölgeler olduğu gösterilmiştir. Bu bölgelerin tespitine yönelik rPCR metotları ile doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından en verimli sonuçlar elde edilmiştir (Ferguson-Noel ve ark., 2005).

Yapılan çalışmalarda aynı örnekler ile rPCR tekniğiyle klasik PCR'a nazaran daha fazla sayıda pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu durum iki teknik arasındaki hassasiyet farkı ile açıklanmıştır (Mekkes ve ark., 2005). Bu çalışmalarda, rPCR'da sıklıkla rastlanan, zayıf/yanlış pozitif sonuçlara kısmen aşı suşundan kaynaklı genetik materyallerin neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, sonuçların yorumlanmasında zayıf pozitif sonuçların elde edildiği örneklerin alındığı işletmeye ilişkin aşı bilgisine sahip olunmalıdır. Saha suşları ile aşı suşlarının ayrımı tüm hastalıklarda ortak bir problemdir. *M. gallisepticum* gibi çok sık aşılması yapılan etkenlerin ayrımı ise daha zordur (Ferguson-Noel ve ark., 2005). Son dönemlerde yapılan çalışmalar ile DNA zincirindeki küçük farklılıklardan yola çıkılarak aşı suşları ile saha suşları ayrılabilir (Ricketts ve ark., 2016). Aşı ve saha suşlarının ayrımında DNA parmak izi tekniği de kullanılmakla birlikte, saf kültür gerekliliği bu tekniğin kullanımını sınırlandırmaktadır (Hong ve ark., 2005).

rPCR'da termal döngü cihazında bulunan dedektörden algılanan sinyaller değerlendirilmektedir. Bu sinyallerin kaynağı prob adı verilen işaretli nükleotit dizilerinde bulunan floresan moleküllerdir (Heid ve ark., 1996). Prob dizisi bir ucunda karboksillenmiş floresan molekülü (örn, FAM) ve diğer ucunda tutucu olarak da bilinen quancher (örn, TAMRA, BHQ) molekülünü bulundurmaktadır. Amplifikasyon esnasında DNA polimeraz enzimi probu kestiğinden tutucu molekül floresan molekülünden uzaklaştığı için kanaldan verilen ışında kırılma oluşmaktadır. Her bir döngüde alınan sinyal, dedektör vasıtasıyla programa işlenmektedir. Pozitif örneklerde, dizinin uzatılması primer ve prob bölgesinden olduğu için sinyal elde edilmektedir

(Cacherill ve ark., 2001). Bazı çalışmalarda, direkt olarak amplifiye DNA'nın cihaz tarafından algılanması amacıyla SYBR Green boyası kullanılmaktadır. Bu boya maddesi özgül olmayan bağlanmalarda da ışığa gerçekleştirdiğinden son dönemlerde tercih edilmemektedir (Eischeid, 2011).



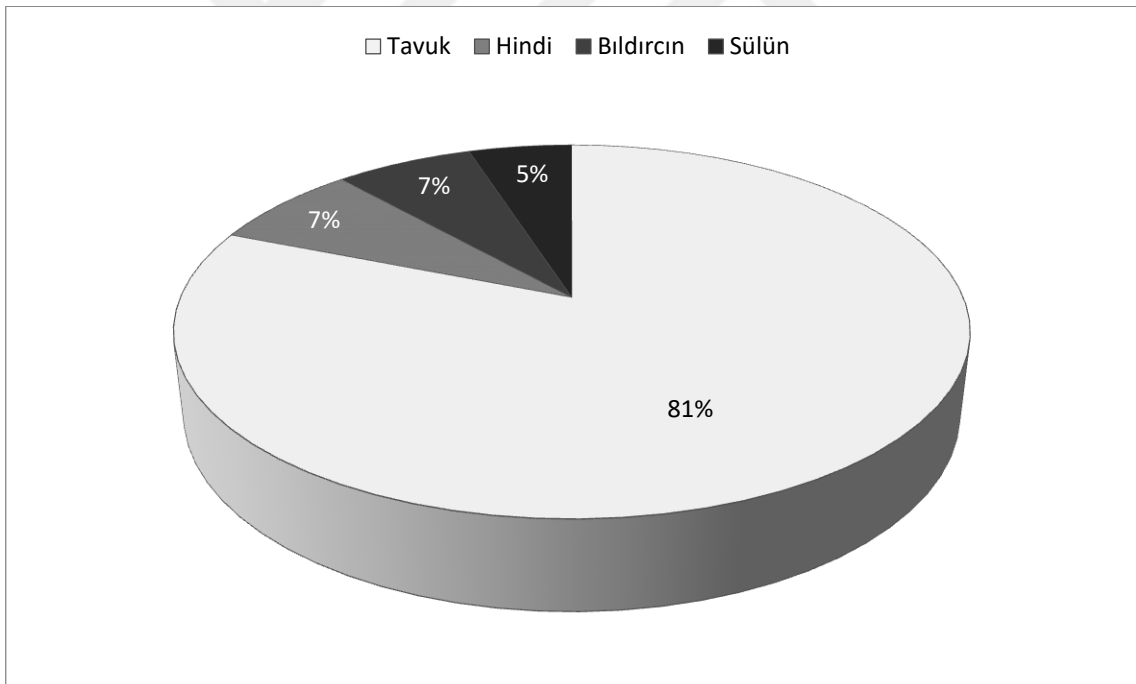
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Serolojik Testler

3.1.1. Kan Serumu Örnekleri

Bu çalışmada Konya, Afyonkarahisar, Niğde, Gaziantep, Ankara, Kayseri ve Malatya illerinde bulunan özel işletmelerden Veteriner Hekim kontrolünde alınan toplam 300 adet kan örneği kullanılmıştır. Bu kan örneklerinin ait olduğu kanatlı türleri Grafik 3.1.'de verilmiştir. Cıvcıvlerin kan serumlarında, yalnızca maternal IgG antikorları bulunduğundan dolayı ELISA testi ile daima pozitif sonuç elde edilmektedir ve cıvcıvlerde *M. gallisepticum* enfeksiyonlarının tespitinde lam aglütinasyon testi tercih edilmektedir (Güler, 1992; Kempf ve ark., 1998). Bu nedenle, bu çalışmada yalnızca yetişkin hayvanlara ait kan örnekleri kullanılmıştır.

Grafik 3.1. Kan Örneklerinin Ait Olduğu Kanatlı Türlerinin Dağılımı



Kan örnekleri hayvanların kanat altından ya da boğazı kesilmek suretiyle ana atardamardan alınmıştır (Özgün, 2015). Alınan tam kan örnekleri 22 °C sıcaklıkta 1 saat ve daha fazla hacimde serum elde etmek amacıyla devamında 37 °C'ta 30 dakika inkübe edilmiştir (Erdağ ve ark., 1988). İnkübasyon sonrası kan örnekleri 400 g devirde 5 dakika santrifüje tabi tutularak serumları elde edilmiştir. Bu işlemin sonunda yeterli miktarda serum elde edilememesi durumunda, iğne öze ile tüpün iç çeperi çizilerek 600

g devirde 3 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Ayrılan serum örnekleri bir pipet yardımıyla alınarak steril tüplere aktarılmıştır. Elde edilen serum miktarının lam aglütinasyon ve ELISA testleri için yeterli olmaması durumunda lam aglütinasyon testi sonrasında santrifüj aşaması tekrar edilmiştir (OIE, 2018).

Yapılan çalışmalar, uygun şartlarda muhafaza edilmeyen serumların yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlara neden olduğunu ortaya koymuştur (Kappe ve ark., 1993). Serum, plazma ve tam kan örneklerinin ancak birkaç gün stabil kalması nedeniyle örneklere koruyucu ilave edilmesi ya da düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Wasowics ve ark., 1993; De Cock ve ark., 2019). Bu çalışmada kullanılan ELISA testi dilüsyon solüsyonunun protein stabilizatörü ve koruyucu içermesi nedeniyle ilave bir koruyucu kullanılmamıştır ve serum örnekleri öncelikle lam aglütinasyon testine tabi tutulmuştur. Lam aglütinasyon testi sonrasında, serumlar ELISA testinin kit içeriğinde bulunan dilüsyon solüsyonu ile 1:50 oranında dilüe edilerek 4 °C'ta muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Lam Aglütinasyon Testi

Pleyt serum aglütinasyon testi olarak da bilinen lam aglütinasyon testi, kan serumlarının boyalı antijenler ile test edilmesi prensibine dayanmaktadır (Kesler ve ark., 2013). Sürü tarama çalışmalarında kullanılan lam aglütinasyon testinde boya solüsyonlarından kaynaklı yanlış pozitif sonuçların ayırt edilebilmesi için diğer serolojik test metotları ile birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir (Glisson ve ark., 1984). Muhafaza koşullarından kaynaklı yanlış pozitif sonuçların elimine edilebilmesi için lam aglütinasyon testi örnek alımı sonrasında 24 saat içinde gerçekleştirilmiştir (Sydenstricker ve ark., 2006; Dhondt ve ark., 2014).

Lam aglütinasyon testi için kullanılan pembe ve mavi renkli boya içeren antijenler sırasıyla Charles River Laboratories (Wilmington, ABD) ve Soleil (Libourne, Fransa) firmalarından temin edilmiştir. Farklı renkte boya ihtiva eden antijenlerin seçilmesinin nedeni, sonuçların değerlendirilmesi esnasında olası karışıklıkların önlenmesidir. Her iki test antijeninde pozitif sonuç alınması durumunda örnekler *M. gallisepticum* pozitif olarak kabul edilmiştir. Tek bir antijenle yapılan testte pozitif ya da her iki antijen ile yapılan testte şüpheli sonuç elde edilmesi durumunda, test Pendik

Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsünün (İstanbul, Türkiye) üretmiş olduğu antijen ile tekrarlanmıştır.

Test öncesinde kan serumları ve antijenler 22 °C'ta 20 dakika inkübe edilmiştir. Test beyaz bir pleyt üzerinde eşit hacimde (20 µL) kan serumu ve antijenin karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir (Allan ve ark., 1974). Karıştırma sonrasında pleyt iki dakika boyunca aralıklı olarak rotasyon hareketine tabi tutulmuştur (Erdağ ve ark., 1988; OIE 2018). İki dakika sonra pleyt % 15 eğime sahip bir konumda 30 saniye bekletilerek solüsyonların dairesel bölümün aşağısında toplanması sağlanmıştır. Bu alan önce gözle, daha sonra bir büyüteç yardımı ile gözlenerek lam aglütinasyon test sonuçları değerlendirilmiştir. Pozitif sonuçların düzeylerine ilişkin standart olarak belirlenmiş bir değerlendirme bulunmamaktadır (Gökçelik, 2008; Dhondt ve ark., 2014; OIE 2018). Bu nedenle, doğrudan gözle görülemeyen, buna karşın büyüteç yardımıyla tespit edilebilen aglütin varlığında sonuçlar zayıf pozitif olarak sınıflandırılmıştır. Daha kolay ayırt edilebilen aglütin varlığında ise sonuçlar pozitif olarak sınıflandırılmıştır.

3.1.3. ELISA Testi

ELISA testi hastalığın ileri evrelerinde sentezlenen IgG antikorlarının tespiti için kullanılan bir metottur (OIE 2018). *M. gallisepticum*'a spesifik antikorların tespiti ve sürü taramalarında son dönemlerde yaygın olarak ticari ELISA test kitleri kullanılmaktadır (Gökçelik 2008; Özgün, 2015). Ticari ELISA testlerinde kanatlı türü spesifik olmayan antikorları ihtiva eden konjugatlar kullanıldığından dolayı kanatlı türü fark etmeksizin test sonuçlarının elde edildiği rapor edilmiştir (OIE, 2018).

Viral bir etken olmaması, kanatlı türüne göre sonucun değişmemesi nedeniyle mevcut ticari ELISA kitleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (OIE, 2018). Buna karşın, *M. gallisepticum* antikorlarının kısa sürede değişime uğraması ve başka hastalık etkenleri ile bir arada bulunması nedeniyle ELISA testi ile yanlış pozitif sonuç alınabilmektedir (Kleven ve ark., 1998). Bu nedenle, ELISA testi sonuçlarının ticari test kiti marklarından bağımsız olarak farklı testler ile doğrulanması tavsiye edilmektedir (Koyuncu, 2014).

Bu çalışmada, ELISA testi için kullanılan ticari test kiti Biochek (Gouda, Hollanda) firmasından temin edilmiştir. ELISA test kiti içeriğinde *M. gallisepticum*'a

spesifik inaktif antijenlerle kaplı mikrolakaların yanı sıra dilüsyon solüsyonu, anti-chicken antikoruna ihtiva eden konjugat, liyofilize formda substrat (Paranitrofenilfosfat), substrat çözündürme sıvısı, stop solüsyonu, yıkama solüsyonu ve stabilize edilmiş pozitif ve negatif serum örnekleri bulunmaktadır. Kit içeriğine ilave olarak, test geçerliliğinin değerlendirilmesinde kullanılan optik yoğunluk değerinin elde edildiği referans serum kit üreticisinden (Biocheck) temin edilmiştir.

Test edilecek serum örnekleri, mikrolaka ve solüsyonlar 22 °C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonrasında, serumlar steril bir mikrolakanın kuyucukları içinde dilüsyon tamponu ilavesi ile 1:50 oranında seyreltilmiştir. Seyreltme sonrasında mikrolaka kuyucuklarındaki içerik bir plaka karıştırıcı (IKA; Deutschland, Almanya) ile 15 dakika karıştırılmıştır. Mikrolaka kuyucuklarına pozitif ve negatif kontrol serumları, referans serum ve seyreltilmiş serum örnekleri ilave edilmiştir. Kontrol ve referans serumları ve her bir serum örneği için iki adet kuyucuk kullanılmıştır. Örnek serumları kuyucuklar içinde dilüsyon solüsyonu ile 1:10 oranında yeniden seyreltilmiştir.

Mikrolakalar plaka çalkalayıcı üzerinde on dakika, sonrasında inkübatörde 22 °C sıcaklıkta 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu ile dört kez yıkanmıştır. Yıkama sonrasında her bir kuyucuğa kullanıma hazır konjugat solüsyonu ilave edilmiştir. Konjugat ilavesi sonrasında mikrolaka 20 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilmiştir ve yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Yıkama sonrasında her bir kuyucuğa hazırlanan substrat solüsyonundan ilave edilmiştir ve mikrolaka 22 °C'da 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki reaksiyon kullanıma hazır stop solüsyonu ilavesi ile durdurulmuştur. Stop solüsyonu ilavesi sonrasında her bir kuyucuktaki optik yoğunluk bir plaka okuyucu (Biotek; Vermont, ABD) ile 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen optik yoğunluk değerleri kit üreticisi tarafından sağlanan bir yazılıma (Biocheck Software) aktarılmıştır. Bu yazılım vasıtası ile tanımlanmış optik yoğunluk değerlerine göre test geçerliliği ve sonuçları değerlendirilmiştir (Steel ve ark., 1980).

