



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVUKLARDA *MYCOPLASMA GALLİSEPTICUM* (MG) ARANMASI İÇİN
LIGHTCYCLER (LC) POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) SİSTEMİNİN
OPTİMİZASYONU**

Serpil KAHYA

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2009



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TAVUKLARDA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* (MG) ARANMASI İÇİN
LIGHTCYCLER (LC) POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) SİSTEMİNİN
OPTİMİZASYONU

Serpil KAHYA

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. K. Tayfun ÇARLI

Bursa-2009

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	IV
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).....	V
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ ve YÖNTEM	31
GEREÇ	31
Klinik örnekler	31
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> (MG) S6 ve ilgili <i>Mycoplasma</i> suşları.....	31
Çabuk lam aglutinasyon (CLA) testi antijeni.....	31
Besiyerleri.....	32
DNA ekstraksiyon kiti	34
Spekrofotometre.....	35
Deiyonize ve ultrasaf su sistemi.....	35
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) miksi ve reagentleri.....	35
Primerler	35
Cam kapilleller ve plastik kapakları	36
Cam kapillellerin kapaklarının kapatılmasını sağlayan alet.....	36
LightCycler Karusel	36
Roche Karusel santrifüj	36
LC 2.0 PCR makinesi	36
Kapiller çıkarıcı.....	37
Buzdolabı.....	37
Vorteks	37
Derin dondurucu.....	37
Isıtıcı bloklar.	38
PCR kabineti.....	38
Biyolojik Güvenlik Kabineti Tip II:.....	38
Otomatik pipetler.....	38
Santrifüj.....	38

PCR reaksiyonunda kullanılan reagentleri birleştirirken kullanılan buzluk.....	38
İnkubatör.....	38
Steriliteyi sağlayan filtre.....	38
İnkubasyon kavanozu.....	39
Mikroaerofilik ortam zarfı (gas ped).....	39
Stereo mikroskop.....	39
Hassas terazi.....	39
YÖNTEM	39
Tracheal Svablarda Kültür İncelenmesi	39
Tracheal Svablarda Kültür İncelenmesinin PCR ile Teyidi.....	40
ÇLA Testi.....	40
MG S6 suşunun deoksiribonükleik asit (DNA) konsantrasyonu ve saflığının ölçümü....	40
MG S6 suşu ve ilgili <i>Mycoplasma</i> suşlarıyla MG-LC PCR'ın spesifitesinin tespiti.....	40
Saf MG S6 DNA'sının sulandırmaları.....	41
Saf MG S6 kültürünün sulandırmaları.....	41
Yapay olarak MG S6 suşu ile kontamine edilen MG-ari tracheal svabların sulandırmaları	41
Primerler	41
DNA ekstraksiyonları.....	42
Optimize edilen MG-LC PCR parametreleri.....	45
Erime eğrisi analizi.....	46
BULGULAR.....	48
Tracheal Svablarda Kültür İncelenmesi	48
Tracheal Svablarda Kültür İncelenmesinin PCR ile Teyidi.....	48
Tracheal svab örnekleri ile kültür bulguları	49
Kan serumu örnekleri ile ÇLA testi bulguları	49
MG-LC PCR'ın saf MG S6 DNA'sını tespit limiti.....	49
MG-LC PCR'ın saf MG S6 kültürünü tespit limiti.....	49
MG S6 kültürü ile yapay olarak kontamine edilen MG-ari svabların MG-LC PCR ile	

tespit limiti.....	49
MG-LC PCR'ın spesifitesi.....	49
Tracheal svab ve kan serumu klinik örnekleri ile çalışılan MG-LC PCR, bakteriyoloji ve ÇLA testi sonuçlarının kümes temel alınarak değerlendirilmesi.....	63
Tracheal svab kan serumu klinik örnekleri ile çalışılan MG-LC PCR, bakteriyoloji ve ÇLA testi sonuçlarının bireysel örneğe dayalı değerlendirilmesi	63
TARTIŞMA ve SONUÇ	65
KAYNAKLAR	71
TEŞEKKÜR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	87

ÖZET

Bu çalışmada tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* (MG) aranması için LightCycler (LC) PCR (polymerase chain reaction) (bir gerçek zamanlı PCR sistemi, Roche) sistemi (MG-LC PCR) optimize edildi ve MG-LC PCR'dan alınan sonuçlar, damızlık tavuk kümeslerinden alınan aynı örneklerin bakteriyoloji ve çabuk lam aglutinasyon (ÇLA) testi sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Otuz bir damızlık firmanın 646 tavuğuna ait tracheal svablar ve aynı hayvanlara ait kanların serumlarıyla çalışılarak MG-LC PCR, bakteriyoloji ve ÇLA testi ile MG infeksiyonu kontrolü yapıldı. Bu amaçla her tavuktan seroloji için kan bakteriyoloji ve MG-LC PCR için tracheal svab örnekleri alındı. MG-LC PCR'ın saf MG S6 suşu deoksiribonükleik asitini (DNA) tespit limiti $0.1 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ (yaklaşık bir MG hücresi) olarak bulundu. Hem MG S6 saf kültürü hem de bu saf kültür ile yapay kontamine edilen svablarda MG-LC PCR ile tespit limiti 100 koloni oluşturma birimi (KOB) ml^{-1} olarak belirlendi. MG pozitif kümes oranı MG-LC PCR ile % 29.0, bakteriyolojik olarak % 16.1 ve serolojik olarak ise % 48.4 olarak bulundu. Altı yüz kırk altı örnek bireysel olarak değerlendirildiğinde ise 227 MG seropozitif tavuğun, 72'si MG-LC PCR ile 26'sı ise bakteriyolojik olarak MG pozitif bulundu. Tracheal svab örneklerinin, MG-LC PCR ve bakteriyoloji oranı karşılaştırıldığında ise (73/26) % 55,6 oranında aynı sonuçları verdi. Sonuçta MG seropozitif kümeslerdeki tavukların tracheal svablarından MG tespit etmek için MG-LC PCR'ın hızlı ve kesin bir metot olduğuna karar verildi.

Anahtar Sözcükler: *Mycoplasma gallisepticum*, Gerçek zamanlı PCR, Tavuk.

SUMMARY

Optimization of LightCycler (LC) PCR (Polymerase Chain Reaction) System for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) in Chicken

In this study LightCycler (LC) PCR (Polymerase Chain Reaction) system (a Real-Time PCR system, Roche) for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) (MG-LC PCR) in chicken was optimized and the results from MG-LC PCR were compared with those from bacteriology and serology with plate agglutination test (PAT) using clinical samples from chicken breeder flocks. Six hundred forty six chickens from 31 parent breeder flocks were examined for MG infection by MG-LC PCR, bacteriology and PAT. For this, both tracheal swab and blood samples were taken from each chicken for MG-LC PCR, bacteriology and serology respectively. Detection limit of MG-LC PCR with pure MG S6 strain deoxyribonucleic acid (DNA) was $0.1 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ (approximately equal to 1 cell) and was 100 Colony Forming Unit (CFU) ml^{-1} with both pure culture and with tracheal swabs artificially spiked with the same strain. The MG-LC PCR positive flock rate was 29.0 % while bacteriology and seropositive flock rates were 16.1 % and 48.4 %, respectively. Individual sample-based assessments revealed that 72 and 26 tracheal swab samples from 227 seropositive chickens were positive by MG-LC PCR and bacteriology. MG-LC PCR and bacteriology agreed for (73/26) 55.6 % of the tracheal swabs tested. In conclusion, MG-LC PCR rapidly and accurately detected MG from tracheal swabs of chickens from seropositive flocks.

Key Words: *Mycoplasma gallisepticum*, Real-Time PCR, Chicken.

GİRİŞ

Mycoplasma gallisepticum (MG) tavuklarda ‘Kronik Solunum Yolu Hastalığı’ (CRD), hindilerde ‘İnfeksiyöz Sinüzitis’ hastalığının etkenidir (1-5). MG etkeninin yol açtığı karkasların değer kaybetmesi, yem tüketimi ve yumurta verimindeki azalış ve artan tedavi masraflarından kaynaklanan ekonomik kayıplar, etkeni dünyada ticari kanatlı sektörünün yüz yüze kaldığı en masraflı etkenlerden biri haline getirmektedir (6-7). Damızlık tavuk ve hindiler MG ile infekte olduğunda, etkeni yumurta yoluyla civcivlere de aktarırlar (6, 8-11). Böylece infeksiyon ticari et-tipi tavuklarda hava kesesi yangısına, yumurtacı tavuklarda CRD nedeniyle yumurta verimi düşüşlerine ve tüm yetiştirme tiplerinde solunum yolu problemlerine neden olarak önemli ekonomik kayıplar şekillendirir (12, 13). MG’ya bağlı diğer bir ekonomik kayıp da yumurta içinde embriyoların ölümü (kabuk altı ölüm) nedeniyledir. Damızlıklardaki infeksiyonun antibiyotiklerle sağaltımı infeksiyonun geç dönemlerinde oldukça zordur. Bundan dolayı erken dönemlerde infeksiyonun tanısı ve sağaltımı çok kritik bir öneme sahiptir (11).

Ülkemizde tavukçuluk sektörü, hayvancılığımız içinde en hızlı gelişen sektör konumundadır. 2000’li yıllarda kanatlı sektörünün Avrupa Birliği (AB) ile uyum çalışmaları başlamış ve Türkiye’nin AB ülkelerinin kanatlı eti ithal edebileceği 3. ülkeler listesine girmesi aşamasına gelinmiştir. Veteriner hekimlik içinde kanatlı hekimliği özel bir öneme sahiptir. Gıda amaçlı yetiştirilen kanatlılar çok sayıda ve yoğun bir biçimde bir arada tutulmaktadır. Ekonomi nedeniyle yapılan bu tür entensif yetiştirmelerde bulunan kanatlı popülasyonlarının sağlık kontrolleri büyük önem taşımaktadır. Bu tip yoğun işletmelerde, çıkabilecek infeksiyöz hastalıklar kolayca yayılabileceği için kontrolleri oldukça zor olacaktır (14-16). Bundan dolayı kullanılacak testlerden beklenen bir diğer özellik de hızlı sonuç vermeleridir. Tavuk ve hindi infeksiyöz hastalıklarının tanısı için kullanılan standart tanı yöntemleri olmakla birlikte özellikle serolojik yöntemlerde duyarlılık ve özgünlükle ilgili yaşanan problemler, bakteriyoloji ve virolojinin sadece özgün laboratuvarlarda uygulanabilmesi ve zaman alıcılığı diğer kanatlı hastalıkları gibi MG infeksiyonu için de çeşitli bilimsel çalışmalarda (17-21) kanıtlanmış olup, veteriner hekimlikteki diagnostik mikrobiyolojide alternatif tanı yöntemlerinin geliştirilmesi gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Doğal olarak geliştirilmiş bu alternatif yöntemlerden en önemlisi de polimeraz zincir

reaksiyonu (PCR) olmuştur (22-26). Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Kanatlı Koruma Kontrol Programı'nda [(National Poultry Improvement Plan (NPIP)) (3) kümeslerin genel koruma ve kontrolü için, yetiştiricilik yapan kümeslerde sürüye sonradan hayvan katılmaması, gerekli olan serolojik testlerin rutin olarak uygulanması ve MG infekte sürülerin kesime gönderilmesi gerektiği belirtilmiştir. Ülkemizde de diğer sorunlu ülkelerde olduğu gibi (27-32) Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından yayımlanan MG enfeksiyonu ile ilgili mücadele yönetmeliklerine göre (33) damızlıkların MG enfeksiyonundan arı olmaları gerekir. Bu nedenle damızlık kökenli bir bakteri olan MG ile enfeksiyonun doğru bir biçimde teşhisi son derece önemlidir. Söz konusu yönetmelikte enfeksiyonun tanısı amacıyla tanımlanan testlerden PCR haricindekiler oldukça zaman alıcı, zor ve spesifiteleri de düşüktür. Aynı yönetmelikte MG-spesifik PCR testi de bakteriyoloji gibi bir teyit testi olarak bildirilmiştir ve PCR-pozitif örneklerin olduğu sürüler, MG-infekte kabul edilerek yetiştirmeden çıkarılırlar (33). MG'un teşhisi için PCR kullanımının önemi birçok çalışmada kanıtlanmıştır (34-38).

Geleneksel PCR tabanlı testler PCR sonrası oluşan ürünlerinin özgünlüğünün saptanması için jel elektroforezini takiben Southern Blotting ve daha sonra spesifik problemlerle hibridizasyon gibi zaman alıcı işlemler, bu işlemleri yapmak için uzman personel, kontaminasyon riskini artıran açık reaksiyon sistemleri gerektirmektedir. Bu testlerin uzun ve karmaşıklıklarına pahalı fiyatları da eklenmektedir. Bu olumsuzluklar sonucunda yapılan işlemler fazlaştığı için yapan kişiden yada açık reaksiyon sisteminden kaynaklanan problemlerin yanında, primer-dimer oluşumu, spesifik olmayan ürünlerin oluşması veya hedef deoksiribonükleik asit (DNA)'in az miktarda olmasından dolayı ortaya çıkan başarısızlık gibi problemler ortaya çıkabilmektedir (39-43).

Klasik PCR tekniğinde yaşanan bu zorluklar, 1992'de Higuchi ve arkadaşları (44) tarafından gerçek zamanlı (Real-Time) PCR'ın geliştirilmesiyle son bulmuştur. Real-Time PCR'da oluşan PCR ürünü miktarı, floresan veren bir boya ya da problemler kullanımıyla ekrandan gerçek zamanlı olarak, başlangıçta olan ürün miktarıyla orantılı olarak izlenip kaydedilebilmektedir. Oluşan ürünün gerçek zamanlı olarak monitörde görülebilmesi, amplikonları, primerleri, oligonükleotid problemlerin floresan kapasiteli moleküllerle işaretlenmesi ile mümkün kılınmıştır. Bu moleküller hedef DNA bölgesinde direkt bir artış veya hibridizasyon olduğunda sinyallerinde değişiklik oluştururlar. Bu floresan sinyal her siklusta oluşan amplikon miktarıyla orantılıdır ve amplikon arttıkça sinyaller de orantılı artış gözlenir. Bu kimyasallar daha önce kullanılan kimyasallara göre [(ethidium bromide (EtBr)

vb.)) toksik etkilerinin düşük olması, kolayca giderilmeleri ve uzun ömürleri gibi konularda önemli avantajlar sağlarlar (40, 42, 43, 45).

'Air Thermal Cycler (ATC) Kapiller PCR' ın Real-Time uygulamalarından biri olan LightCycler (LC) PCR sistemi veteriner ve medikal alanda birçok enfeksiyonun teşhisi için kullanılmaktadır. PCR reaksiyonu sonrası ürünün özgünlüğü erime eğrisi analizi ile birlikte 30-45 dakika içerisinde belirlenebilmektedir. LC PCR sisteminde kapiller borosilikat cam borucuklar kullanılması nedeniyle, geleneksel PCR'a göre birçok avantajları bulunmaktadır (46-51).

Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu destekli proje (2006/29) kapsamında yapılan tez çalışmamızda, tavuklardan alınan tracheal svab klinik örneklerinin PCR'a hazırlanması ile ilgili sorunlar giderilmiş ve laboratuvarımızda optimize edilen güncellenmiş olan MG-LC PCR sisteminin kullanımıyla, klinik örneklerden MG aranma sensitivitesi (duyarlılığı) en üst seviyeye çıkarılmıştır. MG arama duyarlılığı artınca, işletmelerden enfeksiyonu saptamak amacıyla alınacak örnek sayıları daha azalmış, doğru sonuç alınacak örnek sayısı artmış ve bunlar sonucunda ise testin kullanımıyla ilgili sektör daha çok bilinçlendirilmiştir.

Tavukçuluk sektörü bu testi kullanarak, MG ile mücadele kapsamında yaptığı aşı, ilaç uygulaması, yönetim düzenlemeleri gibi uygulamaların sonuçlarının rasyonelliğini çok daha net bir biçimde değerlendirerek ekonomik kazanç sağlayabilecektir. Buna ek olarak, hastalığa bağlı canlı hayvan ve kuluçkalık yumurta üretim kayıpları, enfeksiyonun doğru tanısı ile yetiştirmeden çıkarılacak infekte damızlıklar yoluyla en aza indirilerek ayrı bir ekonomik yarar daha kazanılmış olacaktır.

Bu çalışmada, MG deteksiyonu için LC PCR sisteminin optimize edilmesi ve optimize olan bu sistemin tavukçuluk entegrasyonlarında, özellikle damızlık düzeyinde kullanıma sokulması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Mycoplasma'lar Mollicutes sınıfı, Mycoplasmatales takımı, Mycoplasmataceae familyası, *Mycoplasma* genusuna aittirler (9, 52-56). Filogenetik olarak *Mycoplasma*'lar *Clostridium*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* genusu üyeleriyle ilgilidirler (57). *Mycoplasma*'lar diğer bakterilerden farklılıklar gösterirler. Farklı özellikleri arasında hücre duvarlarının olmaması, 3 katmanlı plazma membranlarının olması, küçük boyutları, küçük genomları metabolizma ve üremeleri için sadece birkaç hücrenel organellerinin olması vardır (57, 58). Bilinen en küçük ve basit serbest yaşayan bakterilerdir. Genomları 500-1000 arası genden oluşan çift zincirli DNA'dan ibarettir (57, 59). Mollicutes'lerin genomları küçük boyutları ve düşük guanine (G) + cytosine (C) içerikleri ile ayırt edilebilirler. Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre genom büyüklüklerine göre 2 gruba ayrılmaktadırlar. Birinci grup, genomları 5×10^8 dalton büyüklüğünde *Mycoplasma* ve *Ureaplasma*'lar ve ikinci grup ise bunların yaklaşık 2 katı büyüklüğünde genoma sahip *Acheloplasma* ve *Spiroplasma*'lardır (60).

Mollicutes'ler birçok hayvan türünde hastalık oluşturmaktadırlar. İnfeksiyonlar, subklinik infeksiyonlardan, ciddi infeksiyonlara, bazen ölümcül hastalıklara kadar farklı tablolarda görülebilmektedir. Genel olarak hayvanlardaki tablolar solunum ve ürogenital sistem infeksiyonları, artrit, mastitis ve septisemiye içerir (54, 61). Anaerobik *Anaeroplasma* türleri haricinde çoğu fakültatif anaerob ya da mikroaerofiliktir (62). *Mycoplasma*'lar dünyada serbest yaşayan saprofitler ya da hayvan parazitleri olarak bulunurlar (55, 59, 62). *Mycoplasma* ve *Ureoplasma*'lar insanlar, hayvanlar, kuşlar, insektler ve bitkilerde ve hatta bazı türleri su ve yağda serbest yaşayan mikroorganizmalar olarak bulunmuşlardır (57, 63, 64). *Mycoplasma* genusu insan ve hayvanlarda genellikle kronik hastalıklara neden olan 100'den fazla türü içermektedir. 1890'larda identifiye edilen ilk tür *Mycoplasma* Kantogiyöz Bovine Pleuropneumoni Hastalığı'nın etkeni *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*'tir (55).

Mycoplasmataceae familyası 6 genusa ayrılır. Bunlar: *Acheloplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* ve *Ureaplasma*'dır (54). *Mycoplasma*'lar üremeleri için kolesterole ihtiyaç gösterirler, *Acheloplasma*'lar üremeleri için kolesterole ihtiyaç göstermezler. *Ureaplasma*'lar ise üreyi hidroliz etme özelliği ile ayrılmaktadırlar (8, 53, 54).

Acheloplasma'lar bazen hayvanlarda bulunurlar ama genelde kontaminantlardır (54, 55). Sadece *Mycoplasma* ve *Ureaplasma* genusları veteriner hekimlik için önemlidir (54, 55, 59).

Sıcaklık ve kimyasalların çoğuna ayrıca osmotik şokun meydana getirdiği lizise duyarlıdır (9, 59, 64). Ortalama 300-800 nm (0.3-0.8 µm) büyüklüğünde ve kendi kendine replike olabilen en küçük prokaryotik mikroorganizmalardır (59, 62, 64-66).

Peptidoglikanları ve peptidoglikanların ön bileşenlerini sentezleyemedikleri için hücre duvarına sahip değildirler (52, 55). Hücre duvarı yerine protein, glikoprotein, glikolipid ve fosfolipitten oluşan esnek plazma membranları vardır. Bu membran 'ünit membran' olarak isimlendirilir (8, 52, 57, 59, 62). Bu esneklik 0.22-45 µm por çapına sahip bakteriyel membran filtrelerden geçebilmelerini sağlar (55, 57, 59, 66). Orta tabakasında lipitlerin bulunduğu unit membran 70-80 angstrom kalınlığındadır. Diğer 2 tabaka ise protein ve karbonhidratlardan meydana gelmiştir. Ünit membrandaki karbonhidrat molekülleri komplemanın fikse edilmesinde, nötralizan antikorların saptanmasında, aynı zamanda diğer suşlarla kros reaksiyonlarda rol oynamaktadır (2, 6). Hücre duvarına sahip olmamaları nedeniyle koloni morfolojileri sahanda yumurtaya benzer, hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotiklere dirençlidirler ve üreme gereksinimleri komplekstir (52, 54, 57, 66).

Mycoplasma'lar genelde konakçı spesifiktirler, bazıları sadece tek tip hayvanı infekte ederler, bazıları ise farklı hayvan türlerini infekte etme kabiliyetindedirler. Genelde mukozal yüzeylere kolonize olurlar ve yayılma özellikleri fazla yoktur (8, 52, 55). Bazı türler belli anatomik bölgelere afinite gösterirken bazıları birçok vücut bölgesinde bulunabilirler (55, 57). Genellikle solunum kanalı ve akciğerlere yerleşme eğilimi gösteren *Mycoplasma*'lar bu sistemdeki siliyar aktiviteyi bozarak bakteriyel infeksiyonlara karşı afiniteyi artırır. *Mycoplasma synoviae* (MS) gibi patojenik *Mycoplasma* türlerinin eklemler ve seröz boşlukları çevreleyen mezenseyal hücrelere karşı da affinitesi bulunmaktadır (52, 62). Doku tropizmlerindeki değişkenlik, sinirsel semptomlar gösteren hindilerde hastalığın teşhisi ile de gösterilmiştir (67). Konjunktiva, burun boşluğu, orofarinks, meme bezleri, genital ve intestinal kanal, üst solunum sisteminin mukoz membranlarında patojenik ve nonpatojenik türler ile kommensal olarak da bulunurlar (55, 59, 62). Ayrıca konakçı hücrelerin ölümüne neden olan ya da oluşturdukları infeksiyonların kronikleşmesinde önem taşıyan hemolizin, proteaz ve diğer bazı toksik maddeler sentezlerler (52).

Agar jel difüzyon testinde *Mycoplasma*'lar arasında multipl antijenik komponentler saptanmıştır. *M. mycoides*'in en azından 3 antijenik komponente sahip olduğu ve bunların galaktanla ilişkili olduğu bildirilmiştir. *M. mycoides* ile infekte sığırların serumlarında, bu

etkenin virulensi ile ilişkili galaktanlara rastlanmıştır. *M. neurolyticum*'da protein karakterinde ve termolabil olan bir nörotoksininin varlığı ve bunun beyindeki asteriodlere karşı özel bir afinitesi olduğu açıklanmıştır. Etken farelerde dönme tarzında beliren hastalıklara neden olmaktadır. MG'un yıkanmış hücreleri hindi palazları üzerinde nörotoksik etki meydana getirmektedir. Damar içi verildikten 1 saat sonra inkoordinasyon, torticollis, bacaklarda paraliz ve sonunda ölümler görülebilmektedir (52).

Tavuklarla ilgili olarak ilk *Mycoplasma* spp. 1930 yılında Nelson tarafından (68) 'İnfeksiyöz Koriza' ile ilgili kokobasil formları olarak bulunmuştur. Nelson etkeni önce uzun süre korizayla ilişkilendirmiş ve sonunda doku kültürleri, sıvı besiyerleri ve embriyolu yumurtalarda kokobasilleri üretebilmiştir. 1943'te Delaplane ve Stuart (69) etkeni embriyolarda üretmiş ve önce tavuklarda CRD olgularından ve sonra hindilerde infeksiyöz sinüsitis vakalarından izole etmişlerdir. 1950'lerin başlarında Markham ve Wong (70) ayrıca Van Roekel ve Olesiuk (71) etkeni tavuklardan ve hindilerden başarılı bir şekilde izolasyonunu rapor etmiş ve hepsi etkenin pleuropneumoni grubundan (*Mycoplasma* spp.) olduğunu kabul etmişlerdir (8, 11). Bu bakterinin daha sonra MG olduğu kabul edilmiştir (72). Sonraları birçok araştırmacı kümes hayvanlarından MS, *M. meleagridis* (MM), *M. gallinarum*, *M. iners*, *M. anatis*, *M. iowae* (MI), *M. lipofaeciense*, *M. gallinaceum*, *M. gallopavonis*, *M. pullorum*, *M. columbinum*, *M. columborale*, *M. columbinasale* (73), *M. anseris* (74) ve *M. cloacale* (75) türlerini izole ve tanımlamışlardır (58).