3.2. rPCR Testi

3.2.1. Örnekler

rPCR testi için kan örneği alınan hayvanların trakea, palatine fissure ve kloaka dokuları ile bu dokulardan alınan svablar kullanılmıştır. Svab ucu larinksin giriş bölümünden trakeanın iç yüzeyine kadar tüm çepere temas edecek şekilde sürülmüştür. Canlı hayvanlarda trakeal sürüntülerin yemle karışması rPCR reaksiyonunu olumsuz etkilediğinden dolayı palatine fissuredan svab alınmıştır (Branton ve ark., 1984). Kanatlılardan alınan doku ve svabların dağılımı Grafik 3.2.'de verilmiştir. Alınan svab ve doku örnekleri, sıvı faza *M. gallisepticum*'ların geçişi için transport solüsyonuna (PBS) konulmuştur (Silveria ve ark., 1996). Bu solüsyon aynı zamanda svab ucunun ıslatılması ve bu daha fazla miktarda örnek elde edilmesi için kullanılmıştır (Zain ve ark., 1995). Dokuların dekompozisyonu ve svabların homojenizasyonu için de kullanılan transport solüsyonunun muhteiyatı Tablo 3.4.'te verilmiştir:

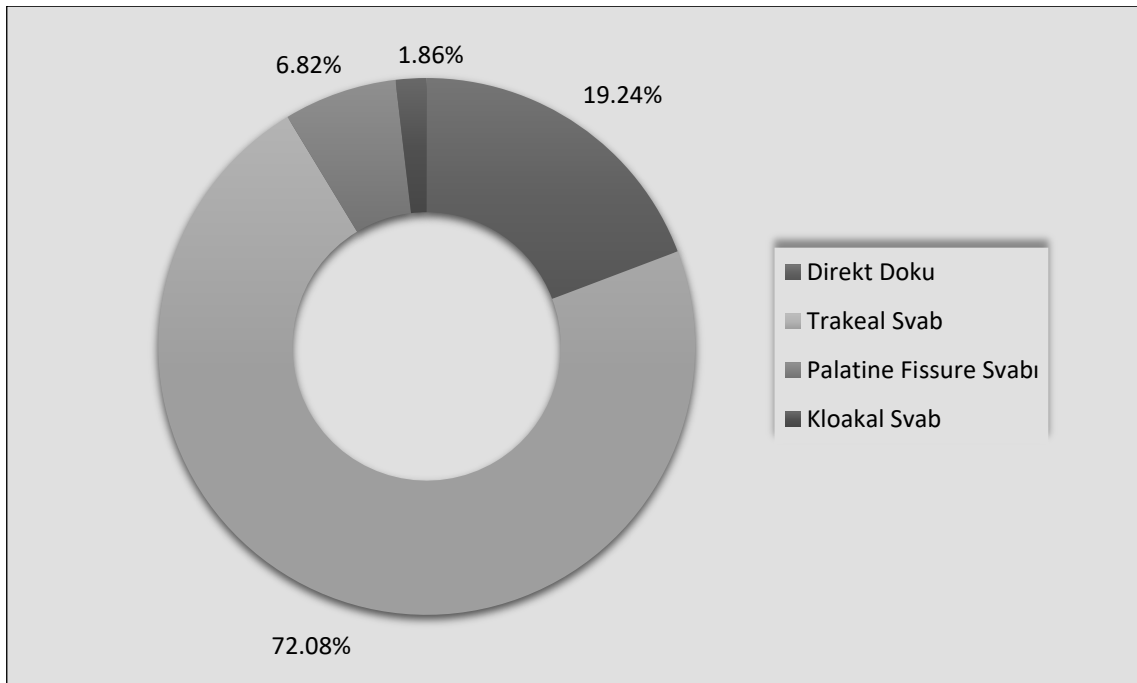
Tablo 3.1. Transport solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktarı
Sodyum Klorür (NaCl) m _K : 58.44 g/mol	8.5 g
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄) m _K : 141.96 g/mol	1.28 g
Sodyum Fosfat Monobazik Dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O) m _K : 156.02 g/mol	0.156 g
Ultra Saf Su	995 mL (1 L'ye tamamlamak için)

Transport solüsyonu kütlece %0.85 NaCl, %0.128 Na₂HPO₄, %0.0156 NaH₂PO₄.2H₂O (Merck; Darmstadt, Almanya) ihtiva etmektedir (Gürbüz, 2008; Kesler ve ark., 2013). Sodyum tuzları kullanılmadan bir transport solüsyonu hazırlanmak istendiğinde serum fizyolojik (FTS) yeterli olmaktadır. Transport solüsyonunun içinde bulunan farklı bir madde, reaksiyonu inhibe edebilmektedir (Gibb ve ark., 1997). Bu

nedenle, svablar transport solüsyonu dışında herhangi bir solüsyon kullanılmadan ve mikoplazma kültürü yapılmadan rPCR'a tabi tutulmuştur.

Grafik 3.2. Svab-doku örneklerinin dağılımı



Svab-doku örnekleri transport solüsyonuna konulduktan sonra 15 saniye vorteks ile karıştırılmış ve 4 °C'ta 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası doku-svab örnekleri 30 saniye vorteks ile karıştırılmış ve transport solüsyonundan 200 µL alınarak DNaz ve RNaz içermeyen steril bir tüpe aktarılmıştır.

3.2.2. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada, mikoplazmalardan kromozomal DNA izolasyonu amacıyla Qiagen (Hilden, Almanya) firmasından temin edilmiş Cador Pathogen Mini Kit isimli ticari DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Kit içeriğinde; 2 mL filtreli tüplerin yanı sıra iki adet stok yıkama tamponu, stok binding tamponu, yıkama esnasında kullanılan kapaksız tüpler, lizis tamponu, elüsyon tamponu, proteinaz K ve carrier RNA bulunmaktadır. Stok yıkama tamponları önerilen miktarlarda %96'lık etil alkol (Merck; Darmstadt, Almanya), stok binding tamponu ise izopropanol (Merck; Darmstadt, Almanya) ilavesi ile hazırlanmıştır. DNA izolasyonu yapılacak svab-doku örneklerine proteinaz K (serin proteaz) ve lizis tamponu ilave edilmiştir. Tüpler karıştırıldıktan

sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere binding tamponu ilave edilmiş ve 6000 g dönme hızında kısa süreli santrifüje tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrası tüp içerikleri filtreli tüplerin üst bölümüne boşaltılmış ve 6000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında filtreler yıkama tüplerine yerleştirilerek yıkama tamponları ilavesi yapılmış ve sonrasında santrifüj işlemi ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında filtre kapaklı bir tüpe yerleştirilmiştir. Elüsyon tamponu ilavesi sonrasında tüpler 20000 g'de 1 dakika daha santrifüje tabi tutulmuştur ve işlemin ardından filtre tüpten ayrılmıştır. Tüplerin üzerine örnek bilgileri kaydedildikten sonra – 20 °C'ta muhafaza edilmiştir.

3.2.4. DNA Amplifikasyonu

rPCR testinde Qiagen (Hilden, Almanya) firmasından temin edilen QuantiNova Probe PCR kiti kullanılmıştır. Kit içeriğinde; 2 adet konsantre tampon solüsyonu, RNaz içermeyen ultra saf su, referans solüsyonu ve dilüsyon tamponu bulunmaktadır. Reaksiyon karışımının hazırlanmasında, Callison ve ark. (2006) tarafından yapılan bir multipleks rPCR çalışması referans alınmıştır. Bu çalışmada, *mgc2* gen bölgesinin *MGA_0319* hedefine özgü primer çiftleri ve prob Metabion (Münih, Almanya) firması tarafından sentezlenmiştir. Reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları Tablo 3.4'te verilmiştir. Kullanılan primerlerin ve probun baz dizileri aşağıda verilmiştir:

“ F Primer (mglpU26): 5' – CTA-GAG-GGT-TGG-ACA-GTT-ATG – 3',

R Primer (mglp 164): 5' – GCT-GCA-CTA-AAT-GAT-ACG-TCA-AA – 3',

Prob (mglpprobe): 6FAM – CAG-TCA-TTA-ACA-ACT-TAC-CAC-CAG-AAT-CTG – BHQ_1 ”

Reaksiyon karışımına eklenecek solüsyonlar ve miktarları Tablo 3.4.'te verilmiştir:

Tablo 3.2. rPCR testi reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
2X Qiagen QuantiNova Probe PCR MasterMix	10 μ L
Primer Probe Mix (20X)	1 μ L (Primerlerin son konsantrasyonu 0.5 μ M, probun 0.2 μ M olmuştur)
RNaz İçermeyen Saf Su	4 μ L
Reaksiyon Karışımı	15 μ L
Örnek (Template)	5 μ L
TOPLAM Reaksiyon Karışımı	20 μ L

rPCR için QuantiNova Probe PCR kiti üreticisi tarafından önerilen sıcaklık profili kullanılmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.3. rPCR testinde kullanılan sıcaklık profili

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95 °C	2 dakika	-
Amplifikasyon	95 °C	5 saniye	
	60 °C	5 saniye	40

rPCR test sonuçlarının değerlendirilmesi için örneklerle birlikte pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak cycle of threshold'u (C_T) 23-27 arasında değişen örnekler tercih edilmiştir. Pozitif kontrolün C_T değeri çok düşük olan örneklerden seçilmesi, eğrinin diğer örnekler üzerinde gölgeleme etkisi yapması nedeniyle yanlış negatif sonuçlar elde edilmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte kuvvetli pozitif olan kontroller uzun süreli kullanımlarda kontaminasyon riskini arttırmakta, kimi zaman yanlış pozitif sonuçlara yol açmaktadırlar. Negatif kontrol ile herhangi bir sinyal tespit edilmemesi gerekmektedir. rPCR testinin tamamlanmasından sonra, sonuçların değerlendirilmesinde üç parametre kullanılmıştır. Bunlar eğrinin şekli ve programda bulunan slope correct ile outlier removal seçenekleridir. Eğrinin sigmoid olması ve diğer iki seçenek tercih edildiğinde negatif sonuç elde edilmemesi durumunda

örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir. rPCR testinde 35'e kadar olan C_T değerine sahip örnekler pozitif, daha yüksek C_T elde edilen örnekler negatif olarak belirlenmiştir.

3.3 Sonuçların İstatistikî Analizi

ELISA ve lam aglütinasyon testlerinden elde edilen sonuçların karşılaştırılması için çeşitli hesaplamalar kullanılmıştır. Serolojik testlerden elde edilen sonuçların uyumuna ilişkin istatistikî hesaplama metotları bulunmaktadır. Ortak oransal uyum da denilen bir metot karşılaştırma çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Benzecri, 1960). Bu metotta, testlerden elde edilen ortak pozitif ve ortak negatif sonuçların tüm ortak sonuçlara oranı hesaplanmaktadır. Farklı dönemlerde yapılan testlerden elde edilen sonuçlar arasındaki değişiklikler tespit edilmektedir. Bu metodun kullanılmasında tek şart, farklı testlerin aynı tip örneklerden gerçekleştirilmesidir.

Tablo 3.4. Ortak oransal uyum oranı hesaplaması

	1. Testte Elde Edilen Pozitif Sonuç	2. Testte Elde Edilen Negatif Sonuç
2. Testte Elde Edilen Pozitif Sonuç	A	B
2. Testte Elde Edilen Negatif Sonuç	C	D

$$\text{Pozitif Ortak Oransal Uyum} = A / (A+D)$$

$$\text{Negatif Ortak Oransal Uyum} = D / (A+D)$$

Bu çalışmada, tüm sonuçlar Cohen'in κ istatistikî hesaplama modeli ile değerlendirilmiştir. rPCR testi ile serolojik testlerden elde edilen sonuçlar, ikili olarak karşılaştırılarak κ değerleri hesaplanmıştır. Örneklerin *M. gallisepticum* pozitif olduğu kesin olarak bilinmediğinden, veriler ki-kare testine tabi tutulmamıştır. Cohen'in κ katsayısının hesaplanmasında aşağıdaki tablodan yararlanılmıştır (Kılıç, 2015):

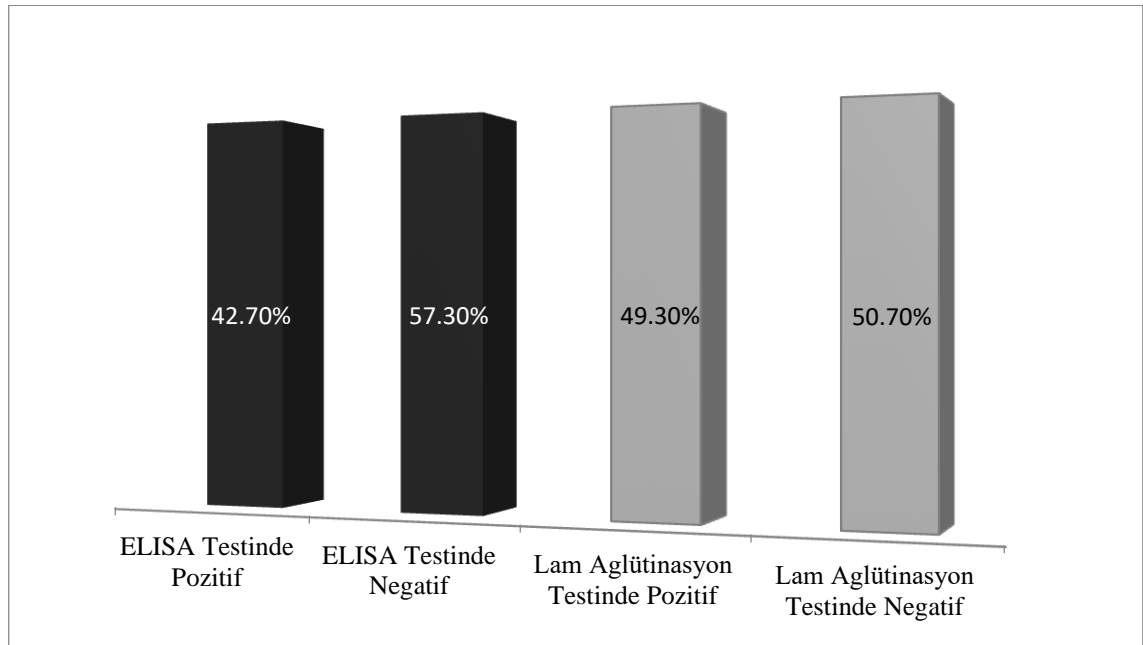
Tablo 3.5. Test sonuçlarının değerlendirilmesinde κ katsayısının belirlenmesi için kullanılan taslak

KAPPA Hesaplama Taslağı	1. Testte Pozitif Bulunan Serum Sayısı	1. Testte Negatif Bulunan Serum Sayısı	TOPLAM
2. Testte Pozitif Bulunan Serum Sayısı	A	C	$(A+C) / E$ % Z
2. Testte Negatif Bulunan Serum Sayısı	B	D	$(B+D) / E$ % T
TOPLAM	$(A+D) / E$ % X	$(C+D) / E$ % Y	$E = A+B+C+D$ % 100
$Pr(a) = (A+B)/E$ $P_1 = (\% X) \times (\% Z)$ $P_2 = (\% Y) \times (\% T)$ $Pr(e) = P_1 + P_2$		$\kappa = \frac{(Pr(a) - Pr(e))}{1 - Pr(e)}$	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Serolojik Test Sonuçları

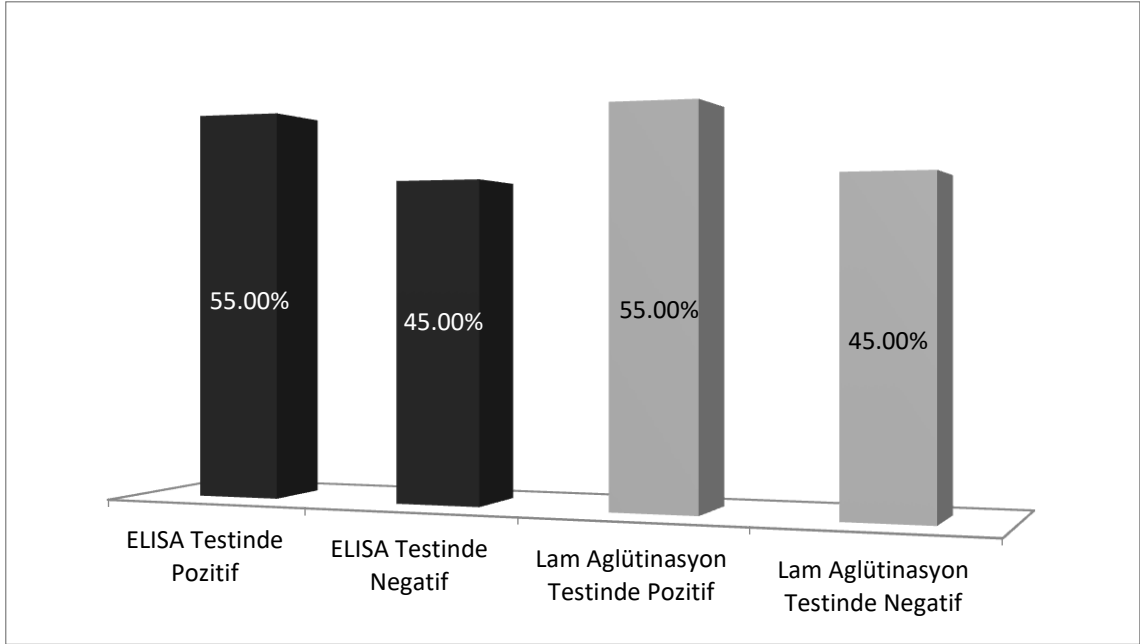
Bu çalışmada, hastalık belirtilerinin görüldüğü erken dönemde alınan 300 adet serum örneğine, *M. gallisepticum*'un tespiti için lam aglütinasyon ve ELISA metotları ile test yapılmıştır. Lam aglütinasyon testinde, 148 örnek pozitif, 152 örnek negatif olarak değerlendirilmiştir. ELISA testinde ise örneklerin 128'inin pozitif, 172'sinin negatif olduğu tespit edilmiştir. Serolojik testlerden elde edilen sonuçların dağılımı Grafik 4.1.'de verilmiştir.