Kanatlı hayvanlardan şimdiye kadar *Mycoplasma* cinsi içinde izole edilen ve isimlendirilen 22 tür bulunmasına karşılık bunlardan sadece 4 tanesi evcil kanatlı hayvan türleri için patojendir (9). Bu 4 önemli *Mycoplasma* cinsi MG, MS, MM ve MI'dir (1, 56, 76-78).

MG yaklaşık 0.25-0.5 µm boyutlarında, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, Gram negatif bir bakteridir. Diğer *Mycoplasma*'lar gibi hücre duvarı sentezleyecek yeteneğe sahip olmadığından oval, yüzük, kokoid, filamentöz ya da yıldız şeklinde pleomorfik bir görünüm sergilemektedir (6, 62). Anilin boyalarla güç boyanma özelliğinde olduklarından Giemsa, Dienes, Macchiavello, Castenada ve Stamp boyama yöntemleri kullanılabilir (2, 3, 79-81).

MG aerosol yolla lateral, yumurta ile vertikal olarak, ayrıca kontamine virus aşılılarıyla bulaşabilmektedir (2, 11, 55, 59, 79). Horizontal bulaşma zannedildiğinden çok daha yavaştır, bulaşma genellikle infekte hayvanlarla direkt temas sonucu olmaktadır. Bununla birlikte insanlar ve fomitler de indirekt bulaşmada önemli rol oynayabilen araçlardır (108). MG'un

kaz, ördek, bıldırcın, papağan, ötücü kuşlar, yırtıcı kuşlar, sülün ve keklikte de, CRD, infeksiyöz sinüzitis ve konjuktivitise neden olduğu bulunmuştur. Son zamanlarda Kuzey Amerika'da ev kuşlarında da üst solunum yolu hastalığı nedeni olarak bulunmuştur. MG Japonya'da 3 adet ve Hindistan'da da evde yaşayan bir adet serçeden izole edilmiştir (28, 109-119). Hindilerdeki bir MG salgını zamanı, ötücü kuşlar ve küçük memelilerin infeksiyonunun potansiyel kaynağı olup olmadıkları da araştırılmıştır (117). Bazı kuşların serumlarında düşük hemaglutinasyon inhibisyon (HI) titresi tespit edilmiş ama etken izole edilememiştir. Daha sonra serçeler aerosol yolla MG ile infekte edilmiş ve 11 kuşun 5'inden infekte edildikten 10 gün sonra etken izole edilmiştir fakat bu kuşlarda herhangi bir klinik lezyon ve semptom görülmemiştir. Bu araştırmacılar evcil serçelerin biyolojik taşıyıcı olabilecekleri sonucuna varmışlardır.

Bulaşmada temel kaynak infekte anaçlarla olan vertikal bulaşmadır. İnfeksiyon periyodunun ilk devresinde bulaşık yumurta yok denecek kadar az olmasına rağmen akut devresinde infekte hayvanlar % 35 oranında etken taşıyan yumurta üretebilirler. Bu oran 3-4 hafta sonrasında % 1'e kadar düşebilir ama hiçbir zaman sıfır olmayacağı gibi, infeksiyon zaman zaman da klinik form kazanabilmektedir (120). Etkenin oluşturduğu klinik belirtiler birkaç hafta sonra ortadan kalkabilir ama üst solunum yolunda infeksiyon kalıcı olarak bulunmaya devam edecektir (1).

Dış ortamda çok kısa süre yaşayabildikleri için laboratuvar muayenesi için örnekler, buzdolabında saklanmalı ve 24 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır (1, 55). MG tavuk dışkısında 20 °C'de 1-3 gün, giysilerde 20°C'de 3 gün ya da 37 °C'de 1 gün, yumurta sarısında 37 °C'de 18 hafta ya da 20 °C'de 6 hafta canlı kalabilmektedir. Sıvı kültürler içinde, - 30 °C'de 2-4 yıl, liyofilize suşlar da ise 4 °C'de en az 7 yıl canlı kalabilmektedir (80). Christensen ve arkadaşları (82) MG'un tavuk tüyünde 2-4 gün, pamuklu giyside 12 saat-4 gün, insan saçında 8 saat-3 gün, kauçuk ve samanda 2 gün, kerestede birkaç saat, insan kulak mukozasında 4 saat, insan burun mukozasında 4-24 saat canlılığını koruduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar kontamine tavuk tüyünün *Mycoplasma* infeksiyonu gözlenmeyen sürülerde en önemli tehlikelerden biri olabileceğini, etkenin kauçuk ve pamuklu giysilerde 2 gün kadar canlılığını sürdürmesi nedeniyle kümeslere girişte ayak dezenfeksiyonunun ve kümesler arasında dolaşırken giysilerin değiştirilmesinin çok önemli olduğunu vurgulamışlardır. Stripkovits ve Kempf (83) MG'un infekte allantoik sıvıda 5 °C'de 3 hafta, etüvde 4 gün, oda ısısında 6 gün, yumurta sarısında da 37 °C'de 18 hafta, 20 °C'de 6 hafta canlılığını koruyabildiğini bildirmişlerdir.

Bazı koşullar altında MG özellikle genç tavuklar, tavuk ve hindilerde akut solunum yolu hastalığı ile de ilgili bulunurken hastalığın daha kronik formu yumurtacı ve damızlıklarda yumurta verimi düşüklüğüne neden olabilmektedir (10, 54, 55). MG infeksiyonu solunum yolu hırıltıları, öksürük, burun akıntısı ve konjiktivitisle ve hindilerde genellikle infraorbital sinusitisle karakterize bir hastalıktır. Etken solunum sistemine kolonizasyona başladığında öksürük, nasal akıntı, tracheitis ve airsacculitis lokalize infeksiyonun başlıca semptomlarıdır (10, 54, 57, 79).

Hindilerde encephalitis ve buna bağlı olarak torticollis ve opisthotonus olguları gözlenmiştir (8). Bu hayvanlarda nadiren MG infeksiyonunun artritisi, salphingitis, konjuktivitis ve ölümcül ensefalopati ile de ilişkili olması, organizmanın mukozal epitelyum bariyerini aşip vücudun uzak bölgelerine ulaştığını göstermektedir. Bunun yanında deneysel olarak solunum yollarından infekte edilen hayvanların, kalp, beyin, karaciğer, dalak ve böbreklerinden tekrar izole edilebilmesi etkenin tüm vücuda yayıldığını göstermektedir (84).

Büyüme çağındaki kanatlılar MG infeksiyonuna daha çok yakalanmaktadır (2). Broiler sürülerde salgınlar genellikle 4-8. haftalar arasında şekillenir. İnkübasyon periyodu ortalama 6-21 gündür. Kış aylarında hastalık uzun sürer ve mortalite % 30'a kadar çıkabilir. Genç civcivlerde hastalık erişkinlerden daha şiddetlidir (8). Hossain ve arkadaşları (20) Bangladesh'in Rajshahi bölgesinde 2006 yılı Temmuz ayı ve 2007 yılı Haziran ayı arasında farklı kümeslerden aldıkları serum örnekleriyle mevsime, yaşa ve sürü büyüklüğüne göre karşılaştırma yapmak üzere, 115 sürüden 575 serumla çabuk lam aglutinasyon (ÇLA) testi çalışmışlar ve MG infeksiyonunun genel prevalansını % 55.13 olarak bulmuşlardır. Yaz sezonunda (% 47.74) kış sezonuna göre (% 61.48), yine yaşlı sürülerde (% 44) genç sürülere göre (% 72.72) MG infeksiyonunun daha az yaygın olduğu sonucuna varmışlardır. Sürü büyüklüğüne göre karşılaştırma yapıldığında ise infeksiyonun küçük sürülerde (% 52) büyük sürülere göre (% 62.86) daha az yaygın olduğu sonucuna varmışlardır. Barua ve arkadaşları (19) Bangladesh'in çeşitli bölgelerinde broiler ve yumurtacı sürülerden 2004 yılı Temmuz ve Ekim ayları arasında, aldıkları 400 serumda ÇLA testiyle yaptıkları çalışma sonucunda MG antikor prevalansını broiler kümeslerde % 53, yumurtacı kümeslerde ise % 46 olarak bulmuşlardır.

Sikder ve arkadaşları (21) Bangladesh'in Kalapara Upazilla bölgesinde 6 farklı damızlık kümesinde yaşa göre, yağmurlu sezon ve kış sezonunda, dişi ve erkekler arasında 364 serum üzerinde yaptıkları karşılaştırmalı çalışmalarında ÇLA testiyle çalışmışlar ve MG infeksiyonunun seroprevalansını genel olarak % 46.88, yağmurlu sezonda % 51.74, kış

sezonunda ise % 61.45, dişilerde % 24.10, erkeklerde ise % 15.62 olarak bulmuşlardır. Ayrıca MG infeksiyonunun prevalansını yaşa göre karşılaştırdıklarında 18 haftalık hayvanlarda % 71.42, 22 haftalık hayvanlarda ise % 50 olarak bulmuşlardır. Sarkar ve arkadaşları (18) Bangladesh'te 2004 yılı Ocak ve Mayıs ayları arasında, damızlık kümeslerinde ÇLA testi ile 382 serum ile çalışmışlar ve MG infeksiyonunun genel seroprevalansını % 58.9 bulmuşlardır. Yaz sezonunda seroprevelans % 58.1 olmasına rağmen kış sezonunda bu oranı % 62.44 olarak bulmuşlardır. Aynı zamanda sonuçlar dişi ve erkek hayvanlar karşılaştırıldığında erkeklerde % 48.57, dişilerde ise % 59.94 olduğu sonucuna varmışlardır. 2003 yılında Thu ve arkadaşları (85) Vietnam'da MG'nin yaygınlığını hem nested hem de geleneksel PCR ile ve hem ilkbaharda hem sonbaharda karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. İlkbaharda 197 saha örneği ile çalışmışlar, bunlardan % 86.8'i nested PCR ile, % 56.8'i geleneksel PCR ile MG pozitif bulmuşlardır. Sonbahar ayında çalıştıkları 183 örneğin % 27.3'ü nested PCR ile % 12'sini ise geleneksel PCR ile MG pozitif bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonunda nested PCR'ın geleneksel PCR'a göre daha hassas olduğu ve sonbahar mevsiminde MG hastalığının ilkbahar mevsimine göre daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

CRD, ciddi airsacculitis ile karakterize MG veya MS infeksiyonlarının, İnfeksiyöz Bronchitis Virusu veya Newcastle Hastalığı Virusu gibi solunum yolu virusları ve genellikle *Escherichia coli* (*E. coli*) ile komplike olması sonucu oluşan bir hastalıktır (10, 11). MG'un İnfeksiyöz Bronchitis Virusu ile (86-88), Newcastle Hastalığı Virusu ile (89), İnfluenza A Virusu ile (90), Adenovirus'larla (91), *Heamophilus gallinarum*'la (92, 93) ve *E. coli* ile (94) birlikte hastalık oluşturdukları bildirilmiştir (58, 76, 79). İkili veya üçlü miks infeksiyonlarda hastalığın seyri değişmekte, ciddi klinik bulgular oluşmakta ve dolayısıyla sağaltım prosedürü de farklılaşmakta ve zorlaşmaktadır. Bunların dışında beslenme yetersizliği, havalandırma, ısıtma noksanlığı, hayvan sayısı, kümes dezenfeksiyonları ve diğer stres faktörleri hayvanları duyarlı hale getirmektedir (2).

1980'lerin sonlarına kadar *Mycoplasma*'lar hücre dışı patojenler olarak biliniyorlardı. 1989'da LO ve arkadaşları (95) tarafından *Mycoplasma*'ların hücre invazyonu yaptıkları AIDS'li bir hastadan izole edilen *M. fermentas*'da ortaya çıkarılmıştır. MG ve bazı *Mycoplasma* türlerinin hücelere penetre olma kabiliyetinde olduklarını bildirmişlerdir (10, 11, 52). *Mycoplasma*'lar solunum, genital ve üriner sistem, eklem mukozalarının patojenleri olarak bilinirken, eritrositleri istila eden hemotropik *Mycoplasma*'ların bulunması ile bu inanış değişmiştir (57). MG'un diğer *Mycoplasma*'lardan farklı olarak ünit membranlarının

üzerinde Myxovirus'larınkine benzer çıkıntılar bulunmaktadır. Plazma membranından orjin alan bu yarım ay şeklindeki çıkıntılar, epitelium hücrelerine ve eritrositlerdeki glikoforin reseptörleri yardımıyla da etkenin eritrositlere tutunmasını sağlamaktadır. Etken bu çıkıntılarla hemaglutinasyon oluşturabilmektedir (2, 6). Vogl ve arkadaşları (96) MG'un eritrositleri istila ettiğini kanıtlamışlardır. Bu özellik hem in vivo hem de kan örneklerinden in vitro olarak gösterilmiştir. Böylece MG'un konakçı eritrositlerini invaze ederek infeksiyon boyunca vücudun uzak bölgelerine ve özellikle de immun sisteminden korunmuş bölgelerine gittiği ve virulensini arttırdığını kanıtlanmıştır. MG'un konakçı hücre membranındaki glikoproteinlerin sialik asit kısımlarını reseptör olarak kullanarak, polipeptid yapıdaki kısımlarıyla mukozaya yapışarak ve salgıladığı neurominidaz enzimleri ile duyarlı olan hücre membranlarına zarar verdiğini bildirilmiştir (97).

Günümüzde MG'un sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte çok sayıda suşu bulunmaktadır. Bunlar serotip anlamına gelmemektedir (8). İnfeksiyöz sinusitisli bir hindinin beyninden izole edilen S6 suşu, birçok çalışmada antijen hazırlamada kullanılan Van Roekel tarafından patojenik bir kültüre verilen isim olan A 5969 suşu, canlı aşı programlarında geniş kullanıma sahip Connecticut F'in kısaltılmışı olan F suşu, bakterin üretiminde ve eprüvasyon çalışmalarında patojenik suş olarak kullanılan, Georgia'da airsacculitisli bir tavuktan izole edilmiş olan R suşu, en yeni canlı aşı üretiminde kullanılan 6/85 ve ts-11 suşlarının yanı sıra, PG-31, A-514, K2317, K2320, BA, KW, X-95, WVU 1791, 227, K-730, K-78, 2600, VR, K-703, 30902, G11, 4229, 80083, Ap3AS Iowa 801, P12027, P33470, W, T suşlarının bu suşlardan bazıları olduğu bildirilmiştir (9, 77, 80, 88, 105-107).

MG suşları virulens, doku tropizmi ve antijenik özellikleri bakımından oldukça farklıdır. Major yüzey antijenik proteinlerini değiştirme kabiliyetleri, immun sistem tarafından tanınan antijenik profillerinin sürekli olarak değişmesine ve immun sistemden kaçmalarına neden olur. Değişkenlik sadece suşlar arasında değil aynı suşlar arasında bile görülebilmektedir. Yüzey antijenlerindeki bu sürekli değişimin aynı zamanda in vivo olarak meydana geldiği (99) ve bu değişimin klinik hastalığın gelişmesi ve serolojik yanıt için ana faktör olduğu düşünülmektedir (100). Bu değişimler *Mycoplasma* etkeninin immun sisteme rağmen nasıl kalıcı olmayı başardığının da bir açıklaması niteliğindedir (76). MG'un fenotipik ve antijenik varyasyonunu sağlayan, büyük sıklıkta faz ve büyüklüğünde değişiklik oluşturan multipl membran proteinleri ve lipoproteinleri karakterize edilmiştir. Bu protein ve lipoproteinler PvpA (101, 102) ve pMGA'yı (aynı zamanda v1hA'da denilmektedir) içermektedir. Bunlara ek olarak en az 3 adet farklı yüzey proteinleri de faz varyant olarak

belirlenmiştir (102). Bu faktörler etkenin kronik infeksiyon oluşturmaya neden olmaktadır (103, 104).

MG'a karşı oluşan humoral ve hücrel antikor cevabı incelendiğinde hücreye bağımlı bağışıklığın korunmada önemli olduğu bulunmuştur. Fakat bireyin MG'dan tamamen kurtulması için hem hücrel hem de humoral bağışıklığa ihtiyaç olduğu tespit edilmiştir (98). Bazı *Mycoplasma* antijenlerinin konakçı vücut doku antijenleri ile kros reaksiyon verdiği bulunmuştur. Bu moleküler benzerlik etkenin patogeneğinde önemli olan 2 olası sonuca yol açabilir. Bunlardan birisi MG'un konakçı immun sisteminden kolayca kaçmasını sağlayarak kalıcı infeksiyonlara neden olabilmesi, diğeri ise otoimmun hastalıklara neden olabilmesidir (55). MG'un yüzey epitoplalarının alternatif formlarını geliştirebilme yeteneği ile yüzey proteinlerinde spontan fenotipik değişimler oluşturabildiği, böylece konakçı immun sistemini aşarak dokularında canlı kalabildiği ve bu nedenle de infekte olan bir hayvanın ömür boyu infekte kalabileceği ve sağlıklı sürüler için çok önemli tehlike oluşturabileceği bildirilmiştir (76, 83).

CRD ülkemizde olduğu kadar, Amerika, Kanada, Arjantin, Brezilya, Avustralya, İngiltere, İsrail gibi dünyanın birçok gelişmiş ülkesindeki kanatlı çiftliklerinde sorun olmaya devam etmektedir (28, 30-32, 85, 93, 121, 122). MG infeksiyonundan meydana gelen ekonomik kayıplar, Mohammed ve arkadaşları tarafından 1987'de yapılan araştırmaya göre (12) yılda 127 milyon dolar, yine Kuzey Carolina'da 1999 yılında bir broyler şirketinde yapılan çalışmaya göre (13) 1999 yılının 6 aylık periyodunda 500.000-750.000 dolar olarak bildirilmiştir.

Ülkeler infeksiyondan kontrolde kendi sistemlerini belirlemişlerdir. ABD'de, MG, MS ve MM ulusal şartlarda kontrole tabidir ve sürülerin 4 aylıkken etkenlerden ari olması istenir. Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde MG ve MM, birlik içerisinde ticareti ve 3. ülkelerden kanatlı ya da dömlü yumurta ithalatlarında kaliteyi kontrolde tutabilmek üzere, damızlık sürünün yumurtaya başlamasından hemen önce ve devamındaki her 3 ayda bir örneklemelerle serolojik takibini şart koşmaktadır. İngiltere için kanatlı sağlığı şemasında MG ve MM testlerinin yumurtaya girmeden 4 hafta öncesinden daha geride olmamak kaydıyla başlayıp, sonrasında da her 12 haftada bir yapılması istenmektedir. Önerilen örnekleme 4000 ve daha yukarı sayıdaki sürü için 60 hayvan ile % 95 güvenirlikle, % 5 prevalansı ifade etmektedir. % 99 güvenirlikle gözleyebilmek için örnek sayısı 90 olmalıdır (120). Ülkemizde MG infeksiyonunun kontrolü için, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği uygulanmaktadır (33).

Sonuç olarak MG infeksiyonları bir dünya hastalığıdır ve yüksek hastalık insidansı kapasitelidir. MG kanatlı endüstrisinin en inatçı ve adaptasyon yeteneği yüksek patojenlerindedir. MG suşları kolayca özellik değiştirebilirler, doğal infeksiyonlarla işbirliği geliştirebilirler, konakçı hayvanda uzun süre canlı kalabilirler. Bu durum teşhiste zorluklar yaşanmasına yol açabilir. MG infeksiyonunda kontrol ve eradikasyon programı uygulamak oldukça zordur (120).

Doğal infeksiyonlarda kuluçka süresinin çok uzayabilmesi, bulaşmanın yavaş olması ve klinik semptomlar gözlemlendiğinde çok gecikmiş olunacağı için infeksiyonun sık taramalarla takibi çok önem kazanır (120). Bazı vakalarda tracheadan 5-10 örnek yeterli olabilir. Bununla birlikte kronik durumlarda ya da düşük patojeniteli bir suşla infeksiyonda en az 30-100 adet örnekle çalışılması gerekmektedir (1). Dezavantaj olarak izolasyonu uzun süre gerektireceği ve sık olarak da başarısız olunacağından korunmada serolojik yoklamaları esas almak gerekecektir. Böylece erken saptanabilen odağın kurutulması yayılımın önüne geçilebilir (120). Uzun yıllardır kanatlı *Mycoplasma*'larının teşhisinde antikorlardan teşhisi sağlayan çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır (10, 123-126).

Mycoplasma'ların teşhisinde izolasyon ve identifikasyon zor olduğu için serolojik testlerden ÇLA testi, HI testi, enzimle bağlı immunosorbent testi (ELISA), lateks aglutinasyon testi, Coombs antiglobulin testi, agar jel difüzyon testi, floresan antikor testi (FAT), indirekt FAT, üreme inhibisyon testi, metabolik inhibisyon testi, akış sitometrisi, mikro Immun Floresan (IF), avidin-biotin, dot immunobinding analizi, immunoperoksidaz testi (IP), indirekt IP testleri kullanılabilir (10, 58, 124, 127, 128). İnfeksiyondan şüphelenildiğinde ve MG kontrol programlarında sürü izlenmesi için serolojik prosedürlerin kullanımı yararlıdır ve teşhise önemli bir katkı sağlamaktadırlar. MG hastalığının tipik semptomları ve bu semptomlarla birlikte pozitif serolojik test, organizmanın izolasyon ve identifikasyonuna başvurmadan önce ön tanı için oldukça önemlidir (10, 11). Serolojik testler NPIP'in (3) bir parçası olarak kontrol programlarının temel testleridir (1). Serolojik testlerden en çok kullanılanları ÇLA, ELISA, HI ve en güvenilirleri IFAT ve IP testidir (10, 11).

MG antikorlarını tespit etmek için kullanılan serolojik testlerin özgünlük ve duyarlılığı oldukça düşüktür. Serolojik testlerde yalancı pozitif ve yalancı negatif reaksiyonlar çok fazla yaşanmaktadır. Bu yüzden serolojik testler, kanatlıları bireysel olarak test etmekten ziyade sürü izlenmesine daha uygundur (1, 3, 4, 10, 58, 77).

Kanatlı sürülerinde patojenik *Mycoplasma* infeksiyonlarının izlenmesi genellikle ÇLA testi ile gerçekleştirilir. Sürü izlenmesi ve serolojik teşhisin başlangıcı için ÇLA testi hızlı, ucuz ve hassas bir testtir. Yumurta üretimine başlamadan önce genellikle sürünün % 10'u (yada en az 300 hayvan) ve 60-90 gün arayla her sürüden yaklaşık 30 hayvan ÇLA ile test edilmelidir (1). İnfeksiyona karşı ilk oluşan IgM antikorlarını tespit için ÇLA testi hayli etkilidir (11). ÇLA testi antijeni MG antikorlarını tespit için ticari olarak mevcuttur (Intervet, Boxmeer, Hollanda). ÇLA testinin dezavantajlarından biri IgM'lerin ancak 7. günden sonra oluşmasıdır (10). Bu test hızlı, kolay ve ekonomiktir, fakat antijene bağlı olumsuzluklar da sıktır (1). ÇLA testinin en büyük dezavantajı yanlış pozitifliklerden dolayı olan düşük özgünlüğüdür. ÇLA testi sonra ELISA ya da HI testi ile doğrulanabilmektedir (1, 10).

Araştırmacılar ÇLA testinde sıklıkla yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlarla karşılaştığını belirtmişlerdir. Bu non-spesifik reaksiyonların kontamine olmuş veya dondurulduktan sonra kullanılan, MS ile infekte ya da *Erysipelothrix rhusiopathiae* bakterini inokule edilmiş tavuklardan alınan serumlarda gözlendiğini bildirmişlerdir (125, 128, 129, 130). Şüpheli sonuçlar MS antijeni ile de ÇLA testi gerçekleştirilerek kontrol edilebilmektedir (10).