Grafik 4.1. Serolojik testlerden elde edilen sonuçlar

İlk testlerin gerçekleştirildiği tarihten 21 gün sonra, hastalık belirtileri devam eden 100 adet kanatlının kan serumları aynı serolojik metotlar ile yeniden test edilmiştir. Her iki test ile 55 örnek pozitif, 45 örnek ise negatif olarak saptanmıştır. Enfeksiyonun ileri döneminde pozitif sonuç sayısının arttığı belirlenmiştir. ELISA testinde pozitif sonuçlarda oluşan artışın, lam aglütinasyon testine nazaran daha yüksek olduğu saptanmıştır. Serolojik testlerin en az birinde pozitif sonuç elde edilen örnek sayısının, tüm örneklerin % 90'ını temsil ettiği tespit edilmiştir. Erken ve ileri dönemde alınan örneklere yapılan serolojik testlerde elde edilen pozitif sonuçların arttığı gözlenmekle birlikte, lam aglütinasyon testindeki yükselişin azalma eğilimi gösterdiği

tespit edilmiştir. İlk testlerin gerçekleştirildiği tarihten 21 gün sonra gerçekleştirilen serolojik testlerden elde edilen sonuçlar Grafik 4.2.'de verilmiştir.

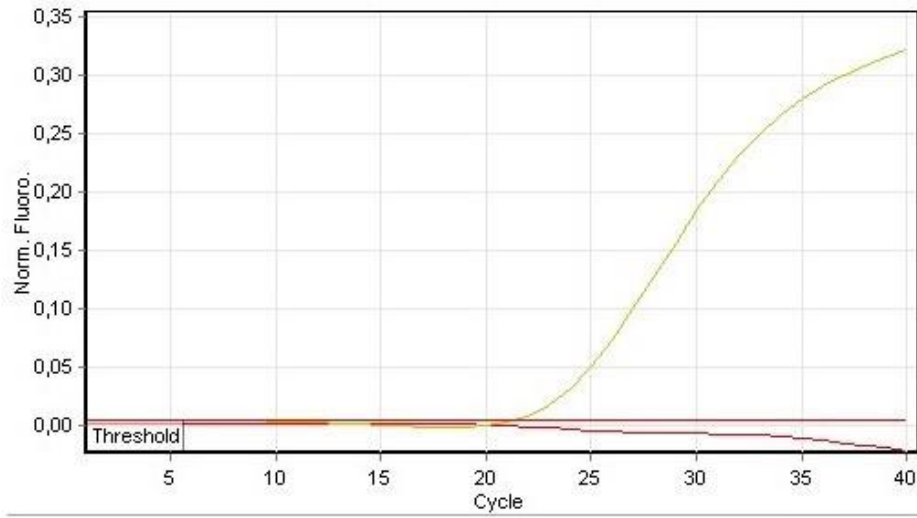


Grafik 4.2. İleri döneme ait seroloji test sonuçları

4.2. rPCR Test Sonuçları

Kanatlılardan erken dönemde alınan svab-doku örneklerinin 180 adedinden pozitif, 120 adedinden negatif sonuç elde edilmiştir. Pozitif sonuçlara ait C_T değerlerinin aritmetik ortalamasının 24.42, standart sapmasının (σ) 4.84 olduğu tespit edilmiştir. İleri dönemde alınan trakeal svabların 75 (% 75) adedinde *M. gallisepticum* tespit edilmiştir. Bu örneklerden elde edilen pozitif sonuçların ortalama C_T değeri 26.77, σ 'sının ise 6.46 olarak saptanmıştır. rPCR testinden elde edilen C_T değeri 35'ten yüksek olan örnekler negatif olarak kabul edilmiştir. Hastalığın izlendiği dönemde bu sonuçların elde edildiği kanatlılar da gözlem altında tutulmuştur.

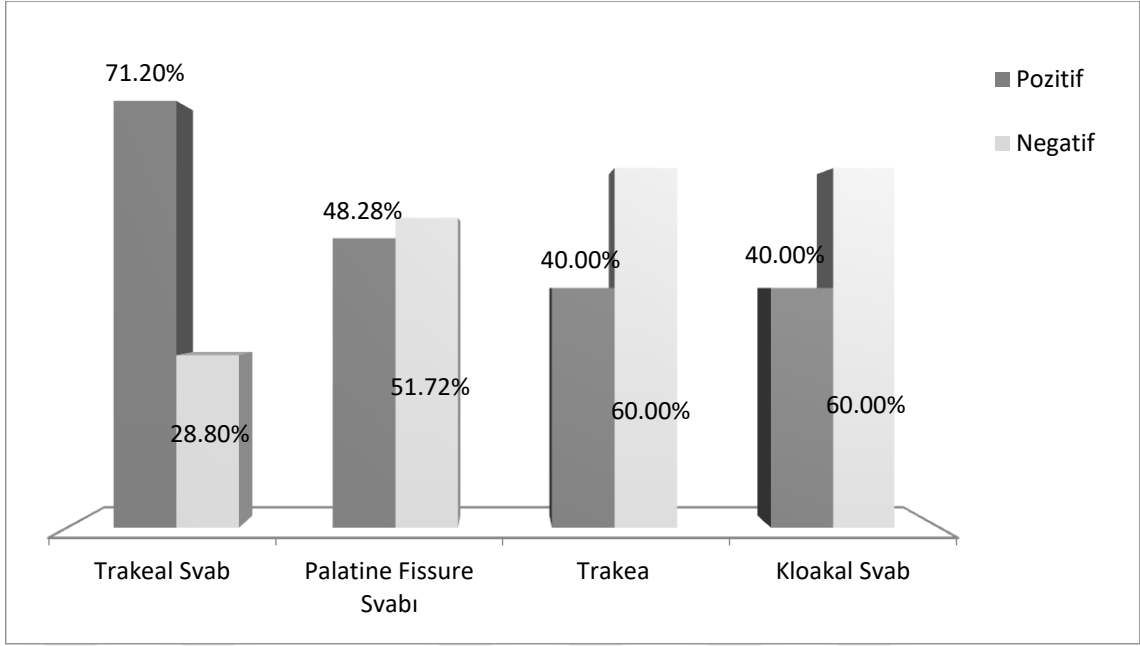
Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	■	NEGATIF NUMUNE	Unknown				
2	■	POZITIF KONTROL	Unknown	21,46			

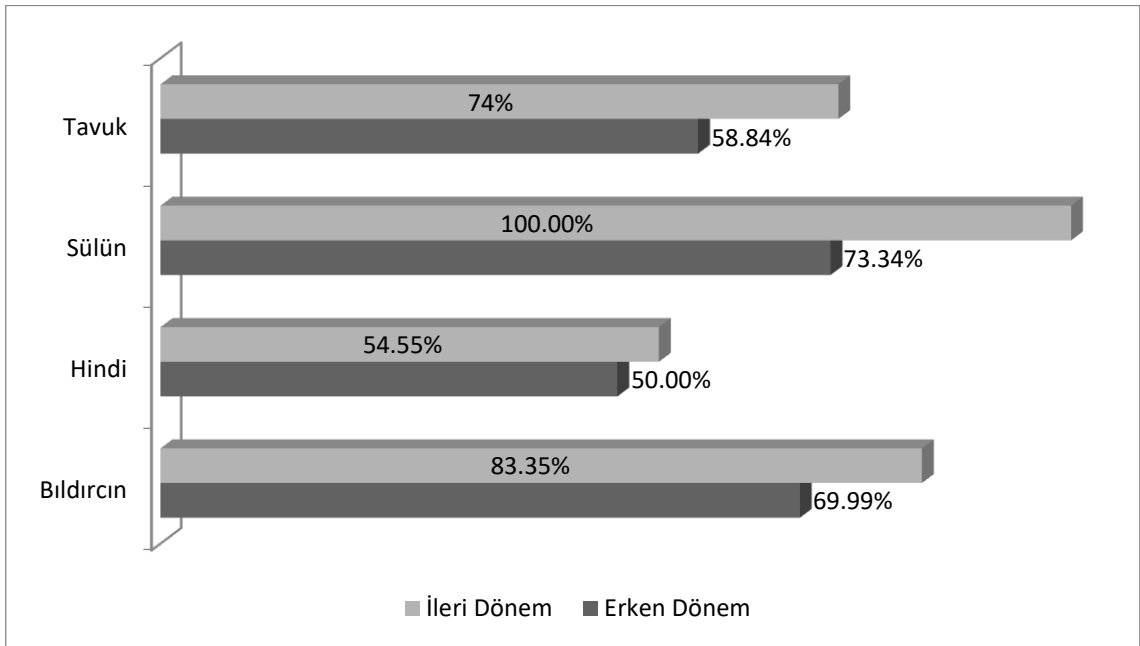
Şekil 4.1. rPCR testine ait sonuç

126 trakeal svab, 28 palatine fissure, 6 kloakal svab ve 20 trakeal doku örneğinde *M. gallisepticum* tespit edilmiştir. Pozitif sonuçların örnek tipine göre dağılımı Grafik 4.3.'te verilmiştir. rPCR testinde pozitif sonuçların önemli bir bölümünün trakeal svablardan elde edildiği belirlenmiştir. Doku örneklerinin eksudatı tutması nedeniyle transport solüsyonunun berrak kaldığı saptanmıştır. Trakeal svablarda ise direkt eksudat alındığından türbiditenin kolaylıkla oluştuğu tespit edilmiştir. İzolasyon performansının yüksek olması nedeniyle, ileri enfekte kanatlılardan trakeal svab alınarak rPCR testi gerçekleştirilmiştir.



Grafik 4.3. Doku ve svablardan elde edilen rPCR test sonuçları

rPCR testinde elde edilen pozitif sonuç oranının, kanatlı türüne göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Erken dönemde, 144 tavuk, 11 hindi, 15 bıldırcın ve 11 adet sülünden alınan örneklerde *M. gallisepticum* tespit edilmiştir. İleri dönemde ise, 59 tavuk, 6 hindi, 5 bıldırcın ve 6 sülünden alınan örneklerde pozitif sonuç elde edilmiştir (Grafik 4.4). Serolojik test sonuçlarında olduğu gibi, rPCR testinde de 21 gün sonra pozitif sonuç oranının arttığı gözlemlenmiştir.

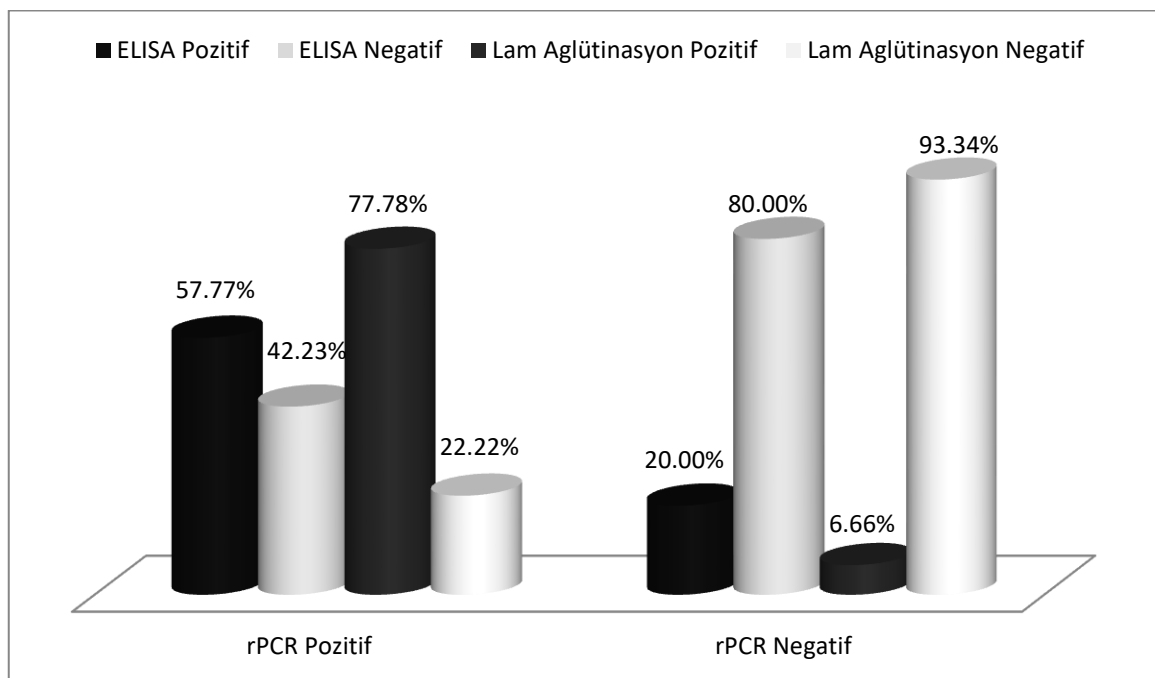


Grafik 4.4. Kanatlı türüne göre pozitif sonuçların değişimi

4.3. Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

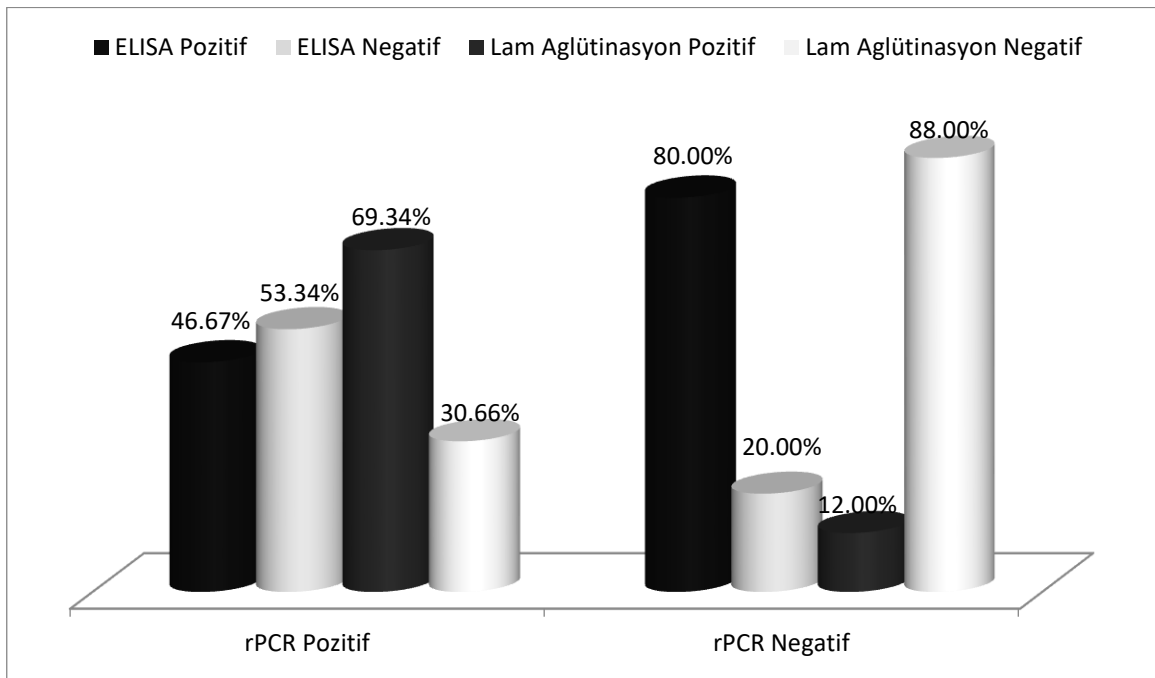
Serolojik test sonuçlarına göre, iki test ile pozitif olarak tanımlanan örnek sayısı 78, negatif olarak tanımlanan örnek sayısı ise 102'dir. Lam aglütinasyon testinde pozitif, ELISA testinde negatif sonuç elde edilen örnek sayısı 70 iken, ELISA testinde pozitif, lam aglütinasyon testinde negatif sonuç elde edilen örnek sayısının 50 olduğu belirlenmiştir. 21 gün sonra alınan 100 örnekte ise, iki serolojik test ile pozitif sonuç elde edilen örnek sayısının 20, negatif sonuç elde edilen örnek sayısının ise 10 olduğu tespit edilmiştir. Sadece ELISA testi veya sadece lam aglütinasyon testi ile pozitif sonuç alınan örnek sayısı 35 olarak saptanmıştır.

rPCR testinde elde edilen pozitif sonuçlar, serolojik test sonuçlarının ifade edilmesinde önemli bir parametre olarak kabul edilmiştir (Garcia ve ark., 1996; Fraga ve ark., 2013). Bu çalışmada, serolojik testler ile elde edilen pozitif örnek sayılarının rPCR ile elde edilen pozitif sonuç sayısına yakın olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, serolojik testler ile rPCR sonuçları arasındaki uyumun negatif sonuç elde edilen örneklerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *M. gallisepticum* tespit edilememiş kanatlılardan alınan serum örneklerinde, ELISA testi ile daha fazla sayıda pozitif sonuç elde edilmiştir. rPCR testinde elde edilen sonuçlara göre serolojik test sonuçlarının dağılımı Grafik 4.5.'te verilmiştir.