Serolojik testlerin yapılmasında bazı kriterler vardır. Sürüden örnekleme için serumlar toplandıktan sonra hemen test edilmeyecekse 4 °C'de saklanmalı, dondurulmamalıdır. Dondurma işlemi non-spesifik aglutinasyona neden olacağından serumun hemen test edilmesi her zaman daha uygundur (1). Önceden santrifüj non spesifik reaksiyonları azaltır. Bilinen negatif ve pozitif kontroller testte kullanılmalıdır. Antijen ile 2 dakika içerisinde aglutinasyon veren serum, 56 °C'de 30 dakika ısıtılmalı ve tekrar test edilmelidir (10, 11). Isıtmak eski serumlarda görülen yanlış pozitiflikleri azaltır ama en sağlıklı serum toplandıktan sonra 72 saat içerisinde test edilmesidir (120). Serumlar ısıttıktan sonra hala güçlü bir biçimde aglutinasyon veriyorsa ve özellikle sulandırıldıklarında (1:4 veya üstü) aglutinasyon vermeye devam ederlerse pozitif kabul edilirler (10). Bazı araştırmacılar ÇLA testindeki non-spesifik reaksiyonları önlemek için, serumun ısıyla inaktivasyonunun yanında, 2-mercaptoetanol ile yada fizyolojik tuzlu su (FTS) ile dilusyonunu önermişlerdir (1, 83, 105, 130). Ancak Cullen ve Timms (131) antikor oluşumunun yeni başladığı ya da düşük olduğu hayvanlara ait serumlarda, bu dilusyon işlemleri sonrasında yanlış negatifliklerin oluşabileceğini vurgulamışlardır (10). Araştırmacılar ÇLA testinin, hastalığın erken devrelerinde pozitifliği saptamada HI ve ELISA'ya oranla daha üstün olduğunu, bunun nedeninin de ÇLA testi ile özellikle IgM'lerin saptanması olduğunu bildirmişlerdir.

İnfeksiyonun daha ileriki devrelerinde diğer testlerin de aynı oranda duyarlı sonuçlar verdiğini ve ÇLA testine oranla bu testlerin daha spesifik olduklarını bildirmişlerdir (124, 132). Serumların büyük bir kısmı (% 10 veya daha fazla) pozitiflik veriyorlarsa ve özellikle HI veya ELISA testi ile de bir doğrulama yapılırsa bu durum MG infeksiyonunu gösterir. Sürü 1 ay sonra tekrar test edilmelidir (10). Serolojik testlerin tekrarlanması gerektiği durumlarda etkenin izolasyon ve identifikasyonu tekrarlama işleminden daha hızlı ve kesin sonuç verebilmektedir (1).

Yetiştiricilikte viral ve bakteriyel hastalıklar için kullanılan inaktif aşuların da, lam aglutinasyon testinde non-spesifik reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (123, 130). Özellikle yağ içerikli inaktif aşulardan sonra 2-4 hafta test yapılmamalıdır. Aşıdan dolayı olan bu yanlış pozitiflikler aşılamadan 4-8 hafta ya da daha fazla sonrasına kadar devam edebilmektedir (1, 120). Dehidrasyon ve lipitlerle ilgili yanlış pozitifliklerden dolayı ve esas aglutinasyon veren antikor IgM, günlük civcivlere geçmediği için günlük civcivlerde ÇLA testi geçerli olmaz. Bunun dışında infeksiyon sonrası örnekleme çok yakın olmamalıdır, antibiyotik tedavi sonrası, etken tam giderilememiş olsa da antikor cevabı azalmış olabilir, tüm *Mycoplasma* suşları humoral immun yanıtı aynı düzeyde indüklemeyebilirler, yaşlı kanatlıların genç kanatlılara göre serumlarında daha fazla non-spesifik faktörün bulunabileceği gibi birçok sebep ÇLA ve diğer serolojik testlerin kullanımını kısıtladığı MG için yapılan birçok serolojik çalışmalarda kanıtlanmıştır (133-140). Bu yüzden serolojik testlerin sonuçları yorumlanırken tüm bu faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

Kanatlı *Mycoplasma*'larının tavuk eritrositlerini aglutine ettikleri ve bu reaksiyonun infekte tavuk serumları tarafından inhibe edilebildiği ilk kez Van Herick ve Eaton (141) tarafından 1945 yılında bildirilmiştir (126). HI testi ÇLA testine göre daha özgündür (1, 120). Bununla birlikte HI testi zaman harcayan, gerekli maddelerin temini oldukça zor olan ve duyarlılığı düşük olan bir testtir. HI testiyle IgG antikorları tespit edilir. O yüzden bu test ancak infeksiyondan 2-4 hafta sonra kullanılabilir (120). Bir *Mycoplasma* suşuyla hazırlanan antijenle farklı bir suş tarafından oluşturulan hastalığın teşhisi mümkün olmayabilir (1). Antijen üretiminin zorluğu ve üretimde laboratuvarlar arası üretim farklılıkları da problem oluşturabilmektedir (120). Ülgen (142) 1991 yılında Bursa bölgesinde gerçekleştirdiği tez çalışmasında, CRD'den şüpheli 137 adet tavuğun muhtelif organlarından 15 adet MG izole etmiş ve 499 adet serum örneğinin 263'ünün MG infeksiyonuna işaret eden 1/80 ve üzeri HI antikor titresine sahip olduğunu yani bölgede aktif infeksiyonun yaygınlığını göstermiştir. Yine Mohammed ve arkadaşları (121) tarafından

güney California’da yumurtacı kümeslerde yapılan çalışmada MG seroprevelansı % 73 bulunmuştur.

ELISA, HI ve ÇLA aglutinasyonla sağlanan sonuçların güvenilirliğini, duyarlılığı ve özgünlüğünü arttırmak için geliştirilmiştir. Öncelikle IgG fakat IgM antikorları da tespit edebilmektedir (120). Genel olarak ÇLA testinden oldukça az duyarlı fakat daha özgündür (1, 10). Bu nedenle civcivin ilk günündeki serolojik kontrollerinin ELISA testi ile yapılması önerilmektedir. İlk 48 saatten sonra iyi sonuç alınmayabilir çünkü antikorlar 4. günden sonra giderek hızla azalacak ve 18. günde kaybolacaklardır (120). Monoklonal antikorlarla kullanılan “bloking ELISA” dahil olmak üzere MG antikorlu içeren birçok ticari ELISA kiti mevcuttur (10). Bu test kitleri infeksiyon sonrası oluşan pozitif serumları HI testinin tespit ettiği sürede saptayabilmektedirler (1). Kit üretim farklılığı ve ortam şartları, laboratuvarlar arası farklılıklar oluşturabilmektedir (120). Tavuklarda doğal infeksiyonların hepsinin tipik MG suşlarından kaynaklanmadığı ve antijenik varyant suşların da hastalığa neden olabilecekleri ve bu durumun da tanıda sorun yaratabileceği bildirilmiştir (105, 106). Bu yüzden MG suşları arasında, virulens ve serolojik yanıt oluşturma açısından oldukça büyük farklar bulunmaktadır (76, 143, 144). Sahada en sık görülen MG suşları ile infekte edilen tavukların kan serumları, ELISA ve ticari ÇLA antijenleri ile incelendiğinde, yüksek oranda pozitiflik saptanırken aynı kitlerle varyant MG inokule edilmiş hayvanlarda düşük bir pozitiflik saptandığı rapor edilmiştir (105). Suşlar hızlı antijenik şekil değiştirdiği ve diğer infeksiyonlarla işbirliği içinde birlikte olabilecekleri için ELISA testinde de diğer serolojik testlerde olduğu gibi hatalar oluşabilmektedir (1, 120).

MG için en kesin teşhis yolu etkenin izolasyonu ve identifikasyonudur (1, 10, 11). Geleneksel analizlerin rolü en önemli teşhis yollarından biri olarak devam etmektedir (39). İzolasyon amacıyla kullanılan kültürel teknikler zaman alıcı ve pahalıdır. Ayrıca fazla iş gücü ve steril ortamlar gerektirirler. Kültürlerde hızlı üreyen apatojen *Mycoplasma* suşları, saprofitik *Mycoplasma*’lar ya da başka bakteri ve maya gibi mikroorganizmaların üremesi, hiç üreme olmaması, antibiyotik kullanımına bağlı problemler gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir (39, 40, 145). Spesifik besiyerlerine mikotik kontaminasyonu önlemek için katılan talyum asetatın laboratuvar personeline sağlık problemlerine yol açması da önemli dezavantajlarından (111).

MG aerobik veya fakültatif anaerobiktir (6, 126). Özel katı besiyerlerinde ortası düğmeli, kenarları yuvarlak koloniler oluşturur. Bu koloniler besiyeri içine kama gibi gömülmüşlerdir, sahada yumurta görüntüsüne benzetilirler. Düğme şeklindeki orta kısım

yoğun granüler yapıdadır (6, 9, 64, 66). Bu koloni görünümü diğer bakterilerin L- formlarına benzerler. L- formları, normalde hücre duvarı bulunan bazı bakterilerin, penisilin veya diğer bazı maddelerin etkisi altında hücre duvarsız bir yapı kazanması sonucu ortaya çıkan mikroorganizma varyantlarıdır. Sıvı besiyerlerinde oldukça zayıf bir üreme gösterir. Bu nedenle sıvı besiyerlerine % 15-20 at serumu (sterol ve kolesterol gereksinimi için) ve % 10 maya özütü katılmalıdır. Ayrıca besiyerlerine kontaminant bakteri ve mikotik kontaminasyonu önlemek için penisilin ve talyum asetat da ilave edilir. İlk izolasyonda ortamın % 10 CO₂'li olmasının üreme üzerine olumlu etkisi vardır (6, 9, 66).

MG'un izolasyonu için klinik örnekler organ parçaları, doku svabları veya sulandırılmış doku homojenatları, eklem kavitelerinin aspiratları, hava keseleri veya tracheal akıntılar, burun boşluğu, akciğerler ya da akışkan sinus eksudatlarıdır. Bu örneklerin direkt olarak *Mycoplasma* broth veya agarlarına inokulasyonu gerekir. MG ayrıca oviduct ve semende de bulunabilir. Hindi ve tavukların kloakasından da izolasyon olanaklıdır. İnfeksiyonun akut safhalarında (genellikle infeksiyondan sonra 4-8 hafta içinde) etken genellikle üst solunum yollarındadır ve infeksiyonun sürüdeki yaygınlığı oldukça yüksektir. İleri aşamalarda infeksiyonu yakalamak için 30-100 hayvandan örneklerin kültürü gerekli olabileceken, akut safhada 10-20 hayvan yeterli olabilmektedir. Ticari yumurtacı ve damızlık sürülerdeki kronik infekte hayvanlarda etkenin tracheadaki sayısı kültürel metotlarla tespit edilemeyecek kadar düşük olabilir (52). Gharaibeh ve Roussan tarafından (146) Ürdün'de 48 broyler, 21 yumurtacı ve 7 broyler kümesinde yapılan çalışmayla, ELISA testiyle % 73.5 ve bakteriyoloji ile ise % 31.6 oranında MG pozitif kümes tespit edildiği bildirilmiştir.

Örneklerin *Mycoplasma*'ya özel broth kültürlerine ve daha sonra direkt koloni gelişimi açısından *Mycoplasma*'ya özel katı besiyerlerine inokulasyonundan sonra identifikasyon amacıyla IF testleri uygulanabilir. *Mycoplasma*'nın identifikasyonunda Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi'nde [(Office International Epizootie) OIE]) aslında bakteriyolojiden sonra IFAT, indirek IP testi ve üreme inhibisyon testi gibi immunolojik metotlar da bulunmaktadır (10). *Mycoplasma* kolonilerinden direkt veya indirekt IF testi uygulanması saha izolatlarının identifikasyonu için önemli olabilmektedir. *Mycoplasma* kültürünün hızlı identifikasyonu için immunoperoksidaz prosedürü tek başına ya da IF ile kombine olarak kullanılabilir. *Mycoplasma*'nın türlere spesifik hiperimmun serumu da bu diyagnostik testlerin temel reagentidir. Fakat bu testler oldukça fazla iş gücü ve optimize sistemler gerektirdiğinden pratikte çok fazla kullanılmamaktadırlar (52, 123, 129).

Bazı durumlarda şüpheli materyallerden izolasyonda spesifik patojen-free hayvanlarla in vivo testler gerekli olabilir. MG izolasyon ve üretimi embriyolu tavuk yumurtasında, doku kültürlerinde ve deney hayvanlarında yapılabilir (1, 2, 6). MG embriyoyu öldürmekte ve doku kültürlerinde sitopatik etkiler [cytopathogenic effects (CPE)] oluşturmaktadır. Yedi günlük embriyolu yumurtaların sarı keselerine eksudatların veya şüpheli lezyonların sulandırılmalarının inokulasyonu izolasyonun diğer bir yolu olarak uygulanabilir (2, 52).