Grafik 4.5. Erken dönem rPCR sonuçlarına göre serolojik test sonuçları

İlk test tarihinden 21 gün sonra alınan örneklerde ise, ELISA sonuçlarında kayda değer değişiklikler olduğu gözlenmiştir. rPCR negatif kanatlılardan alınan serumların önemli bir bölümünde, ELISA testinde pozitif sonuç elde edilmiştir. İleri dönemde rPCR testinden elde edilen sonuçlara göre serolojik test sonuçlarının dağılımı Grafik 4.6.'da verilmiştir.



Grafik 4.6. İleri dönemde rPCR sonuçlarına göre serolojik test sonuçları

4.3.1. Test Sonuçlarının İstatistikî Karşılaştırması

Kanatlılardan alınan örneklere yapılan testlere ait sonuçların istatistikî incelemesinde Cohen'in Kappa formülasyonu kullanılmıştır. Test sonuçları ikişerli gruplar halinde karşılaştırılarak verilere ait κ değerleri belirlenmiştir. Erken döneme ait veriler Tablo 4.1., Tablo 4.2., Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.1. Erken dönem ELISA ve lam aglütinasyon test sonuçları için κ değerinin hesaplanması

	Lam Aglütinasyon Pozitif	Lam Aglütinasyon Negatif	TOPLAM
ELISA Pozitif	78	50	(78+50) / 300 % 42,66
ELISA Negatif	70	102	(70+102) / 300 % 57,34
TOPLAM	(70+78) / 300 % 49,33	(50+102) / 300 % 50,67	78+50+70+102 % 100
	Pr (a) = 0,60 P ₁ = 0,49 x 0,42 P ₂ = 0,50 x 0,57 Pr (e) = 0,21 + 0,29		0,60 – 0,50 K = ----- 1 – 0,50 K _{EL} = 0,19

ELISA ve lam aglütinasyon test sonuçları ile κ değeri 0,19 olarak saptanmıştır. Bu değer, istatistiksel açıdan iki testin sonuçları arasındaki uyumun zayıf ($0,01 < \kappa < 0,20$) olduğunu ortaya koymaktadır (Koch ve Landis, 1977)

Tablo 4.2. Erken dönem rPCR ve lam aglütinasyon test sonuçları için κ değerinin hesaplanması

	Lam Aglütinasyon Pozitif	Lam Aglütinasyon Negatif	TOPLAM
rPCR Pozitif	140	40	(140+40) / 300 % 60,00
rPCR Negatif	8	112	(8+112) / 300 % 40,00
TOPLAM	(140+8) / 300 % 49,34	(40+112) / 300 % 50,66	140+40+8+112 % 100
	Pr (a) = 0,84 P ₁ = 0,49 x 0,60 P ₂ = 0,50 x 0,40 Pr (e) = 0,29 + 0,20		0,84 – 0,49 K = ----- 1 – 0,49 K _{RL} = 0,68

rPCR ve lam aglütinasyon testlerinden elde edilen sonuçlar ile κ değeri 0,68 olarak saptanmıştır. Bu değer, iki testin sonuçları arasında iyi düzeyde uyum ($0,61 < \kappa < 0,80$) olduğunu göstermektedir (Koch ve Landis, 1977).

Tablo 4.3. Erken dönem rPCR ve ELISA test sonuçları için κ değerinin hesaplanması

	ELISA Pozitif	ELISA Negatif	TOPLAM
rPCR Pozitif	104	76	(104+76) / 300 % 60,00
rPCR Negatif	24	96	(24+96) / 300 % 40,00
TOPLAM	(104+24) / 300 % 42,66	(76+96) / 300 % 57,34	104+76+24+96 % 100
Pr (a) = 0,66			0,66 – 0,48
P ₁ = 0,42 x 0,60			K = -----
P ₂ = 0,57 x 0,40			1 – 0,48
Pr (e) = 0,25 + 0,22			K _{RE} = 0,35

rPCR ile ELISA test sonuçları arasındaki uyum düzeyinin zayıf olduğu (0,35) olduğu tespit edilmiştir (0,21 < κ < 0,40).

İlk test tarihinden 21 gün sonra alınan örneklerle gerçekleştirilen testlerden elde edilen sonuçlar için de aynı istatistikî hesaplamalar yapılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.4., Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.'da ifade edilmiştir.

Tablo 4.4. İleri dönem ELISA ve lam aglütinasyon test sonuçları için κ değerinin hesaplanması

	Lam Aglütinasyon Pozitif	Lam Aglütinasyon Negatif	TOPLAM
ELISA Pozitif	20	35	(20+35) / 100 % 55,00
ELISA Negatif	35	10	(35+10) / 100 % 45,00
TOPLAM	(20+35) / 100 % 55,00	(35+10) / 100 % 45,00	20+35+35+10 % 100
Pr (a) = 0,30			0,3 – 0,50
P ₁ = 0,55 x 0,55			K = -----
P ₂ = 0,45 x 0,45			1 – 0,50
Pr (e) = 0,30 + 0,20			K _{EL(21)} = - 0,41

İlk test tarihinden 21 gün sonra alınan örneklerden elde edilen serolojik test sonuçları arasındaki uyumun (-0,41) negatif orta düzeyde olduğu tespit edilmiştir (0,41 < κ < 0,60). Bu değer, testlerin ileri dönemde birbirine ters ve κ için orta düzeyde uyumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Tablo 4.5. İleri dönem rPCR ve lam aglütinasyon test sonuçları için κ değerinin hesaplanması

	Lam Aglütinasyon Pozitif	Lam Aglütinasyon Negatif	TOPLAM
rPCR Pozitif	52	23	(52+23) / 100 % 75,00
rPCR Negatif	3	22	(3+22) / 100 % 25,00
TOPLAM	(52+3) / 100 % 55,00	(23+22) / 100 % 45,00	52+23+3+22 % 100
	Pr (a) = 0,74 P ₁ = 0,55 x 0,75 P ₂ = 0,45 x 0,25 Pr (e) = 0,41 + 0,11		0,74 – 0,52 K = ----- 1 – 0,52 K _{RL(21)} = 0,45

İlk test tarihinden 21 gün sonra alınan örneklerden elde edilen rPCR ile lam aglütinasyon test sonuçları ile κ değeri 0,45 olarak saptanmıştır. Bu değer, iki test ile elde edilen sonuçlar arasında orta düzeyde bir uyum olduğunu işaret etmektedir (0,41< κ <0,60). Erken döneme nazaran rPCR ve lam aglütinasyon testleri arasındaki uyum belirgin bir şekilde azalmıştır.

Tablo 4.6. İleri dönem rPCR ve ELISA test sonuçları için κ değerinin hesaplanması

	rPCR Pozitif	rPCR Negatif	TOPLAM
ELISA Pozitif	35	20	(35+20) / 100 % 55,00
ELISA Negatif	40	5	(40+5) / 100 % 45,00
TOPLAM	(35+40) / 100 % 75,00	(20+5) / 100 % 25,00	35+20+40+5 % 100
	Pr (a) = 0,40 P ₁ = 0,75 x 0,55 P ₂ = 0,25 x 0,45 Pr (e) = 0,41 + 0,11		0,4 – 0,52 K = ----- 1 – 0,52 K _{RE(21)} = - 0,26

rPCR ile ELISA test sonuçları arasında negatif zayıf düzey uyum (-0,26) olduğu tespit edilmiştir. (0,21< κ <0,40) Hastalık belirtilerinin ileri döneminde alınan örnekler için, rPCR ile ELISA testleri arasındaki uyum zayıf olarak saptanmıştır. Erken ve ileri dönemde alınan örneklerden elde edilen sonuçlar ilişkin κ değerleri Tablo 4.7. ve Tablo 4.8.'de verilmiştir.

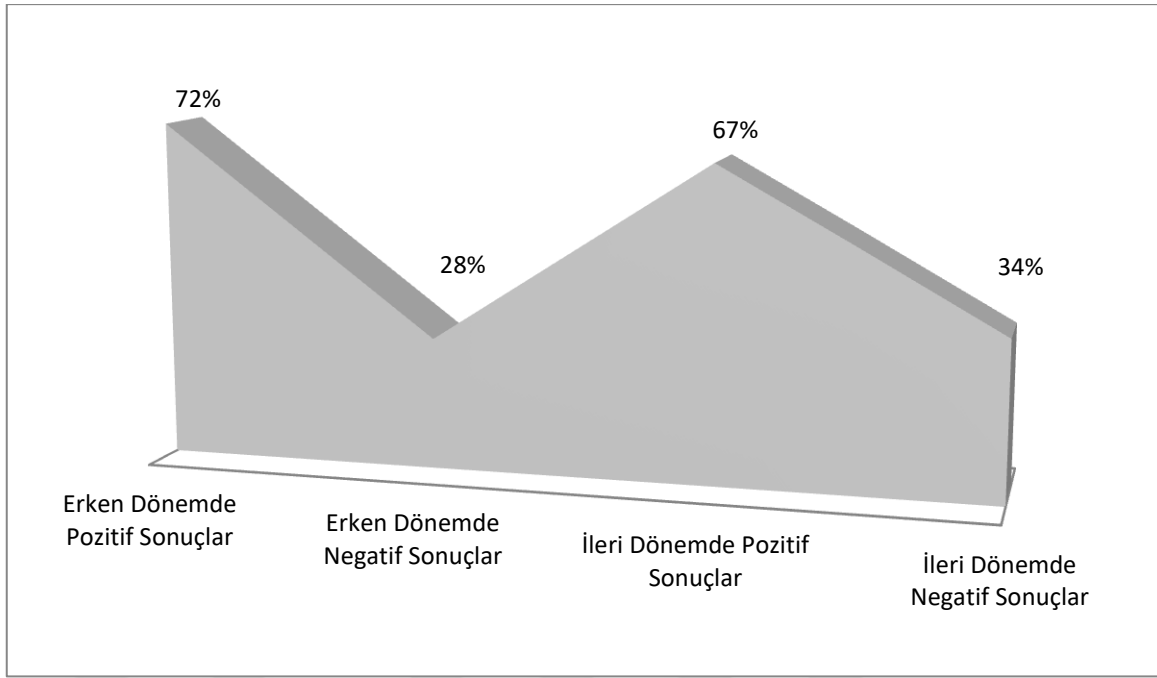
Tablo 4.7. Erken dönem test sonuçlarına ait κ değerleri

	ELISA ve Lam Aglütinasyon Testleri	0.19 (Önemsiz Düzey)
Kappa Katsayıları	rPCR ve Lam Aglütinasyon Testleri	0.68 (İyi Düzey)
	rPCR ve ELISA Testleri	0.35 (Zayıf Düzey)

Tablo 4.8. İleri dönem test sonuçlarına ait κ değerleri

	ELISA ve Lam Aglütinasyon Testleri	-0.41 (Negatif Orta Düzey)
Kappa Katsayıları (21. Gün)	rPCR ve Lam Aglütinasyon Testleri	0.45 (Orta Düzey)
	rPCR ve ELISA Testleri	- 0.26 (Negatif Zayıf Düzey)

κ hesaplaması dışında; enfeksiyon sürecinin serolojik test sonuçlarına etkisinin araştırılmasında ortak oransal uyum formülasyonu kullanılmıştır (Benzecri, 1960; Seyfullahoğulları, 2003). Erken ve ileri evrede alınan örneklerden serolojik testler ile elde edilen sonuçlar arasında kayda değer farklılıklar gözlemlenmiştir. Erken dönemde, serolojik test sonuçlarının uyumunun daha yüksek olduğu, buna karşın ileri dönemde test sonuçları arasındaki uyumun oransal olarak azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen pozitif sonuç oranının artmasına karşın; ortak pozitif sonuçlarda azalma, ortak negatif sonuçlarda ise yükselme olduğu saptanmıştır (Grafik 4.7.).



Grafik 4.7. Hastalık belirtisi gösteren kanatlara ait erken ve ileri dönem seroloji test sonuçlarında ortak oransal uyum grafiği

4.4. Tartışma

Bu çalışmada, hastalık belirtilerinin ortaya çıktığı erken dönemde 300, hastalık belirtilerinin devam ettiği ileri dönemde 100 adet kanatlıdan alınan doku-svab örneklerine rPCR, serum örneklerine ise ELISA ve lam aglütinasyon testi yapılmıştır. CRD'nin erken ve ileri döneminde kullanılan test metotlarının performansları karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, testlerden elde edilen sonuçların doğrulanmasında istatistikî hesaplama metotlarının kullanılması önerilmiştir (Mekkes ve ark., 2005; Landman, 2014; Abuşoğlu ve ark., 2015). Bu çalışmada kullanılan temel istatistikî hesaplama metodu, Cohen'in Kappa güvenilirlik katsayısı formülasyonudur (Neundorf, 2002; Riffe ve ark., 2005; Gwet, 2010). κ , William Scott'un "pi" hesaplamasının (1955) Jacob Cohen tarafından geliştirilerek (1960) birden fazla veri setinin incelendiği bir metottur. Hesaplamalar sonucunda çıkan değerler, test metotlarının yorumlanmasında kullanılmıştır. Örnek sayısı 30'dan fazla olduğunda, istatistikî değerlendirme sonuçlarının güvenilir olduğu yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (Kanık ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda, iki test arasında mükemmel uyum olması için κ değerinin en az 0,75 olması önerilmiştir (Fleiss, 1971). Bununla birlikte, yaygın kullanılan bir diğer sınıflandırmada, κ değerinin 0,81 olması tavsiye edilmiştir (Koch ve Landis,

1977). Bu çalışmada, κ değerlerinin test metotları arasında mükemmel uyuma işaret etmediği tespit edilmiştir. Bazı karşılaştırmalarda κ 'nın negatif değer aldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, hastalığın tespitinde sadece bir metodun kullanılamayacağını ortaya koymuştur.

Hastalık belirtilerinin ortaya çıktığı erken dönemde alınan örneklerle yapılan testlerden elde edilen sonuçların, istatistiksel açıdan mükemmel düzeyde uyuma sahip olmadığı saptanmıştır. Serolojik testlerden elde edilen sonuçlara ilişkin κ değerinin önemsiz düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, lam aglütinasyon ve ELISA testlerinin farklı antikorları tanıdığı ve değişik sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Arda, 2002). Bu nedenle, erken dönemde alınan örneklerle hem ELISA hem de lam aglütinasyon testlerinin yapılması önerilmiştir (Stipkovits ve ark., 1996; Feberwee ve ark., 2005). Serolojik testlerden elde edilen sonuçların farklı test metotları ile doğrulanması gerektiği belirtilmiştir (Dakman ve ark., 2009).

Hastalık belirtileri gösteren kanatlılarda, erken dönemde *M. gallisepticum* tespiti için serolojik testlere ilaveten rPCR testi yapılması tavsiye edilmiştir (Ferguson-Noel ve ark., 2016). Serolojik testler ile rPCR testinden elde edilen sonuçların karşılaştırılması sonucu, lam aglütinasyon testinin daha avantajlı olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, ELISA testinden elde edilen sonuçlar ile rPCR test sonuçları arasındaki uyumun zayıf düzeyde olduğu saptanmıştır. Bu durum, IgG antikorların *M. gallisepticum* eliminasyonundan sonra oluşması ve uzun süre kanatlı vücudunda kalması ile açıklanmıştır (Arda, 2011). ELISA testinde elde edilen pozitif sonuçların % 18.75'inin, rPCR negatif kanatlılardan alınan örneklerden tespit edildiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, erken dönemde alınan örneklerle ELISA testi yapılması durumunda, aynı kanatlılardan svab alınarak rPCR ile test edilmesinin önemini ortaya koymuştur.

Bakteriyel mikroorganizmalar farklı metotlarla tespit edilebilmektedir. Hastalık belirtilerinin ortaya çıktığı erken dönemde *M. gallisepticum*'a özgü DNA izole edilebilmektedir. Buna karşın CRD etkeninin serolojik testlerle tespiti, enfeksiyonun üçüncü haftasında gerçekleştirilmektedir (McGregor ve ark., 2015). Diğer bakteri türlerinden farklı olarak; *M. gallisepticum* izolatlarının, kanatlı türleri arasında geçiş gösterirken patojenisitesinin azaldığı bildirilmiştir (Yoder ve ark., 1991). *M. gallisepticum* kanatlı dokusunda ortalama 17 gün içinde çoğalırken, kolonizasyonu 3 ila 6 hafta kadar sürmektedir. Sürünün sadece % 5'inde ilk günlerde *M. gallisepticum*'a özgü antikorlar tespit edilebilmektedir (Glisson ve ark., 1984). Bu nedenle klinik

belirtileri süren kanatlılardan 21 gün sonra yeniden kan serumu ve svab örnekleri alınmıştır.

Hastalık belirtilerinin devam ettiği ileri dönemde alınan örneklere yapılan testlerden elde edilen sonuçlara ilişkin κ değerleri, sonuçlar arasında iyi bir uyum olmadığını göstermiştir. rPCR ile lam aglütinasyon testlerinden elde edilen sonuçlara ait κ değerinin, erken döneme nazaran % 22.78 azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun, rPCR testinde pozitif, lam aglütinasyon testinde negatif sonuç elde edilmesinden kaynaklandığı saptanmıştır. ELISA testinde elde edilen pozitif sonuçlarda oluşan artışın diğer testlere nazaran daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, ELISA testi ve diğer testlerden elde edilen sonuçlar ile κ değerlerinde kayda değer değişiklikler gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar, farklı zaman aralıklarında yapılan ELISA testlerinde değişik sonuçlar elde edildiğini ortaya koymuştur (Arda, 2011). Bu çalışmada, lam aglütinasyon ve rPCR testleri için de aynı durumun geçerli olduğu saptanmıştır.

El Gazzar ve ark (2011) kanatlılardan örnek alımında, hastalık evresinin dikkate alınması gerektiğini bildirmişlerdir. Yine Gaunson ve ark (2006) klinik belirti gösteren kanatlılardan farklı dönemlerde alınan örneklerde, elde edilen sonuçların farklılık gösterebildiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada, aynı hayvanlardan hastalık belirtilerinin görüldüğü erken ve ileri dönemde alınan örneklerden elde edilen test sonuçlarının değiştiği tespit edilmiştir. ELISA testinde elde edilen sonuçlardaki değişikliğin, diğer test metotlarına nazaran daha yüksek seviyede olduğu saptanmıştır. Bu durumun, IgG düzeyinin değişmesi, kemokin ile sitokinlerin uyarımı ve immünoşüpresif etkiden kaynaklandığı bildirilmiştir (Lam ve ark., 2003; Cizelj ve ark., 2011).

Kleven ve ark (2003) tarama çalışmalarında lam aglütinasyon ve ELISA testlerinin kullanılmasını tavsiye etmişlerdir. Abdelmoumen ve ark (1995) ise lam aglütinasyon testinin *M. synoviae* enfeksiyonlarından etkilendiğini ve yanlış pozitif sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir. Klinik belirtilerin olduğu erken dönemde lam aglütinasyon testinin gayet hassas olduğu ve isabetli sonuçlar verdiği ortaya koyulmuştur (Luttrell ve ark., 1996). Hastalık belirtilerinin devam ettiği ileri dönemde ya da sekonder enfeksiyonlarda ise ELISA testinin kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Arda, 2002; Gondal ve ark., 2015). Bununla birlikte, serolojik test metotlarından sadece bir tanesini uygulamanın yeterli olmadığı ortaya konulmuştur. Noormohammadi (2007) serolojik testlerden elde edilen sonuçlarda oluşan farklılığa, suş ve antijen değişikliğinin

sebepe olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, serolojik testlerden elde edilen sonuçlar arasındaki uyum önceki çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Sero-prevalans çalışmalarında genellikle sadece bir serolojik test metodu tercih edilmektedir. Sarkar ve ark (2005) *M. gallisepticum* prevalansının % 58.90 olduğunu bildirmiştir. Yine Shoaib ve ark (2019) yapmış oldukları çalışmada, lam aglütinasyon testi ile *M. gallisepticum* sero-prevalansını % 44.90 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, birden fazla serolojik test metodu kullanılmış ve bu testlerden elde edilen pozitif sonuçların, tüm sonuçların % 66 ila 90'ını temsil ettiği tespit edilmiştir. Sadece bir serolojik test metodunun uygulanması durumunda, hastalık belirtilerinin görüldüğü erken dönemde alınan örneklerde pozitif sonuçların % 20'sinin, belirtilerin devam ettiği ileri dönemde % 35'inin tespit edilemeyeceği gözlemlenmiştir.

Kanatlılardan alınan örneklerde *M. gallisepticum* tespiti için rPCR testi önerilmiştir (Gondal ve ark., 2015). Bu çalışmada, her iki dönemde de en çok pozitif sonuç elde edilen test metodunun rPCR olmuştur. rPCR testinde hastalık belirtilerinin görüldüğü erken dönemde σ değeri 4.84, belirtilerin sürdüğü ileri dönemde ise 6.46 olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara ait C_T ortalamasının da ileri dönemde yükseldiği tespit edilmiştir. Bu değerler, hastalık belirtilerinin sürdüğü ileri dönemde, rPCR testinin daha güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır. Hastalığın kronik olması ve doku üzerinde mikoplazma miktarının zamanla artması nedeniyle, tespit aralığının genişlediği saptanmıştır. *M. gallisepticum* hücre sayısının, rPCR test sonuçlarına etkisinin anlaşılması için bazı çalışmalar yapılmıştır (Çarlı ve ark., 2003; Marois ve ark., 2005). Callison ve ark (2006) *M. gallisepticum*'un tespiti için 25 spesifik DNA kopyanın yeterli olduğunu bildirmiştir.

Yapılan çalışmalarda, rPCR testinin örnek alımından ve muhafaza koşullarından etkilendiği raporlanmıştır (Zain ve ark., 1995; Öngör ve ark., 2009). Ball ve ark (2020) ise muhafaza sıcaklığının DNA izolasyonunu etkilemediğini bildirmişlerdir. Pozitif sonuçların elde edilmesinde, svab örneklerinin doku örneklerinden daha başarılı olduğu gösterilmiştir. *M. gallisepticum* spesifik DNA tespitinde, trakeal svabların en iyi sonucu veren örnek tipi olduğu, yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Gondal ve ark., 2015). Bu çalışmada da, izolasyon performansı en yüksek örnek tipinin trakeal svablar olduğu tespit edilmiştir. Koyuncu (2014) canlı hayvanlardan *M. gallisepticum* tespitinde, trakeal svabların diğer svab örneklerinden daha iyi sonuç verdiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada, canlı hayvanlardan alınan palatine fissure svablarının, pozitif

sonuç elde edilmesinde yeterli olmadığı saptanmıştır. Kloakal svablar ile trakeal dokunun direkt izolasyonunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle, CRD belirtilerinin sürdüğü ileri dönemde, trakeal dokulardan alınan svablardan DNA izolasyonu ve akabinde rPCR testi gerçekleştirilmiştir.

Cookson ve Shivaprasad (1994), *M. gallisepticum* enfeksiyonlarına ait belirtilerin, kanatlı türüne bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı kanatlı türü içerisinde dahi belirtilerde farklılıklar olabileceğini ifade etmişlerdir. Leghorn tip tavukların, diğer tavuk türlerine nazaran hastalıklara daha dayanıklı olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Bohren ve ark., 1982). Bu çalışmada, *M. gallisepticum* prevalansının kanatlı türüne göre farklılık arz ettiği tespit edilmiştir. Pozitif sonuç oranının en yüksek sülünlerde, sonrasında sırasıyla bıldırcın, tavuk ve hindilerde olduğu saptanmıştır. Sülün ve bıldırcınlarda hastalık belirtilerinin daha ağır seyrettiği rapor edilmiştir (Bencina ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda, sülünlerin ve tavus kuşlarının düşük seviyede patojene maruz kalması durumunda dahi ağır hastalık belirtileri gösterdikleri bildirilmiştir (Yoshida ve ark., 2000). Bu çalışmada elde edilen sonuçların, literatürde yapılmış olan çalışmalarla uyumlu olduğu ortaya konulmuştur (Bencina ve ark., 2003).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

M. gallisepticum, kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde ve gıda sektöründe önemli kayıplara sebep olan bir mikroorganizmadır (Arda, 2002). Mortalitesinin düşük, morbiditesinin yüksek olması, çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Aşılama ve biyogüvenlik önlemleri, olası kayıpların azaltılmasında başvurulan yöntemler arasındadır (Junior ve ark., 2017). Tüketim hızında oluşan artış, kanatlı hayvan sağlığı konusunun önem kazanmasını sağlamıştır. Hastalığın izlenmesi için gerekli program oluşturulduğunda, *M. gallisepticum* prevalansını düşüdüğü bildirilmiştir (Michiels ve ark., 2016). Bu nedenle, yaygın enfeksiyon oluşmadan tedbir alınması amacıyla tarama testleri yapılmaktadır. Tarama çalışmalarında sıklıkla lam aglütinasyon ve ELISA testleri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, yeni üretilen antijenler ve ileri teknikler dolayısı ile lam aglütinasyon testinin kullanımı yaygınlaşmıştır (Shoab ve ark., 2019). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde rutin taramaların birden fazla metotla yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

ELISA, lam aglütinasyon ve HI gibi serolojik testlerin hataya açık olduğu ve yanlış pozitif sonuç elde edildiği rapor edilmiştir (Kesler ve ark., 2013). Bu nedenle, serolojik test sonuçlarının kültürel ya da moleküler izolasyon metotları ile doğrulanması önerilmiştir (Dakman ve ark., 2009). Kültürel metotların uzun sürmesi ve saha örneklerinden daha kolay *M. gallisepticum* tespit edilmesi nedeniyle moleküler testlerin tercih edilmektedir (Bibank ve ark., 2013; Tomar ve ark., 2017). Ayrıca, antibiyotik tedavisinin yaygın olarak kullanılmasından dolayı kültürel metotların yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Gondal ve ark., 2015). Bu nedenle, çalışmada *M. gallisepticum* tespiti için rPCR testi tercih edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, rPCR testinin serolojik test sonuçlarının yorumlanmasında önemli olduğu göstermiştir. Hastalık belirtilerinin henüz ortaya çıkmadığı dönemde, sadece rPCR testinde pozitif sonuç elde edilmesi, enfeksiyonun yeni başladığını gösterebilmektedir. Hastalık belirtilerinin devam ettiği ileri dönemde, ELISA ve lam aglütinasyon testlerinde pozitif sonuçların artması, erken dönem rPCR pozitif sonuçları ile yorumlanabilmiştir. Serolojik testlerde elde edilen pozitif sonuçların daimi olması, buna karşın rPCR testinde negatif sonuç elde edilmesi ise hastalığın kronik olduğunu

göstermiştir (Kesler ve ark. 2013) Bu nedenle, rPCR testi ile serolojik test metotlarının uygulanması, hastalık sürecine dair bilgi edinilmesinde temel oluşturmuştur.

Yapılan çalışmalarda, *M. gallisepticum* izolasyonu için çeşitli dokuların ya da dokulardan alınan svabların kullanılabilceği belirtilmiştir (Yılmaz ve ark., 2011). Bazı çalışmalarda; izolasyon için trakeal svabların (Çarlı ve ark., 2003; Koyuncu, 2014; Gondal ve ark., 2015), bazılarında ise trakeal dokunun başarılı olduğu (Cengiz ve ark., 2011) rapor edilmiştir. Bu çalışmada, trakeal dokulardan sıvı forma eksudat geçişinin sınırlı olduğu saptanmıştır. Buna karşın trakeal svablarla direkt eksudat alındığından, eksudatın transport solüsyonunda daha iyi çözüldüğü tespit edilmiştir. Bu durumun test sonuçlarında kayda değer değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, moleküler izolasyon çalışmalarında trakeal svab kullanılması önerilmiştir. Bununla birlikte, izolasyon için kullanılan svabların, transport solüsyonunda uzun süre muhafaza edilmemesi önerilmiştir (Öngör ve ark., 2009).

Sonuç olarak, sadece bir test metodunun uygulanmasının hastalığın tespitinde yeterli olmadığı, tarama çalışmalarında ve prevalansın belirlenmesinde yanlış sonuçlara neden olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar serolojik testlerden elde edilen sonuçların yorumlanmasında rPCR testinin önemini ortaya koymuştur. rPCR testinin gerçekleştirilmesinde ise, trakeal svabların kullanılmasının avantajlı olduğu gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2007, Cellular and molecular immunology, 6. Baskı, Philadelphia, 126-137

Abbas, N., Suleman, M., Khan, N.A., Ali, I., Rauf, M., Rahman, S., 2018, Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in Poultry and Wild Life Birds Suspected of Chronic Respiratory Disease in Northern Pakistan, Pakistan J. Zool., vol. 50(3), 1071-1077

Abd El Ghany, W., 2008, Diagnostic investigation on *Mycoplasma gallisepticum* infections in different Egyptian breeder and broiler chicken flocks, Kahire Üniversitesi

Abdelmoumen, B.B., Roy, R.S., 1995, An enzyme- linked immunosorbent assay for detection of avian mycoplasmas in culture. Avian Dis. 39:85–93.

Abuşoğlu, S., 2015, Mesleki Maruziyetlerde Laboratuvarın Rolü, 27. Ulusal Biyokimya Kongresi

Akan, M., İzgür, M., Sareyyüpoğlu, B., Çiftçi, A., 2008, ICA T.:Tavuklarda solunum sistemi hastalıklarının epidemiyolojisi. Ankara Üniv. BAP Projesi, Ankara

Alessandri, E., Massi, P., Paganelli, F., Prandini, F., Saita, M., 2005, Field trials with the use of a live attenuated temperature-sensitive vaccine for the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in meat-type turkeys. Italian Journal of Animal Science, 4, 282–286.

Allan, W.H., Gough, R.E., 1974, A standard haemagglutination test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. Vet. Rec., 95, 120–123.

Altizer, S., Davis, A.K., Cook, K.C., Cherry, J.J., 2004, Age, sex, and season affect the risk of mycoplasmal conjunctivitis in a southeastern house finch population. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie 82: 755–763.

Ammar, A.M., Abd El-Aziz, N.K., Gharib, A.A., Ahmed, H.K., Lameay, A.E., 2016, Mutations of domain V in 23S ribosomal RNA of macrolide-resistant *Mycoplasma gallisepticum* isolates in Egypt, The Journal of Infection in Developing Countries, 807-813

Arda, M., 2002, Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Kitap Yazarları İzgür, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., Yardımcı, H., Esenal, Ö.M., Medisan Yayınevi, Tıbbi Alet, ISBN: 975 – 7774 – 47 – 2

Arda, M., 2011, Genel Bakteriyoloji’de Koloni Makroskopik Morfolojileri, 4. Baskı, Medisan Yayınları, 19-24, 510-520

Ashley, N.T., Weil, Z.M., Nelson, R.J., 2012, Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. In: Futuyma DJ, editor. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. (Vol. 43), Palo Alto: Annual Reviews, 385–406.