Genel olarak değerlendirildiğinde kan testleri *Mycoplasma* infeksiyonlarının tanısı için önemli bir serolojik araçtır. Yanlış pozitifliklerin düzeyi çeşitli serolojik testler arasında önemli farklılıklar göstermesine rağmen herhangi bir serolojik testte belirli düzeyde yanlış pozitiflik kabul edilebilir. Bu yüzden tamamen bir tek teste (sistem) güvenilmemesi ve bir doğrulama testinin kullanılması önemle tavsiye edilmektedir (33). Belirli bir testin teknik performansını bilmeden o testin sonuçlarını yorumlamak veya bir testi seçmekten kaçınılmalıdır. *Mycoplasma* kontrol programlarında, serolojik testlerin sonrasında ek olarak PCR testinin kullanımı çok yararlı görülmektedir. Önceden *Mycoplasma*-ari bir sürüde şüpheli veya pozitif serolojik sonuçların bulunduğu olgularda, sürünün güncel durumunun hızla doğrulanması veya seronegatif komşu sürülerin güncel durumunun saptanması, tracheal svabların PCR ile test edilmesi ile kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir (120).

Mikroskobik ve kültürel teknikler, antijen arayan metotlar ve serolojik testler geleneksel diyagnostik mikrobiyolojik analizlerdir. Bu tekniklerin kullanımlarını düşük özgünlük oranı, yavaş üreyen, üremesinde çok hassas ortamlar gerektiren ya da apatojen ve saprofitik mikroorganizmalar gibi sebepler kısıtlamaktadır. İmmunosupresyon, antimikrobiyal tedaviler veya spesifik olmayan kros reaksiyonlar da bu geleneksel diyagnostik mikrobiyolojik analizlerin önemli sorunlarından (1, 10, 11, 147). MG infeksiyonunun teşhisi için yüksek özgünlük ve duyarlılığa sahip hızlı PCR testleri infekte sürülerin laboratuvar teşhisinde oldukça yaygın biçimde kullanılmaktadırlar (148-153). Özelleşmiş laboratuvarlarda PCR başlıca DNA tespit metodu olarak kullanılmaktadır (10).

PCR, DNA aranması için ilk kez 1985 yılında kullanılan, yüksek ölçüde duyarlı ve özgün bir teknik olarak tanımlanmış ve bu tekniğin bulucusu Kary Mullis tanı ve araştırma olanaklarında evrime yol açan bu başarısından ötürü Nobel ödülünü almıştır. Bu evrimsel buluştan sonra diyagnostik mikrobiyoloji yeni bir sürece girmiş, nükleik asit amplifikasyon teknolojileri mikroorganizmaların fenotipik özelliklerinin tanımlanması temeline dayanan standart tanı tekniklerinin yerini almaya, hatta bazı mikroorganizmaların tespiti için altın-standart olmaya başlamıştır (154-155).

Kanatlı endüstrisinde teşhis amacı ile PCR testleri geleneksel metotların sınırlamalarından dolayı, gittikçe artan biçimde kullanılmaktadırlar. *Mycoplasma*'dan ari kanatlı sürülerinin yetiştirilmesinde PCR'la ilgili çalışmalarda önemli gelişmeler yaşanmaktadır (156-161). Yavaş üreyen ve teşhisi günler/haftalar alacak mikroorganizmaların teşhisinde, doğal konaklarının dışında üretilmesi çok zor olan ve bu yüzden tespit edilemeyen mikroorganizmaların teşhisinde PCR'ın kullanımı çok önem kazanmıştır. PCR ile yakın türler arasında ya da alt tipler arasında ayırım yapılabilir ve klinik örnekler ön zenginleştirmeye gereksinim duymadan kontrol edilebilirler (162). PCR geleneksel metotların yerini her zaman tamamen alamaz. Ancak kültürle, serolojik sürü profiliyle ve klinik belirtilerle desteklenirse PCR infeksiyonların hızlı teşhisinde kullanılabilir. PCR'nun en büyük avantajı transport nedeniyle ölmüş olduğundan kültürle üretilmeyecek durumlarda ve kronik persistent etkenlerde kullanılabilmesidir (43).

PCR'nun düşük miktardaki nükleik asitleri kolayca tespit etmekte oldukça spesifik ve hassas olduğu kanıtlanmıştır (36). Bazı durumlarda tavukların trachealarında bulunan MG'un antijenitesi immunolojik sistemin saptayabileceği düzeyde antikor oluşumunu uyarmaz veya diğer bir ifade ile tavuk kan serumundaki antikorlar SPA, HI veya ELISA testleri ile saptanamaz. Bu durumlarda mutlaka bakteriyoloji veya PCR'na gereksinim vardır (163). Canlı MG F suşu bazı ülkelerde ticari yumurtacılar da yumurta randımanındaki düşüşün neden olduğu ekonomik kaybı engellemek için aşı suşu olarak kullanılmaktadır. Aşı suşu olarak kullanılmasına rağmen bu suş tamamen apatojen değildir ve MG'dan ari olan tavuk sürülerine yayılabilir. Hastalığın aşı suşundan mı yoksa saha suşundan mı kaynaklandığı geleneksel serolojik veya izolasyon ve identifikasyon metotlarıyla tespit edilemez. Bunu tespit etmenin en spesifik ve hassas yollarından biri PCR'dur (164). 2008 yılında Raviv ve arkadaşları (114) MG suşlarını bu şekilde ayırabilen bir Real-Time PCR geliştirdiklerini bildirmişlerdir. F, ts-11, 6/85, K5831, K5054 ve R_{low} suşlarıyla 5 Real-Time PCR analizi geliştirmişlerdir. K5831 suşuyla yaptıkları testi aynı zamanda, K5831 suşuyla aşılansın R_{low} suşu ile infekte edilmiş canlı hayvanlarda denemişlerdir. Yaptıkları bu çalışmayla PCR'ın aşı ve saha suşunu başarılı bir şekilde ayırt edebildiğini bildirmişlerdir.

PCR, bakteri, virus, mantar, parazit, protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asitin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotitler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan oldukça özgün ve güvenilir bir tekniktir (42, 43, 165-167). DNA veya RNA dizilerinin sayısal olarak artırılması esasına dayanan PCR'ın en önemli yönü, özel bir DNA dizisi seçip

çoğaltılarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasının önlenemesidir. Bu özellik sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmayıp DNA'nın analiz edilmesini de sağlamaktadır (168, 169). Bu hedef genetik materyaller çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile homojen bir DNA materyali haline getirilip çoğaltılabilir, kolayca identifiye edilebilirler (167-170).

Biraz daha ayrıntılarıyla PCR hedef sıranın komplementeri 2 oligonükleotit DNA primerlerinin enzimatik amplifikasyonuna dayalı bir tekniktir. Isının sürekli birleşme (annealing) ve uzamaya (extension) göre ayarlanmasıyla, bu primerlerin DNA polimeraz enzimi sayesinde hedef sıraya dizilmesi ve her sıcaklık değişiminde ortamdaki bazlarla uzamaları sayesinde amplifikasyon tamamlanmaktadır. Yani PCR prosesi 3'e ayrılır. Önce çift zincirli DNA 90 °C'nin üzerinde bir sıcaklıkta 2'ye ayrılır (denaturasyon), sonra oligonükleotit primerler 50-60 °C'lerde hedef DNA ile birleşmeye başlar (annealing) ve en sonunda 70-78 °C'lerde optimal zincir uzaması meydana gelir ve yeni DNA zinciri oluşturulur (extension). Bu sıcaklık değişimi 30-40 kez tekrarlanarak 2ⁿ sayıda yeni hedef DNA oluşumu sağlanır. Amplifiye olan hedef DNA'nın tespiti ve görüntülenmesi agaroz jel elektroforez ya da uygun problemlerle hibridizasyonla gerçekleştirilir (39, 42, 43, 171).

PCR ile ilgili örneklerde inhibe edici maddelerin bulunması, çevresel kontaminasyon riski gibi problemler vardır. Ayrıca oligonükleotit primerleri dizayn etmekteki kabiliyetimiz sadece mikroorganizmaların bilinen suşlarına ve bu suşların bilinen dizilerine dayanmaktadır. PCR'ın işlevlerinde sorun yaratabilecek bir diğer etmen de mikrobiyal genomlarda oluşan beklenmedik mutasyonlardır. Teşhis laboratuvarlarındaki rutin PCR uygulamalarında, kontaminasyonlardan dolayı önemli problemlere neden olan yanlış pozitiflikler PCR yapılacak laboratuvarların çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerektiğini göstermiştir. Bu yüzden PCR dizayn edilirken ve sonuç yorumlanırken dikkatli olmak gerekmektedir (41, 162, 172).

PCR öncesinde kullanılacak çeşitli marazi maddelerin inhibitörleri de içereceği göz önünde bulundurularak, öncelikle örnek DNA'nın saflaştırılması gerekir. Genetik materyalle yapılacak çalışmalarda moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanabilmesi için öncelikle yüksek molekül ağırlıklı DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilebilmesi gerekir (173). PCR tekniği örneklerden DNA ekstraksiyonu yapılarak ya da ekstraksiyon yapılmaksızın direkt olarak klinik örneğin kullanımıyla yapılabilen hassas bir metottur (150, 151). Fakat DNA ekstraksiyonu yapılmazsa, sonuçlar örnekteki taq polimeraz enzimi inhibitörleri tarafından maskelenebilir (174). Bu problem DNA ekstraksiyonu yapılarak ya da örneklerin

sulandırmaları yapılarak ortadan kaldırılabilir. Fakat örneğin sulandırmasını yapmak örnekteki bakteri sayısı az olduğunda problem yaratabilir. *Mycoplasma* ile çalışıldığında da bu problemle oldukça sık karşılaşmaktadır. DNA ekstraksiyonu ise çok örnekle çalışıldığında oldukça fazla iş gücü gerektirir ve test maliyetini artırabilir. Fakat ekstraksiyon yapıldığında PCR'in analitik ve diyagnostik duyarlılığı artacaktır (175).

DNA izolasyon ve ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan maddeler, yöntem ya da kit ne olursa olsun genel olarak şu 3 aşamayı amaçlamaktadır. Öncelikle hücrenin parçalanması ile DNA'nın açığa çıkması, sonra denaturasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin ayrılması ve DNA'nın çözünür duruma getirilmesi, son olarak ise DNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması gerekmektedir (173).

Ekstraksiyon yöntemlerinde örnek materyale, aranan nükleik asidin büyüklüğüne ve yapısına göre farklı uygulamalardan bahsedilmekte olup her araştırmacı kendisine, kullandığı örneğe ve laboratuvar koşullarına uygun modifikasyonlarını belirleyebilmektedir (165, 176). Ekstraksiyon bu iş için ayrılmış laboratuvarında kontaminasyona karşı alınmış önlemler altında gerçekleştirilmelidir. Günümüzde fenol ekstraksiyon metodu, etanol presipitasyon metodu, chelex metodu, sodyum fosfat metodu ve dondurma-çözdürme metodu kullanılmakta olup, bu metotlar içinde en yaygın olarak fenol ekstraksiyon, etanol presipitasyon ve dondurma-çözdürme metotları kullanılmaktadır (177).

Kontaminantların PCR'a etki mekanizmaları henüz tam anlaşılmış değildir fakat genel olarak reaksiyondaki maddelere kimyasal ya da fiziksel olarak inhibitör etki yapmaktadırlar. Kontaminantlar reaksiyon bileşenlerine iç (endojen) (enzim) ve dış (eksojen) (bakteri, toz, polen) etki gösterirler. PCR inhibitörlerinin en çok görülenleri endojen etkilerdir ve bu etkiler ekstrakte edilmemiş DNA'da bol miktarda bulunurlar. Reaksiyon bileşenlerinden kaynaklanan yani eksojen kontaminasyonlara da rastlanabilmektedir (178).