Balish, M.F., Krause, D.C., 2005, Mycoplasma attachment organelle and cell division. In: Mycoplasmas: Molecular Biology, Pathogenicity and Strategies for Control. A. Blanchard and G.F. Browning, eds. Horizon Bioscience, Wymondham, UK. 189–237

Ball, C., Felice, V., Ding, Y., Forrester, A., Catelli, E., Ganapathy, K., 2020, Influences of swab types and storage temperatures on isolation and molecular detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*, Avian Pathology 2020

Başkaya, H., Minbay, A., 1981, Mikoplasma Hastalıkları Kümes Hayvanları Hastalıkları. 119-121 A.Ü. Vet. Fak. Yayın No: 354, A.Ü. Basımevi, Ankara

Bencina, D., Mrzel, I., RoJs, O.Z., Bidovec, A., Dovc, A., 2003, Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. Vet Rec. 152:230–234.

Benzecri, J.P., 1960, Correspondence Analysis, Ortak Oransal Uyum Analizi, Fransa

Bibank, F., Kalidari, G.A., Razmyar, J. And Rad, M. 2013, Isolation of Mycoplasma spp. from broiler flocks with respiratory syndrome in Mashhad, Iran. Iranian J Vet. Sci. Tech., 5 (1): 11-18.

Bloor, W.R., 1920, Outline of a classification of the lipids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 17, 138-140.

Bohren, B.B., Rogler, J.C., Carson, J.R., 1982, Performance at two rearing temperatures of White Leghorn lines selected for increased and decreased survival under heat stress, Poult Sci., Oct;61: 1939-43

Bokhari, S.A., 2007, Mycoplasma gallisepticum çalışması, Kaliforniya Üniversitesi, 20.04.2007, 15-30

Bottinelli, M., Passamonti, F., Rampacci, E., Stefanetti, V., Pochiero, L., Coletti, M., Rueca, F., Hyatt, D.R., Schnee, C., 2017, DNA microarray assay and real-time PCR as useful tools for studying the respiratory tract Mycoplasma populations in young dairy calves, Journal of Medical Microbiology, Volume 66, Yayın 9

Bradbury, J.M., Abdulvahab, O.M.S., Yavari, C.A., Dupillet J.P., Bové, J.M., 1993, Mycoplasma imitans sp. nov. Is Related to *Mycoplasma gallisepticum* and Found in Birds, International Journal of Systematic Bacteriology, 721-728

Bradbury, J.M., Yavari, C.A., Dare, C.M., 2001, Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges, 391-396

Branton, S.L., Gerlach, H., Kleven, S.H., 1984, *Mycoplasma gallisepticum* Isolation of Layers, Poultry Science, 1917-1919

Branton, S.L., Lott, B.D., May, J.D., Maslin, W.R., Boyle, C.R., Pharr, G.T., 1997, The effects of F strain *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and the dual infection in commercial layer hens over a 44- week laying cycle when challenged before beginning of lay. Egg production and selected egg quality parameters, Avian Diseases, 41, 832-837

Buim, M.R., Mettefigo, E., Timenetsky, J., Kleven, S.H., Ferreria, A.J.F., 2009, Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry

Büyüktañır, Ö., Yıldırım, T., Yakıcıer, C., Genç, O., Yurdusev, N., 2008, A recombinant PvpA protein-based diagnostic prototype for rapid screening of chicken *Mycoplasma gallisepticum* infections, Veterinary Microbiology, 139-149

Cacherill, F.R., Uhl, J.R., 2001, Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications. 1st ed., 11.

Callison, S.A., Ribler, S.M., Sun, S., Ikuta, N., Hilt, D., Leiting, V., Kleven, S.H., Saurez, D.L., Garcia, M., 2006, Development and Validation of a Real-Time Taqman Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Naturally Infected Birds

Canter, J.A., Tulman, E.R., Beaudet, J., Lee, D., May, M., Szczepaner, S.M., Geary, S. J., 2019, Transcriptional and pathological host responses to co-infection with virulent or attenuated *Mycoplasma gallisepticum* and low pathogenic avian influenza A virus in chickens, Infect. Immun. doi:10.1128/IAI.00607-19, American Society for Microbiology.

Cengiz, Ş., Babacan, O., Dinç, G., Akan, M., 2011, Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* infeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile teşhisi, Etlik Vet Mikrobiyol Dergisi, 45-48

Charlton, B.R., Bermudez, A.J., Boulianne, M., Eckroade, R.J., Jeffrey, JS, Newmann, L.J., Sander, J.E. ve Wakenell, P.S., 1996, Avian Disease Manual American Association of Avian Pathologists Poultry Pathology Laboratory University of Pennsylvania, Pennsylvania

Cizelj, I., Bercic, R.L., Dusanic, D., Narat, M., Kos, J., Dovc, P., Bencina, D., 2011, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. Microbiology. 157:362–372

Cohen, J., 1960, A coefficient of agreement for nominal scales, Educational and Psychological Measurement, 20:37-46.

Cookson, K.C., Shivaprasad, H.L., 1994. *Mycoplasma gallisepticum* infection in chukar partridges, pheasants, and peafowl. Avian Dis. 38:914–921.

Czifra, G., Sundqist, B.G., Tubolty, T., Stipkovits, L., 1993, Evaluation of a Monoclonal Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum*-Specific Antibodies, *Avian Disases* 37(3):680-8

Çarlı, K.T., Eyigor, A., 2003, Real-time polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. *Araştırma makalesi, Avian Diseases*, 47 , 712 /717

Çarlı, K.T., 2018, Kanatlı Hayvanların Enfeksiyon Hastalıkları, Kronik Solunum Yolu Hastalığı bölümü, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN: 978-605-9215-65-7, 267-277

Dakman, A., Günaydın, E., Türkyılmaz, M.A., Güleç, M., Coşar, M., Özdemir, Ü., 2009, Damızlık Tavuk İşletmelerinde Tespit Edilen Mikoplazma İnfeksiyonları, *Etlik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü*, 2-14

Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., 1973, *Infecções bacterianas e micóticas*. São Paulo (SP), EDART, 1-9.

De Cock, M., Virgilio, M., Vandamme, P., Augustinos, A., Bourtzis, K., Willems, A., De Meyer, M., 2019, Impact of Sample Preservation and Manipulation on Insect Gut Microbiome Profiling. A Test Case with Fruit Flies (Diptera, Tephritidae), *Frontiers in Microbiology*, Aralık 2019 sayısı, 10

Delaplane, J.P., Stuart, H.O., 1943, The propagation of a virus in embryonated chicken eggs causing a chronic respiratory disease of chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 4:325-332

Dhondt, A.A., DeCoste, J.C., Ley, D.H., Hochacka, Q.M., 2014, Diverse Wild Bird Host Range of *Mycoplasma gallisepticum* in Eastern North America, 1-7

Dodd, S. 1905. Epizootic pneumo-enteritis of the turkey, *J Comp. Pathol. Ther.* 18, 239–245

Donnelly, T.M., 2004, Disease problems of small rodents. Ferrets, Rabbits, and Rodents *Clinical Medicine and Surgery*, 2nd edition. K.E. Quesenberry and J.W. Carpenter (eds.).St. Louis, Missouri: Saunders, 299-315.

Doosti, A., Gholami, M., Arshi, A., Bagheri, H., 2011, Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Charmahal Va Bakhtiari Province Poultry Using PCR, *International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences (ICABPS'2011) Bangkok Dec*, 216-219

Eischeid, A.C., 2011, SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR, *BMC Res Notes*. 2011 Jul 28;4:263

Eissa, S. I., El-Shater, S. A., Dardeer, M. A., Abd ElAziz, E. E., Hanaa, A. A., Anne, V. G. B., 2009, Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Day-Old Chicks Using Molecular Characterization

El-Aziz, N.K.A., Eldesoky, I. E., Ammar, A.M., Eissa, S.I., Mohamed, Y.H., 2014, Molecular studies on *M. gallisepticum* and avian pathogenic *E. coli* induced infections in broilers. *Eur. J. Vet. Med.*, Vol. 4.

Elfaki, M.G., Kleven, S.H., Jin, L.H., Ragland, W.L., 1993, Protection against airsacculitis with sequential systemic and local immunization of chickens using killed *Mycoplasma gallisepticum* bacterin with iota carrageenan adjuvant. *Vaccine*. 11:311–317

El Gazzar, M., Laibinis, V.A., Ferguson-Noel, N., 2011, Characterization of a ts-11-like *Mycoplasma gallisepticum* isolate from commercial broiler chickens. *Avian Dis.* 55:569–574

Ellakany, H., Fabian, K., Nemeth, I., Stipkovits, L., 1998, Antibody response detected by immunoblot in respiratory tract washings of chickens after infection with *Mycoplasma gallisepticum*, *Avian Pathology*, 27, 547-554

Erdağ, O., Türkaslan, J., 1988, Kanatlı Mycoplasmalarının laboratuvar teşhis yöntemleri, *Pendik Hayv. Hast. Mrk. Araşt. Enst. Der.*, 19, 85-97

Esental, Ö.M., 1994, Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum*'a Karşı Oluşan Antikorların Çeşitli Yöntemlerle (SPA, HI, AGP, ELISA) Saptanması, *A.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18-47

Esental, Ö.M., 2002, Mikoplazma Enfeksiyonları, Kanatlı Hayvan Hastalıkları, *Medisan Yayınevi, Tıbbi Alet*, ISBN: 975 – 7774 – 47 – 2, 79-93

Evans, J.D., Leigh, S.A., Branton, S.L., Collier, S.D., Pharr, G.T., Bearson, S.M.D., 2005, *Mycoplasma gallisepticum*: current and developing means to control the avian pathogen. *Poultry Science* 2005; 14: 757-763

Fan, H.H., Kleven, S.H., Jackword, M.W., 1995, Application of Polymerase Chain Reaction with Arbitrary Primers to Strain Identification of *Mycoplasma gallisepticum*, *Avian Disases*, 39:729-735

Feberwee, A., Mekkes, D.R., de Wit, J.J., Hartman, E.G., Pijpers, A., 2005, Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections, *Avian Disease Jun* 49(2):260-8

Ferguson-Noel, N., Hepp, D., Sun, S., Ikuta, N., Levisohn, S., Kleven, S. Garcia, M., 2005, Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiology*, 151(6): 1883–1893.

Ferguson-Noel, M., Victoria, A.L., Farrar, M., 2011 Influence of swab material on the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by real-time PCR, *Avian Diseases*, vol. 56, no. 2, 310–314

Ferguson-Noel, M., 2013, Mycoplasmosis. Introduction, In Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V (ed), Diseases of poultry, Wiley-Blackwell, Ames, IA. İntroduction bölümü, 875-876

Ferguson-Noel, M., Kleven, S.H., 2016. Mycoplasma species. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, 6th edn. S.M. Williams, L. Dufour-Zavala, M.W. Jackwood, M.D. Lee, B. Lupiani, W.M. Reed, E. Spackman, and P.R. Woolcock, eds. American Association of Avian Pathologists. 63–70.

Fleiss, J.L., 1971, Measuring nominal scale agreement among many raters. Psychological Bulletin. 1971;7:378-382.

Frega, A.P., Vergas, T., Ikuta, N., Fonseca, A.S., Celmer, A.J., Marques, E.K., Klunge, V.R., 2013, A Multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks.

Garcia, M., Jackwood, M.W., Levisohn, S., Kleven, S.H., 1996, Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multiple-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Avian Diseases, 39, 606-616.

Garmyn, A., Vereecken, M., De Gussem, K., Depondt, W., Haesebrouck, F., Martel, A., 2018, Efficacy of Tylosin and Tilmicosin Against Experimental *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens, Avian Diseases, 63(2), 359-365

Gary, D. B., 2004, *Mycoplasma gallisepticum*- A continuing problem in commercial poultry. Copyrighted by the University of Florida, Institute Food and Agricultural Sciences (UF/IFAS).

Gaunson, J.E., 2000, Immune responses to *Mycoplasma gallisepticum* infection, Melbourne Üniversitesi, doktora tezi

Gaunson, J.E., Philip, C.J., Whithear, K.G., Browning, G.F., 2006, Age related differences in the immune response to vaccination and infection with *Mycoplasma gallisepticum*. Vaccine. 24:1687–1692.

Geary, S.J., Forsyth, M.H., Abdul Saoud, S., Wang, G., Berg, D.E., Berg, C.M., 1994, *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting, Molecular and Cellular Probes, 311-316

Gerchman, I., Lysnyansky, I., Perk, S., Levisohn, S., 2008, In vitro susceptibilities to fluoroquinolones in current and archived *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from meat-type turkeys, Veterinary Microbiology 131 (2008), 266-276

Gerchman, I., Levisohn, S., Mikula, I, Manso-Silván L, Lysnyansky I, 2011, Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry. Vet Res 2: 42-90

Gharibi D., Ghadimipour R., Mayahi M., 2018, Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* among commercial poultry in Khouzestan province, Iran. Arch Razi Inst;73:139–46.

Gibb, A.P., Wong, S., 1997, Inhibition of PCR by Agar from Bacteriological Transport Media, Journal of Clinical Microbiology, Ocak 1998, 275-276

Glisson, J.R., Dawe, J.F., Kleven, S.H., 1984, The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence on nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. Avian Disases, 28 (2), 397-405.

Gondal, M.A., Rabbani, M., Muhammad, K., Yaqub, T., Babar, M.E., Sheikh, A.A., Ahmad, A., Shabbir, M.Z., ve Khan, M.I., 2015, Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* Isolated From Commercial Poultry Flocks, The Journal of Animal & Plant Sciences, 25(1): 2015, 108-113 ISSN: 1018-7081

Gowaty, P.A., Plissner, J.H., 2015, Eastern Bluebird (*Sialia sialis*), In The Birds of North America. Cornell Lab of Ornithology

Grodio, J. L., Dhondt, K. V., O'Connell, P. H., Schat, K. A., 2008, Detection and quantification of *Mycoplasma gallisepticum* genome load in conjunctival samples of experimentally infected house finches (*Carpodacus mexicanus*) using real-time polymerase chain reaction, Avian Pathology (August 2008), 385-391

Grodio, J. L., 2013, *Mycoplasma gallisepticum* Infection in House Finches: Virulence, Immunogenicity and Chronic Disease, 68-95

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

Gupta, A., Ezzeldin, T., Agrawal, P., 2009, Mycoplasma complicated chronic respiratory disease (CCRD): A review. Published on 06.10.2009 a en.engormix.com

Güler, L., 1992, Konya bölgesindeki kümes hayvanlarında serolojik yoklamalarla müspet bulunan CRD vakalarından etken izolasyon çalışmaları, Veterinerlik Yüksek Lisans Tezi – Konya Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü

Gürbüz, E., 2008, Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae*'nin Tanısında PZR Kullanımı, Doktora Tezi, 40-57

Gwet, K., 2010, Handbook of Inter-Rater Reliability, 2. Basım

Hannan, P.C., 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet. Res. 31, 373–395

Hashemi, S., Mahzounich, M., Sheiki, N., Ebrahimi, A., 2018, Application of high-resolution melting-curve analysis on pvpA gene for detection and classification of

Mycoplasma gallisepticum strains, Microbial Pathogenesis, doi: 10.1016/j.micpath.2018.06.032

Hawley, D.M., Dhondt, K.V., Dobson, A.P., Grodio, J.L., Hochachka, W.M., Ley, D.H., Osnas, E.E., Schat, K.A., and A.A. Dhondt, 2010, Common garden experiment reveals pathogen isolate but no host genetic diversity effect on the dynamics of an emerging wildlife disease. *Journal of Evolutionary Biology*. 23: 1680-1688.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996, Real Time Quantitative PCR, *GenomeRes*. 1996, Ekim;6(10), 986-994

Hofacre, C.L., White, D.G., Maurer, J.J., Morales, C., Lobsinger, C., Hudson, C., 2001, Characterization of antibiotic-resistant bacteria in rendered animal products. *Avian Dis*, 45, 953–961.

Hong, Y., Garcia, M., Levisohn, S., Savelkoul, P., Leiting, V., Lysnyansky, I., Ley, D.H., Kleven, S.H., 2005, Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. *Avian Dis* 49: 43– 49

Indikova, I., Much, P., Stipkovits, L., Siebert-Gulle, K., Szostak, M.P., Rosengarten, R., 2013, Role of the GapA and CrmA cytoadhesins of *Mycoplasma gallisepticum* in promoting virulence and host colonization. *Infect. Immun* 2013;81:1618–24

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

İzgür, M., 1983, Kanatlılarda mycoplasma enfeksiyonları. Kanatlı hayvanların enfeksiyon hastalıkları ve laboratuvar teşhis yöntemleri. *Pendik Vet. Kont. Arş. Enst. Yayın No:7, yayın no:65-71*.