İnhibitörler genel olarak DNA üzerinde, aşağıda verilen 3 yolun hepsinden ya da bu yolların birinden hareket ederek etki gösterirler. Bu yollar DNA ekstraksiyonu için gerekli hücre lizisinin engellenmesi, nükleik asit degradasyonunun engellenmesi ve hedef DNA'nın amplifikasyonu için taq polimeraz enzimi aktivitesinin engellenmesidir (178). Hess ve arkadaşları (161) 2007 yılında 5 değişik ülkeden 13 farklı laboratuvarla, MG ve MS'un PCR ile tespiti için, laboratuvarlar arası bir karşılaştırma çalışması gerçekleştirmişlerdir. Her laboratuvara bu patojenler için kullandıkları prosedürleri sorduklarında, laboratuvarların yarısının ticari test kitleri kullanırlarken, diğer yarısının kendi protokollerini kullandıklarını

görmüşlerdir. DNA ekstraksiyonu için kullanılan protokollerin aynı DNA ekstraksiyon kitini kullanan laboratuvarlarda bile farklılık gösterdiğini görmüşlerdir. İki laboratuvarın nükleik asit amplifikasyonu için primerleri kendileri geliştirirken, bunlardan birinin amplifikasyon için Real-Time PCR kullandığını görmüşlerdir. Elde edilen tüm sonuçlar, tavuk sürülerinde *Mycoplasma* teşhisi için kendi yöntemlerini kullanan laboratuvarlarda daha kötü sonuçlar alındığı görüldüğü için kullanılan yöntemlerin ve kitlerin daha da geliştirilmesi için bir kaynak oluşturmuştur. 1996 yılında Silveria ve arkadaşları (175) MG ve MS ile infekte edilmiş tavukların SPA, HI ve ELISA gibi serolojik testler ve PCR ile kontrollerini yapmışlardır. MG infekte tavuklardan alınan tracheal svabları üç ayrı sıvı (phosphate buffered saline, Frey's broth ve 10 Mm Tris-HCL/250 MM ethylenediaminetetraacetic acid/ % 2.5 sodyum dodecyl sulfat) ile muamele etmişler ve bu tracheal svabları PCR çalışmalarında kullanarak karşılaştırmışlardır. DNA ekstraksiyonu için nonfenolik ve fenolik metodu kullanmışlardır. En iyi PCR sonuçlarını svabların PBS ile kullanımı ile almışlar ve DNA ekstraksiyonu için nonfenolik metodu, fenolik metotla karşılaştırdıklarında, *Mycoplasma*'nın PCR ile teşhisi için nonfenolik metodun daha ucuz ve kolay olduğu sonucuna varmışlardır.

PCR'da kullanılan temel bileşenler hedef DNA (templeyt), taq DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksinükleotitler, tampon ve Mg^{+2} iyonlarıdır (178, 179). PCR reaksiyonundaki optimal olmayan koşullar birçok sebepten kaynaklanabilir. Uygun olmayan primerlerin, zaman ve sıcaklık koşullarının kullanımı, özellikle annealing sıcaklığı, polimeraz enzimi kalitesi ve Mg^{+2} konsantrasyonu en önemli parametrelerdendir. Reaksiyon koşullarının optimize edilmesi ve reaksiyon karışımına koyulan tüm maddelerin uygun miktarları için denemeler yapılarak en uygun miktarlar ve reaksiyon koşulları bulunup inhibitör etkiler azaltılabilir. Bu faktörlerin optimizasyonu pozitif kontrolle erime noktasına göre farklı sıcaklıklarda reaksiyon çalışılarak ya da bu maddelerin çeşitli oranda sulandırılmalarıyla denemeler yapılarak sağlanabilmektedir (180-182).

Kit üreticileri standart reaksiyon reagentleri yanında Mg^{+2} 'u ayrı olarak sağladıkları için Mg^{+2} konsantrasyonu aslında optimize edilecek koşullar arasında en kolayıdır. Tek bir reaksiyonda her örneğe farklı miktarlarda Mg^{+2} koyularak yapılan denemeler kısa süre içinde sonuçlandırılabilir (182). PCR reaksiyon karışımında 0.5-2.5 mM $MgCl_2$ olması gereklidir. Mg^{+2} iyonları enzim aktivitesine, primer bağlanmasına ve DNA erime ısısına etki edebilir (183, 184). dNTP'ler Mg^{+2} iyonunu bağladıkları için dNTP konsantrasyonundaki artış serbest Mg^{+2} konsantrasyonunda azalmaya yol açacağından optimizasyon bu durum göz önüne

alınarak yapılmalıdır (182). Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz enzimi aktivitesini uyarır, çift iplikli DNA'nın erime derecesini (T_m) arttırırlar ve primer-templeyt DNA hibridizasyonunu sağlarlar. Bu nedenle $MgCl_2$ 'ün PCR'ın özgünlüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün oluşumuna neden olmaktadır (179, 184).

Tekrarlanan dizilerden oluşmayan, sentetik olarak kolayca hazırlanabilen ve 15-40 oligonükleotitden oluşan primerler, kullanım amaçlarına göre değişiklik göstermektedirler. Primerlerin üzerinde bulunan baz sıraları, sadece hedef DNA üzerinde bir bölgede bulunmalı, başka yerlerde veya başka hedef DNA sekanslarında bulunmamalıdır (168, 182, 185). Primer tasarımı yapılırken dört bazın da eşit oranda kullanımına özen gösterilmeli, primerler tekrarlı bölgeler içermemeli ve primer çiftlerinin 3' uçları birbirlerine komplementer yapıda olmamalıdır (179). Primerlerin yapısında % 50-60 kadar G+C bazları bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olur. Ayrıca böyle birleşmeler, yüksek sıcaklıkta oluşturulan reaksiyon sırasında görülebilecek non-spesifik bağlanmaları da azaltmaktadır (168, 182, 185). Primer konsantrasyonunun genel olarak 0.1-0.5 μM arasında olması tavsiye edilmiştir. Yüksek primer konsantrasyonları primer-dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan bantların oluşumuna yol açmaktadır. Primer-dimerler, küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirleriyle bağlanması ya da DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotitleri kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlanması neticesinde oluşan bantlardır (184, 185).

Geleneksel PCR'da ayrı reagent olarak kullanılan dNTP'lerin final konsantrasyonları 20-200 μM arasında olmalı ve 4 nükleotit de aynı oranda bulunmalıdır. Hedef olmayan alanlarda yanlış bağlanmaları azaltmak için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu kullanılmalıdır. Nükleotitlerin optimal konsantrasyonunu tespit etmek için amplifiye edilecek ürünün uzunluğu, $MgCl_2$ ve primer konsantrasyonları, çoğaltılmış ürünün büyüklüğü ve PCR döngü sayısı dikkate alınmalıdır. Nükleotitlerin düşük konsantrasyonda kullanılması PCR'nun özgünlüğünü arttırmaktadır (179, 186).

Ön denaturasyon 5-10 dakika boyunca 94-95 $^{\circ}C$ 'de gerçekleştirilir. Denaturasyon zamanı ve sıcaklığı G+C oranına dolayısıyla da çoğaltılmak istenen bölgenin büyüklüğüne bağlıdır (187). G+C'ce zengin dizilerde denaturasyon sıcaklığı artırılabilir. Denaturasyonunun tam olmaması halinde verim düşer. DNA'nın uzun süre yüksek sıcaklıkta bekletilmesi ise DNA polimeraz enzimi aktivitesini düşürmektedir (181, 188-190).

Primerlerin yapışma sıcaklığı 55-72 °C arasında değişmektedir. Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve uygulanacak sıcaklık amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine, uzunluğuna ve konsantrasyonuna bağlıdır. Primer yapışması için gerekli olan sıcaklık hesaplanırken her bir Adenine (A) ve Thymine (T) nükleotiti için 2 °C hesaplanır (181, 184, 188-190). Yapışma sıcaklığı teorik olarak spesifik DNA eşleşmesinin sağlanması amacıyla 2 primerin erime sıcaklığının birkaç derece altında olması gerekir (40, 187). Bu yüzden yapışma sıcaklığının optimizasyonu, primer-templeyt kompleksinin erime sıcaklığının [basit formülle $T_m = (G+C)4 + (A+T)2$] hesaplanmasıyla başlar. Daha kompleks formüller kullanılabilir (187, 191, 192). Fakat pratikte erime sıcaklığı tampon içeriği hatta primer ve templeyt konsantrasyonundan etkilenebildiği için formüllerle sadece ortalama bir değer hesaplanabilir. Bazı primerler nedeni bulunamayan sebeplerden (193) optimizasyona açıkça direnç gösterirler (182). Yüksek sıcaklığın kullanılması yanlış nükleotitlerin primerlerin 3' uçlarına bağlanmasını önler. Hibridizasyon sıcaklığının düşük tutulduğu durumlarda ise spesifik olmayan küçük DNA fragmentlerinin oluşumu söz konusudur (190). Ekstensiyon sıcaklığı ve zamanı yine seçilen bölge ve G+C oranına bağlı olarak taq polimeraz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 72-78 °C'lerde gerçekleştirilir (187). Uzama hızı 35-100 nükleotit/saniyedir. Uzama zamanı hedef dizinin konsantrasyonuna, uzunluğuna ve sıcaklığa bağlıdır. En uygun uzama süresi ortalama 1 dakikadır. Siklus sayısı templeytin DNA konsantrasyonuna, primer ekstensiyonu ve amplifikasyonunun etkinliğine bağlıdır. Az miktarda DNA ile başladığında en fazla 40 siklus, daha fazla DNA ile başladığında ise ideal siklus sayısı 30 olmalıdır. Siklus sayısının fazla olması hatalara yol açarak spesifik olmayan ikincil ürünlerin oluşumuna neden olur (187, 194).

PCR reaksiyonunda kullanılan parametreler ve reagentler genel olarak ele alınırsa, PCR amplifikasyonunun etkinliğine etki etmeleri bakımından 4 gruba ayırmak mümkündür. Birinci grup PCR reaksiyonundaki siklus sayısıdır. Her ne kadar hedef DNA'nın amplifiye edilecek miktarını siklus sayısı belirlese de DNA konsantrasyonu arttıkça, primer bağlanmasından ziyade PCR reaksiyonu neticesinde meydana gelen sarmalların birbirine bağlanması söz konusu olur. Bunun sonucu olarak geç PCR sikluslarının erken siklulara oranla daha az etkili olduğu bildirilmiştir (168). İkinci önemli faktör amplifiye edilecek hedef DNA miktarıdır. PCR reaksiyonu, yüksek konsantrasyonda hedef DNA ($>10^7$) ihtiva eden numunelerle çalışıldığında düşük konsantrasyondakilere ($<10^4$) nazaran daha düşük bir düzeyde amplifikasyonla neticelenir (195, 196). Üçüncü faktör hedef DNA sekansının uzunluğudur. PCR'in etkinliği ile sekans uzunluğu arasında ters orantılı bir ilişki mevcuttur.

Dördüncü önemli faktör ise primer bağlanması ve hibridizasyon için kullanılan sıcaklık ile ilgilidir (168). Hibridizasyon sıcaklığı ile PCR'in özgünlüğü arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur. Yüksek ısıda PCR'da önemli bir problem olarak kendini gösteren yanlış hibridizasyon oluşma ihtimali düşmektedir (190).

Temelde hava ısıtılmalı ve blok ısıtılmalı olmak üzere iki çeşit PCR makinesi vardır. Bu iki sistem arasında önemli farklar bulunmaktadır. Öncelikle hava bloğa göre çok daha hızlı ısınıp soğuduğu için PCR zamanı minimuma inmektedir. Geleneksel blok ısıtılmalı PCR makinelerinde aksesuarların sıcaklık geçirgenliğinin az olması, arzu edilen sıcaklığa uzun zamanlarda erişilebilmesi, dolayısıyla zamanın çoğunun denaturasyon, annealing ve ekstensiyon basamaklarına geçişte harcanması, bu aletlerin kullanımlarıyla ilgili büyük dezavantajlar getirmektedir. Günümüzde artık pek kullanılmayan geleneksel blok ısıtılmalı thermalcycler makinelerinde PCR süresi 2-4 saat almaktadır. Özetle PCR makineleri arasındaki performans farklılıkları PCR sonucunu kalite ve zaman yönleriyle etkilemektedir (47, 178, 197).

PCR makinesi kadar PCR reaksiyon hacimleri ve kullanılan PCR tüplerinin özellikleri de PCR performansını etkileyen diğer önemli öğelerdir. İyi bir PCR tüpünün sahip olması gereken özellikler tüpün kapağı kapandıktan sonra buharlaşma olmaması, düşük ısıl kütleyle sahip olması, sıcaklık geçirgenliğinin yüksek olması ve çapraz reaksiyonlara izin vermeksizin reaksiyon reagentlerinin tüplere konulabilmesidir. Kalın çeperli PCR tüplerinin, içerdikleri örneklere sıcaklık transferini randımanlı bir şekilde yapamamakla beraber tüpün yüzeyine temas eden örnek hacminin sınırlı olması, PCR protokollerinde belirlenen sıcaklıkların örneklerde sağlanamaması veya örneğin belirlenen zamandan daha kısa bir süre final sıcaklığına maruz kalması PCR'in verimli bir şekilde uygulanmasını engelleyen etmenlerdir. Bundan dolayı ince çeperli 200 µl'lik tüpler PCR'da tercih edilmelidir (197).