Jan, F., Abbas, N., Ahmad, M., 2018, Seropositivity, Involvement in Suspected Cases of Chronic Respiratory Diseases and Comparative Efficacy of Various Sero-Diagnostic Tests of *Mycoplasma gallisepticum*, *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 8(3)137-141, 137-141

Jibrill, Y., Aswaf, Y., Gebregziabher, B., Issa, A., 2018, Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in domestic chickens, East Shewa, Ethiopia, *Etiyopya*, 79-84

Jordan, F.T., Forrester, C.A., Ripley, P.H., Burch, D.G., 1998, In vitro and in vivo comparisons of valnemulin, tiamulin, tylosin, enrofloxacin, and lincomycin/spectinomycin against *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Disases*, 42 (4), 738-745.

Junior, M.A., Taunde, P., Zandamela, A.F., 2017, Serological screening suggests extensive presence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in backyard chickens in Southern Mozambique. *Journal of Veterinary Medicine* 4:1-4.

Kahya, S., Temelli, S., Eyigör, A., Çarlı, K.T., 2010, Real-time PCR culture and serology for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken breeder flocks, *Veterinary Microbiology* 144 (2010), 319–324

Kanık, E.A., Temel, G.O., Kaya, İ.E., 2010, Fleiss Kappa ve Krippendorff Alpha Uyum Katsayılarının Örneklem Genişliği, Değerlendirici Sayısı ve Kullanılan Ölçeğin Kategori Sayısından Etkilenme Durumları Üzerine Bir Benzetim Çalışması, *Original Research*, 74-81

Kappe, R., Schulze-Berge, A., 1993, New Cause for False-Positive Results with the Pastorex Aspergillus Antigen Latex Agglutination Test, *Journal of Clinical Microbiology*, Eylül 1993 sayısı, 2489-2490

Kempf, I., Gesbert, F., 1998, Comparison of serological tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens, *Veterinary Microbiology*, 60, 207-213

Kesler, K., Güler, L., Orhan, G., 2013, Yumurtacı tavuk işletmelerinde *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun çabuk serum aglütinasyon, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleriyle araştırılması, *Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü*, 42080, 76-80

Khalifa, K.A., Abdelrahim, E.S., Badwi, M., Mohamed, A.M., 2013, Isolation and Molecular Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in Chickens in Sudan, *Hindawi Publishing Corporation*, 1-4

Kılıç, S., 2015, Kappa Testi, İstatistiksel İfadeyle (Statistically Speaking), doi:10.5455/jmood.201509201154339, 142-144

Kleven, S.H., 1998, *Mycoplasmosis In a laboratory manual for the isolation and identificaiton of avian pathogens*, Düzenleyen Swayne DE, The American Association of Avian Pathologists yayınları, Inc, 2-18

Kleven, S.H., 2003, *Mycoplasmosis In “Diseases of poultry”* Ed. by Saif YM 11 th edition, Iowa State Press Iowa, 807-834

Koyuncu Doğan, G., 2014, İzmir İlinde Bulunan Kümeslerde *Mycoplasma synoviae* Varlığının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 9-34

Lam, K.M., 2002, The macrophage inflammatory protein-1beta in the supernatants of *Mycoplasma gallisepticum*-infected chicken leukocytes attracts the migration of chicken heterophils and lymphocytes. *Dev Comp Immunol.* 26:85–93.

Landis, J.R., Koch, G.G., 1977, The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159-74.

Landman, W.J.M., 2014, Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands, *Avian Pathology*, 1-6

Lauerma, L.H., 1998, *Mycoplasma* PCR Assays, In Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases, L. H. Lauerma (ed.), American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 41–43

Levisohn, S., Kleven S.H., 2000, Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*), Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 425-442

Ley, D.H., 2003, *Mycoplasma gallisepticum* infection. In Disease of Poultry, Düzenleyen; Saif, Y.M., 11th edition, Iowa State Press, Amerika, 719-743.

Ley, D.H., 2008, *Mycoplasma gallisepticum* Infection, In Diseases of Poultry, Düzenleyenler; Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E., Ames, I.A.: Blackwell; 807-834.

Luttrell, M.P., Fischer, J.R., Stallknecht, D.E., Kleven, S.H., 1998, Natural *Mycoplasma gallisepticum* infections in a captive flock of house finches, Journal of Wildlife Disases, 259-296

Luttrell, M.P., Stallknecht, D.E., Kleven, S.H., Kavanaugh, D.M., Corn, J.L., 2001, *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. Avian Diseases, 45: 321-329.

Majumder S, Zappulla F, Silbart LK. 2014. *Mycoplasma gallisepticum* lipid associated membrane proteins up-regulate inflammatory genes in chicken tracheal epithelial cells via TLR-2 ligation through an NF- κ B dependent pathway. Plos One 9:e112796.

Marois, C., J.-P. Picault, M. Kobisch, and I. Kempf. Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. Vet. Res. 36:759– 769. 2005.

Masukagami, Y., De Souza, D.P., Dayalan, S., Bowen, C., O'Callaghan, S., Kouremenos, K., Nijagal, B., Tull, D., Tivendale, K.A., Markham, P.F., McConville, M.J., Browning, G.F., Sansoma, F.M., 2017, Comparative Metabolomics of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma gallisepticum* Reveals Fundamental Differences in Active Metabolic Pathways and Suggests Novel Gene Annotations, 1-13

McGregor, A., Moore, D.A., 2015, Infectious causes of fever of unknown origin, Clinical Medicine 2015, Vol 15, No:3:285-287

Mekkes, D.R., Feberwee, A., 2005, Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*, 348-354

Mendonça, G.A., Nascimento, E.R., Lignon, G.B., Nascimento, M.G.F., Polo, P.A., 2000, PCR na detecção de *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) em galinhas poedeiras vacinadas com MG-F e com doença respiratória, 2-11.

Mercia, L., 2001, Storey's Guide to Raising Poultry, 1. North Adams, MA: Storey Publishing, 272–73.

Michiels, T., Welby, S., Vanrobaeys, M., Quinet, C., Rouffaer, L., Lens, L., Martel, A., and Butaye, P., 2016, Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium Avian Pathol., 45(2): 44-252.

Morowitz, H.J., Maniloff, J., 1966, Analysis of The Life Cycle of *Mycoplasma gallisepticum*, J Bacteriol, Nisan, 1938-1644

Morsy, M.A., Panangala, V.S., Gresham, M.M., 1991, Identification of *Mycoplasma gallisepticum* by use of monoclonal antibody in a rapid slide agglutination test, Am. J. Vet. Res 52:1602-1605

Mukhtar, M., Awais, M.M., Anwar, M.I., Hussain, Z., Bhatti, N. and Ali, S., 2012, Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* among commercial layers in Faisalabad, Pakistan. J. Basic appl. Sci., 8: 1

Neuendorf, K., 2002, The Content Analysis Guidebook, Sage Publications, Thousand Oaks, CA

Nicholas, R.A.J., Fox, L.K., Lysnyansky, I., 2016, Mycoplasma Mastitis in Cattle, The Veterinary Journal, <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.tvjl.2016.08.001>

Noormohammadi, A.H. 2007. Role of phenotypic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis. Avian Pathol. 36:439–444.

OIE, 2008, Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.3.5. www.oie.int, 482-496.

OIE, 2018, World Organisation for Animal Health, Office International des Epizooties, Paris, Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.3.5. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00104.html, 482-496.

Osman, K.M., Aly, M.M., Amin, Z.M.S., Hasann, B.S., 2009, *Mycoplasma gallisepticum*: an emerging challenge to the poultry industry in Egypt. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 28 (3): 1015 - 1023.

Osnas, E.E., Hurtado, P.J., Dobson, A.P., 2015, Evolution of Pathogen Virulence across Space during an Epidemic, The American Naturalist, 332 – 342

Öngör, H., Kalın, R., Karahan, M., Çetinkaya, B. ve Akan, M., 2009, Detection of mycoplasma species in turkeys by culture and polymerase chain reaction, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 28 (3), 1103-1109

Özdemir, Ö., Erer, H., 2008, Pathological and microbiological investigations on the lesions of the respiratory systems of laying hens. Eurasian Journal of Veterinary Sciences. 24: 55-68

Özdemir, Ö., Yavuz, O., Erer, H., Sayın, Z., 2019, Investigations of Pathological Immunohistochemical and Immunocytochemical Findings in Natural Infection with *Mycoplasma gallisepticum* in Laying Hens, *Acta Scientiae Veterinariae*, 47: 1655, 1 – 8

Özgün, M.A., 2015, Kanatlı Kan Serumlarında *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae* Antikorlarının ELISA ile Tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mik-YL-2015-0006, 20-32

Papazisi, L., Frasca, S., Gladd, M., Liao, X., Yogev, D., Geary, S.J., 2003, GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. *Infect Immun* 70: 6839 – 6845.

Parte, A., Krieg, N.R., Ludwig, W., Whitman, W.B., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., and Brown, D., 2011, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer New York

Pitcher, D.G., Nicholas, R.A., 2005, Mycoplasma host specificity: fact or fiction? *Vet J* 170:300 –306

Radi, Z.A., Trampel, D.W., Smith, B.S., Rosenbusch, R.E., Goll, E., 2000, Immunohistochemical detection of *Mycoplasma gallisepticum* antigens in turkey respiratory tissues, *Avian Disases* 44, 399-407

Rajkumar, S., Reddy, M.R., Somvanshi, R., 2018, Molecular Prevalence and Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in Indian Poultry Flocks, *Journal of Animal Research*: v.8 n.1, 15-19.

Raviv, Z., Ley, D.H., 2013, Mycoplasmosis: *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, editors. *Diseases of poultry*. 13th ed. Ames: Wiley-Blackwell, 877–93.

Razin, S., Freundt, E.A., 1984, The mycoplasmas. Krieg Nr, Holt JG. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, 1, Williams & Wilkins, Baltimore, 740-760

Ricketts, C., Pickler, L., Maurer, J., Ayyampalayam, S., Garcia, M., Ferguson, Noel, M., 2016, Identification of Strain-Specific Sequences That Distinguish a *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strain from Field Isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, 244-252

Riffe, D., Lacy, S., and Fico, F., 2005, *Analyzing Media Messages: Using Quantitative Content Analysis in Research*, 2nd ed., Lawrence Erlbaum, Mahwah, NJ

Roberts, D.H., 1969, Serological response produced in chickens by three strains of *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Appl. Bacteriol.* 32:395-401

Romagnani, S., 1994, Lymphokine production by human T cells in disease states, *Annual review of immunology*, 12: 227-57

Salisch, H., Hinz, K.H., Graack, H.D., ve Ryll, M., 1998, A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma*

gallisepticum and *Mycoplasma synoviae* in concurrently infected chickens, Avian Pathology, 27, 142- 147.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning, a Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring

Sareyyüpoğlu, B., 2014, Kanatlı Hastalıkları. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Teşhiste Method Birliği, 257-285.

Sarkar, S.K., Rahman, M.B., Rahman, M., Amin, K.M.R., Khan, M.F.R., Rahman, M.M., 2005, Sero-prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens in model breeder poultry farms of Bangladesh. Int J Poult Sci 4: 32-35.

Schmid-Hempel, P., 2009, Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for “macroscopic phenomena” such as virulence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci; 364:85–98.

Scott, W., 1955, Reliability of content analysis: The case of nominal scale coding, Public Opinion Quarterly, 19(3), 321-325.

Seifi, S., Shirzad, M.R., 2012, Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma gallisepticum* infection in Iranian broiler breeder farms, Int J Animal Veterinary Adv 4:45-8.

Seyfullahoğulları, A., 2003, Çapraz Tabloların Analizi ve Ticari Malların değerlendirilmesiyle İlgili Bir Uygulama, İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, Sayı:4, Aralık.

Shafer-Weaver K.A., Sordillo, L.M., 1996, Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76491-3

Shah, A.H., 2018, Seroprevalance of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in Commercial Broilers and Backyard Poultry in Five Districts of Khyber Pakhtunkhwa-Pakistan. Pak Vet J 38:149-152

Sharma, J.M., 1994, Avian respiratory immunity and immunosuppression., American Academy of Addiction Psychiatry (AAAP) 10 Haziran Kongresi, San Francisco

Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J., 1973 Detection of two restriction endonuclease activities in H. parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry; 12:3055–3063

Shoab, M., Riaz, A., Hassan, M., Yousaf, A., Rehman, S., Zafar, M.A., Kamran, M., Amir, R.M., Malik, A.M., 2019, Sero-Prevalance and Associated Risk Factors of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Salmonella Pullorum / Gallinarum* in poultry, Pakistan Veterinary Journal, 19-165

Silveira, R.M., Fiorentin, L., Marques, E.K., 1996, Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* diagnosis, Avian Diseases, 40(1), 218-222.

Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980, Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach, 2. baskı. New York

Stipkovits, L., Kempf, I., 1996, Mycoplasmoses in poultry. Scientific and Technical Review, Office International des Epizooties; 15: 1495-1525.

Sydenstricker, K.V., Dhondt, A.A., Hawley, D.M., Jennelle, C.S., Kollias, H.W., 2006, Characterization of experimental *Mycoplasma gallisepticum* infection in captive house finch flocks. Avian Diseases 50: 39-44.

Talha, A.F.S.M., 2003. Investigation on the prevalence and significance of *M. gallisepticum* in village chickens and possibility of establishing *M. gallisepticum* free flocks and significance of *M. gallisepticum* on different production parameters in layer chickens in Bangladesh. Yüksek Lisans Tezi, 3-11

Talkington, F.D., Kleven, S.H., Brown, J., 1985, An Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in Experimentally Infected Chickens. Avian Diseases, 29:53-70.

Tan, C.G., Hoo, C.H., Ideris, A., Hair-Bejo, M., Omar, A.R. ve Kleven, S.H., 2016, Pathogenicity of various *Mycoplasma gallisepticum* strains in vaccinated and non-vaccinated breeders flocks' chicken embryos, SCIREA Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 14-15

Timms, I.M., Cullen, G.A., 1974, Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in chickens and in differentiation from *Mycoplasma gallisepticum* infection, Vet J., 75-84

Tomar, P., Singh, Y., Mahajan, N.K., Jindal, N. Ve Sing, M., 2017, Molecular Detection of Avian Mycoplasmas in Poultry Affected with Respiratory Infections in Haryana (India), International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences ISSN: 2319-7706 Volume 6 Number 6, 2155-2162

Tseng, C.W., Chiu, C.J., Kanci, A., Noormohammadi, A.H., Browning, G.F., Markham, P.F., 2017, Safety and efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* oppD knockout mutant as a vaccine candidate, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.073>

Tuzcu, M., Özmen, M., Karakoç, S.R., Tuzcu, N., Yoldaş, A., 2012, Diagnosis of mycoplasmosis in chicks by pathological and Real Time-PCR methods, Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 82-86

Ülgen, M., 1991, Kanatlıların Kronik Solunum yolu enfeksiyonu üzerinde karşılaştırılmalı bakteriyolojik ve serolojik araştırmalar, doktora tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Vinkler, M., Leon, A.E., Kirkpatrick, L., Dalloul, R.A., Hawley, D.M., 2018, Differing House Finch Cytokine Expression Responses to Original and Evolved Isolates of *Mycoplasma gallisepticum*

Waldmann, T.A., Tagaya, 1999, The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. Annual Review Immunology, 1999. 17: 19-49

Wang, H., Fadl, A.A., Khan, M.I., 1997, Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas, Molecular and cellular probes, 11, 211-216.

Wasowicz, W., Neve, J., Peretz, A., 1993, Optimized Steps in Fluorometric Determination of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in Serum: Importance of Extraction pH and Influence of Sample Preservation and Storage, 2522-2526

Whithear, K.G., 1996, Control of avian mycoplasmoses by vaccination. Rev Sci Tech. 15:1527–1553.

Wijesurenda, D.S., Kanci, A., Tivendale, K.A., Devlin, J.M., Wawegama, N.K., Bacci, B., Noormohammadi, A.H., Markham, P.F., Browning, G.F., 2017, Immune responses to vaccination and infection with *Mycoplasma gallisepticum* in turkeys, Avian Pathology, 464-473

Wolffs, P., Norling, B., Radström, P., 2005, Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells, Journal of Microbiological Methods, 315-323

Yılmaz, F., Timurkaan, N., Kılıç, A., Kalender, H., Kılınc, Ü., 2011, Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in chickens by immunohistochemical, PCR and culture methods, Revue Médicine. Vétérinaire, 2011, 162, 2, 79-86

Yoder, J.R., Calnek, B.W., Burnes, H.J., Beard, C.W., 1991, *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Yoder Jr HW, editors. Diseases of Poultry. Ames, Iowa, USA. Ames: Iowa State University Press; 198-212

Yoshida, S., Fujisawa, A., Tsuzaki, Y., Saitoh, S., 2000, Identification and expression of a *Mycoplasma gallisepticum* surface antigen recognized by monoclonal antibody capable of inhibiting both growth and metabolism. Infection and Immunity 68, 3186-3192

Younis, G.A.M., AbdülGawad R.H., Elkenany, R.M., Glal, A.F., 2018, Molecular Identification and Sequencing of *Mycoplasma gallisepticum* Recovered from Broilers in Egypt, Pakistan Journal of Biological Sciences , DOI: 10.3923/pjbs.2018.253.261, 253-261

Zain, Z.M. ve Bradbury, J.M., 1995, The influence of type of swab and laboratory method on the recovery of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in broth medium, Avian Pathology (1995) 24, 707-716

Zander, D.V., 1961, Origin of S6 strain Mycoplasma, Avian Disases, 5: 154-156

Zanella, A., Martino, P.A., Pratelli, A., Stonfer, M., 1998, Development of antibiotic resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro, Avian Pathology (1998), 27, 591-596

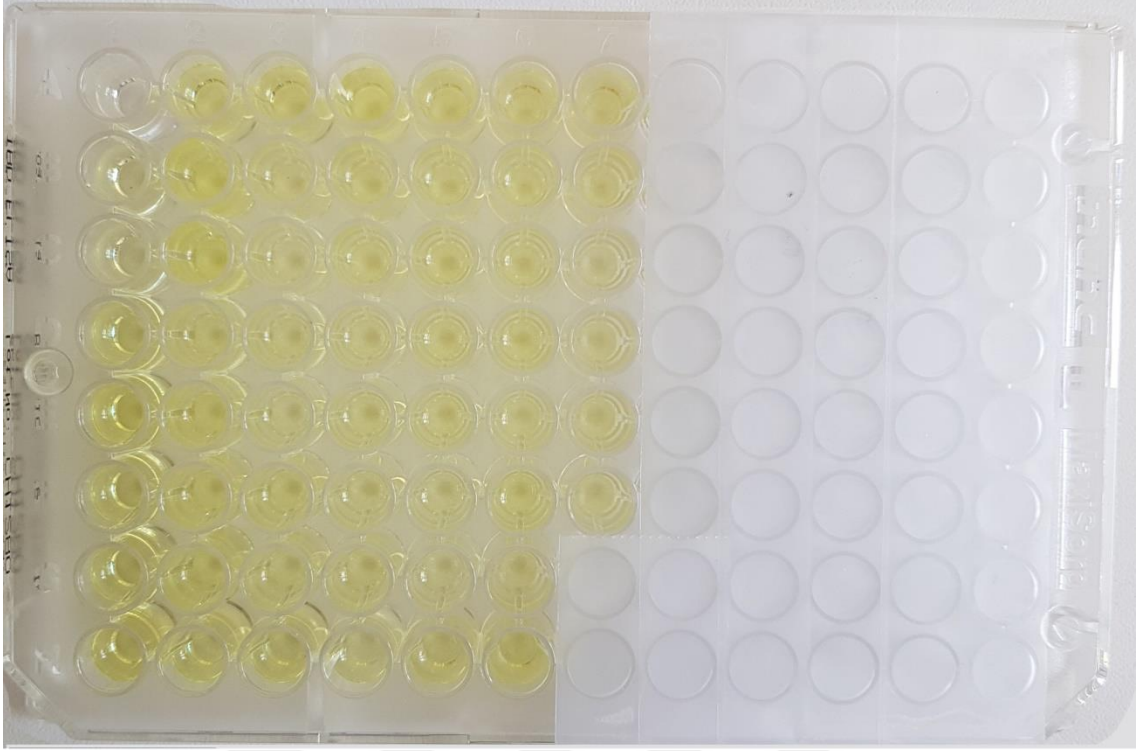
Zhang, K., Han, Y., Wang, Z., Zhao, Y., Fu, Y., Peng, X., 2019, gga-miR-146c Activates TLR6/MyD88/NF- κ B Pathway through Targeting MMP16 to Prevent *Mycoplasma gallisepticum* (HS Strain) Infection in Chickens, Cells 2019 Dergisi, 8, 501



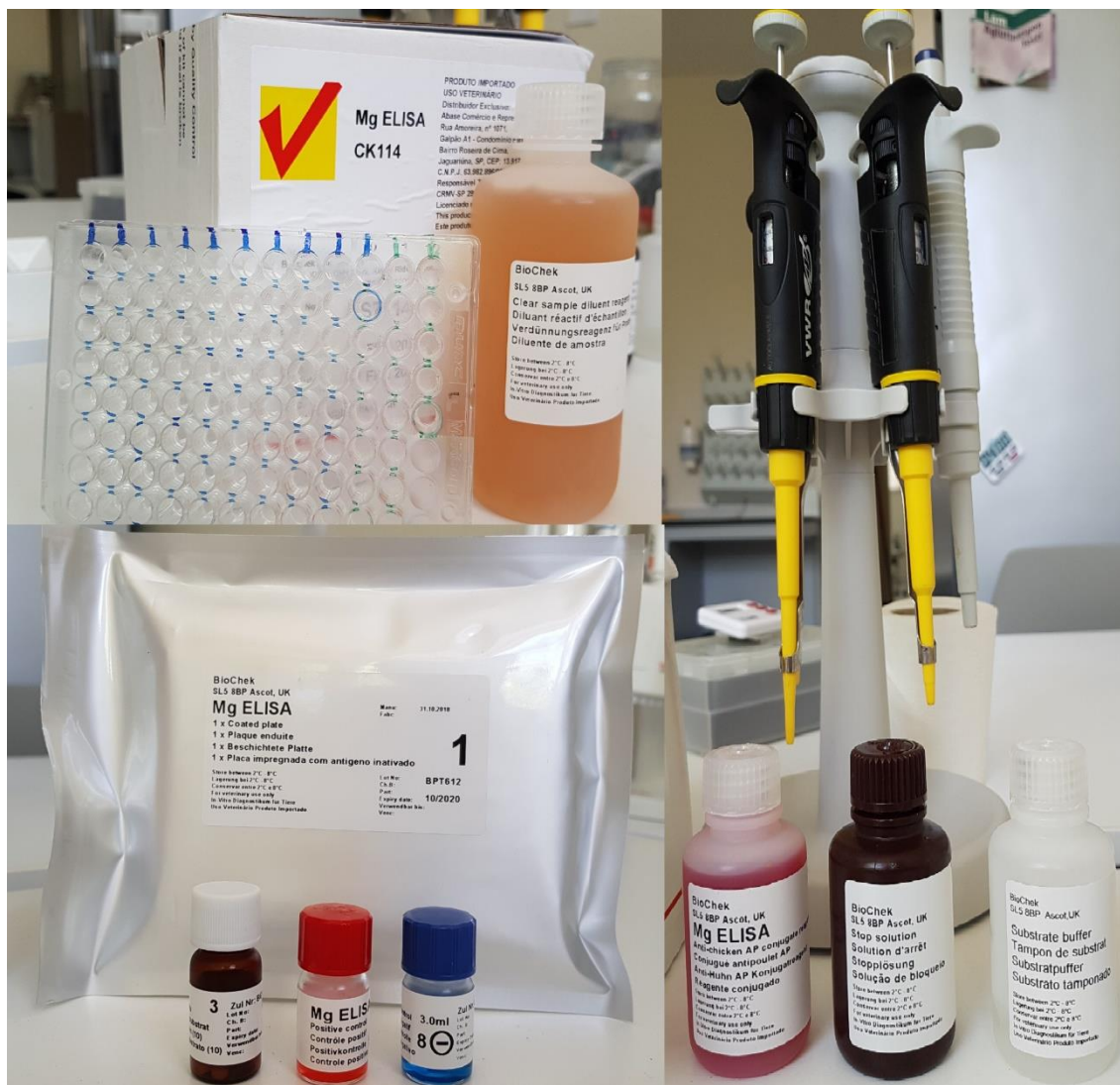
EKLER

EK-1 *Mycoplasma gallisepticum*'un tespitinde kullanılan iki lam aglütinasyon antijenleri

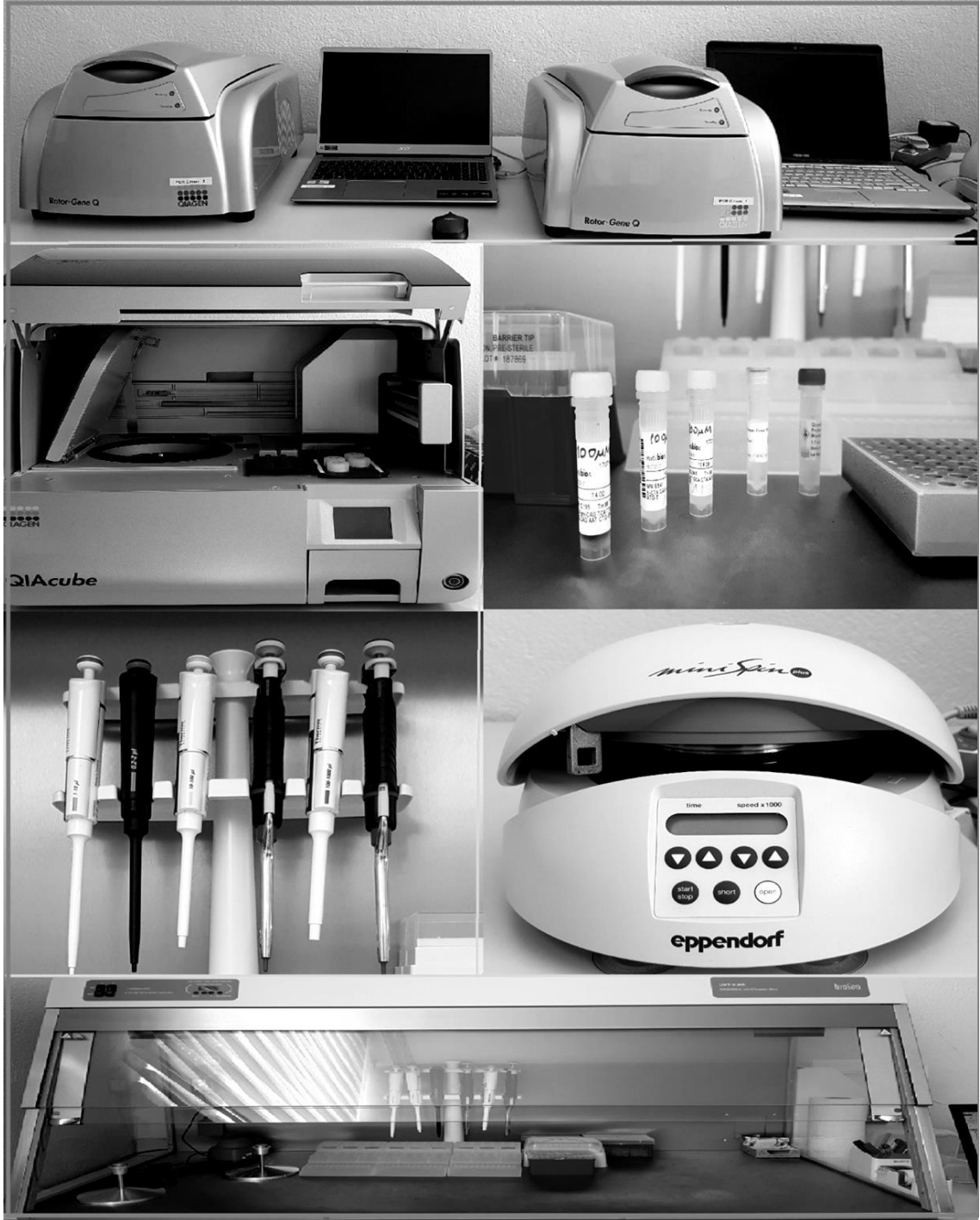


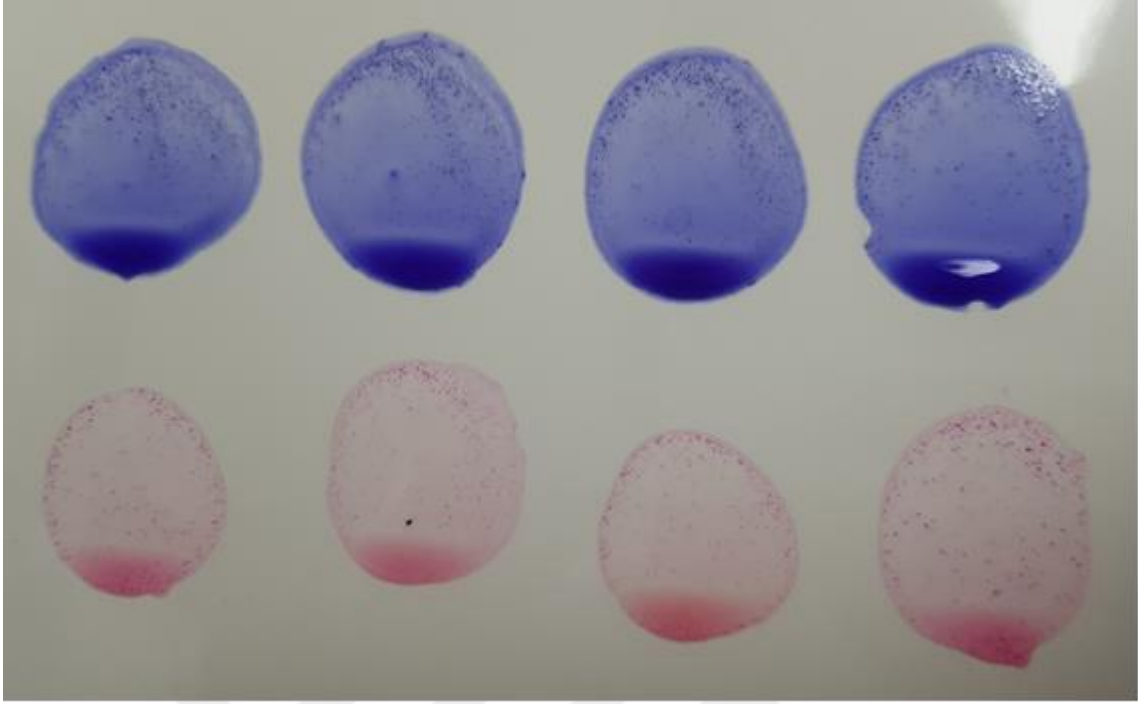
EK-2 ELISA test sonucuna ait görsel

EK-3 ELISA testi için kullanılan kit materyalleri ve ekipman



EK-4 rPCR için kullanılan materyaller



EK-5 Lam Aglütinasyon Test Sonucu

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mümtaz Recep TEKKALAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Karatay / 03.11.1994
Telefon : 0545 283 78 94
Faks :
e-mail : mrtekkalan@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Karatay 15 Temmuz Şehitleri Anadolu Lisesi, Karatay, KONYA	2013
Üniversite	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Meram, KONYA	2017
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Meram, KONYA	2020

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
Ekim 2017 – Devam Ediyor	MG Veterinerlik Teşhis ve Analiz Laboratuvarı	Moleküler Biyolog (Biyolog)

YABANCI DİLLER

İngilizce (Preintermediate)

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

Teşhis ve analiz laboratuvarında;

- 17025 Ulusal Salmonella Kontrol Programı (USKP),
- Moleküler Mikrobiyoloji,
- Bakteriyoloji,
- Laboratuvar Kalite ve Güvence,
- Biyokimya ve
- Seroloji alanlarında çalışılmıştır.