PCR amplifikasyonu için kullanılan farklı bir taşıyıcı ortam ise bizim kullandığımız borosilikat cam borucuklardır. Bunlar içinde PCR yapmanın avantajları şu şekilde özetlenebilir. Borosilikat kapiller cam PCR borucukların yüzeylerinin geniş olması nedeniyle reaksiyon hızının ve veriminin yüksek olması, kapiller borucukların plastik kapaklarla uçlarının kapatılması sonucu buharlaşma ve çapraz kontaminasyon oranının en aza indirgenmesi ve borucukların sıcaklık geçirgenliğinin yüksek olması, sonucu PCR lehine çevirmektedir. Kapiller PCR'da zamanın kısa olmasının nedeni, kapiller borucukların çevresinde havanın dönerek hızla ısıtılmasıdır. Geleneksel PCR'da ise bilindiği gibi PCR tüpleri çevresini saran metal bloklar çevresinde dönen sıvı ısıtılmaktadır (197-199). Cam

kapillelerdeki floresan ışma Real-Time PCR aletlerinde fiber optik sistemle emisyon ve eksitasyon ışmaları şeklinde sinyal olarak algılanır. Bu etki kapiller içindeki mikro hacimdeki sıvıda floresan izlemeye ve görüntülemeye yaramaktadır. Tüm bunların yanında borosilikat cam borucukların silindirik yapısı dolayısıyla yüzey arttırılmış ve sıcaklık reaksiyona daha çok etkimiş olur (197, 199-203). Bu durum annealing, ekstensiyon ve denaturasyon sürelerinin de kısalmasına neden olmaktadır. Bu sistemlerde PCR süresi 10 kat kadar kısaltılmış olmaktadır. Kapiller PCR’da, PCR basamaklarında oluşan süre kısalmasıyla primerlerin yanlış bağlanma olasılığı en aza indirildiği için spesifik PCR ürünü oluşma olasılığı ve miktarında da artış sağlaması bir başka avantajdır (197-199).

Geleneksel PCR tabanlı testler, multipl kompleks basamaklar ve bu nedenle uzmanlaşmış kişiler gerektiren, örneklerin dışarıdan başka DNA’larla kontaminasyon riskini artıran açık reaksiyon sistemleridir. Bu testlerin kompleksliğine bir de maliyet yüksekliği eklenmektedir (147, 204). PCR reaksiyonundan sonra PCR ürünü ortaya koymak için agaroz jel elektroforezis, southern blot, ELISA benzeri sistemlerden yararlanır. Bu sistemler tatminkar sonuçlar verse de PCR sonrası ampikonu ortaya koymada işlemlerin yoruculuğu, iş gücü kaybı ve artan kontaminasyon riski kaçınılmazdır (39, 40, 172). Geleneksel PCR’la oluşan ürünlerin tespiti için en çok kullanılan metot horizontal agar jel elektroforezdir. Fakat aynı büyüklükte nonspesifik amplifikasyon ürünleri yanlış pozitif sonuçlar doğurabilmektedir. Bu yüzden özgünlüğü sağlamak için proba dayalı southern ya da mikroplyt hibridizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu prosedürler büyük miktardaki örneklerle kolay ve hızlı sonuçlar sağlamaktadırlar. Fakat bu metotların bazıları da amplifikasyon ve deteksiyonun aynı yerde olmasından kaynaklanan kontaminasyon riski taşımaktadırlar. PCR uygulamalarının ana problemini de zaten farklı kaynaklardan gelebilecek kontaminasyonlardan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar oluşturmaktadır (39-41). PCR sonrası hibridizasyon ile yakalama metotlarının jel tabanlı metotlara göre daha duyarlı ve özgün olduğu, optimize edilebilmelerinin daha kolay olduğu rapor edilmiştir. Fakat bu metotlar kimi zaman jel tabanlı metotlardan daha zahmetli ve zaman alıcı çoklu sinyal geliştirme basamakları ve ek malzeme gerektirmektedirler. Örneğin ELISA-tabanlı metotlarda DNA ile birleşen özel antikorlara, enzim ve substrata ihtiyaç vardır. Her iki yöntemle (jel elektroforezi ve ELISA-tabanlı yöntemler) de PCR ürünü oluşurken gözlemleyebilmek mümkün değildir ve PCR ürünü özenli bir şekilde alınmazsa potansiyel kontaminasyon kaçınılmazdır. PCR teknolojisindeki son yenilikler PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırarak, PCR ürününün Real-Time tespitini olanaklı hale getirmektedir (205-206).

Son zamanlarda PCR amplifikasyonunu ve amplifiye olmuş ürünün (amplikon) kontrolünü aynı kapalı sistemlerde gerçekleştiren ve amplikonun görüntülenmesine izin veren aletler geliştirilerek gıdalardan, memeli genomundan, genetik olarak geliştirilmiş organizmalardan, insan ve veteriner mikrobiyoloji alanlarındaki çok değişik örneklerden nükleik asitlerin aranmasında kullanılmaya başlanmıştır (207-209). Bu aletler sıcaklık değişimini konvansiyonel termocyclerlara göre çok daha hızlı bir şekilde gerçekleştirirler ve her PCR siklusu sonunda, hedef DNA'ya nükleik problar veya floresan boyalar bağlandıktan sonra açığa çıkan floresanı detekte eden sistemler içermektedirler. Bu test sistemi Real-Time PCR olarak adlandırılır (147).

1966'dan beri etidyum bromürün nükleik asitlere bağlanınca floresanını artırdığı bilinir. Bu floresan kimyası PCR'la ve gerçek zamanlı videografiyle birleşince 1990'ların başlarında Real-Time PCR'ın doğmasını sağlamıştır (210, 211). Real-Time PCR 1980 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilen, araştırmacılara istenilen genin spesifik bölgesinin 1 milyondan fazla kez çoğaltılmasını sağlayan PCR'ın çok önemli yeni bir metodudur (41, 211).

Roche moleküler sistemlere bağlı olarak Higuchi ve arkadaşları (44) Real-Time PCR'ı ilk kez geliştirmişlerdir. Real-Time PCR, PCR reaksiyonu sırasında oluşan ürünleri görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı ve bunları tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan bir metottur (34, 210-212). Real-Time PCR ile sağlanan önemli bir gelişme, sonuçların hızlı bir biçimde alınabilmesidir. Bu hız genel olarak siklus sürelerininin kısılması, PCR sikluslarından sonra yapılan tespit işlemlerinin olmaması ve oluşan ürünlerin erken tespitini sağlayan hassas floresan tespit ekipmanlarının kullanımıyla sağlanmaktadır. Real-Time PCR ile kros kontaminasyon ve çevresel kontaminasyon riski çok aza indirgenir. Testi yapan kişiden kaynaklanan yanlışlıklar olasılığı, test süreci içinde yapılan işlem sayısı azaldığı için düşmektedir (39, 42, 43).

Birçok isimlendirme yapılan Real-Time teknolojisi literatürde 'kinetik PCR', 'homojen PCR', 'kantitatif Real-time PCR' gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (211, 213). Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme, mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme, tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, single nükleotid polimorfizm (SNP) analizi ve kromozom bozukluklarının tespiti gibi alanlarda da Real-Time PCR'ın kullanımı mümkündür (40, 213). Bu metot protein seviyesi ve fonksiyonlarındaki

potansiyel farklılıklar gibi biyolojik proseslerin daha iyi anlaşılması için de oldukça kullanışlıdır. Real-Time PCR'ın en önemli yararlarından birisi de araştırmacının DNA'nın başlangıç seviyesi çok az miktarda olsa dahi bu seviyenin belirlenmesine imkan vermesidir. Amplifikasyon sürecinde örnekteki DNA ne kadar yüksekse, floresan sinyal o kadar çabuk eşik seviyesine çıkmakta bu da miktar tayinini mümkün kılmaktadır (41). DNA'nın başlangıç seviyesinden bağımsız olarak, sadece negatif ve pozitif olarak sonuç veren geleneksel PCR'da ise miktar tayini oldukça zor olmaktadır.

PCR reaksiyonu kinetik olarak 3 fazda gerçekleşir. Bunlar eksponensiyel, lineer ve plato fazlarıdır. PCR reaksiyonu tüm sikluslarda mükemmel etkinlikle devam etmez. Belirli bir siklustan sonra ortamda reagentler azalmaya başlar ve reaksiyon son faz olan plato fazına ulaşır. İstenilen ürünün 0.3-1 pmol civarına ulaşması ile birlikte, oluşan ürünün logaritmik olarak azalmasına plato etkisi denir. Bu etkinin nedeni substrat kullanımının azalması, enzimin kararsız hale gelmesi, son ürün inhibisyonu, spesifik ürün inhibisyonu veya primer-dimer yapışması ve ürünün tam olarak denatüre olamamasıdır (194). Reaksiyon bileşenleri DNA'yı sadece belli bir miktara kadar etkili bir şekilde amplifiye edebilir, PCR reaksiyonunun sonunda reaksiyonun başlangıcındaki DNA'yı doğru bir şekilde ölçebilmek mümkün değildir. Yani reaksiyonun başında ne kadar spesifik DNA'nın olduğu ve dolayısıyla reaksiyonun sonunda bununla orantılı olarak ne kadar spesifik DNA oluştuğunu geleneksel PCR'la ölçüm yaptığımız son faz olan plato fazında ölçmek mümkün değildir (41). Real-Time PCR etkin ve doğru ölçümün yapılabildiği eksponensiyel faz boyunca spesifik DNA'nın ölçümünü yaparak geleneksel PCR'a karşı avantaj sağlamaktadır. Bu ölçüm reaksiyonun başlangıcındaki spesifik DNA miktarıyla orantılı olduğu için miktar tayinine de imkan sağlamaktadır (41, 214). 2005 yılında Mekkes ve arkadaşları (34) MG'nin kalitatif ve kantitatif tespitini sağlayan Real-Time PCR'ın deteksiyon limitini ve duyarlılığını değerlendirmişlerdir. MS ve MM dahil olmak üzere diğer kanatlı *Mycoplasma*'ları ile kros reaksiyon gözlememişlerdir. PCR'ın deteksiyon limitinin kültür ve geleneksel PCR metodlarına göre 10-1000 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Real-Time PCR ve PCR testleri ile MG infeksiyonunun teşhisinin yanı sıra, bu hastalığın aşı suşu ile saha suşlarının ayrımı da yapılabildiğinden bahsedilmişti. MG canlı aşı suşlarının kullanıldığı durumlarda, sürülerdeki infeksiyonun taranması amacıyla aşı ve saha suşlarının ayrılabilmesi gerekmektedir. İyi optimize edilmiş Real-Time PCR buna da olanak sağlamaktadır (163). Yeni yapılan son 2 çalışmayla (114, 215) MG-aşı suşu ve wild-tip suşlar arasında Real-Time PCR ile başarılı bir ayırım gerçekleştirilebilmiştir.

Real-Time PCR teknolojisi, hızla piyasa marketlerine girmiş, ticari olarak yaygınlaşmış ve bilimsel olarak kabul edilmiştir. Real-Time PCR ekipmanları ilk kez 1996'da Applied Biosystems (ABD) tarafından ticari olarak sunulmuş daha sonra diğer şirketlerde piyasaya yeni makineler çıkarmışlardır (41). Ticari olarak satılan birçok Real-Time cihazı bulunmaktadır. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar cihazların optik sistemleri ve özellikle kullanılan floresan boya türünün eksitasyon ve emisyon dalga boyları, ısıtma türüne bağlı olarak reaksiyon hızları ve aynı anda paralel uygulanabilen reaksiyon sayısı kapasiteleridir. Ticari olarak satılanlardan Stratagene M × 3000 p, M × 3005p ve M×4000, Applied Biosystems 7300 ve 7500, Chromo4, Smart Cyclers, Rotor-Gene, LC en fazla kullanılanlardır (40).

LC sisteminde PCR ürünlerini tespit etmede pek çok metot kullanılmaktadır. Proba dayalı sistemlerden, TaqMan problemleriyle spesifik hibridizasyona dayalı 5'-nuclease metodu sık kullanılan metottur. SYBR Green (SG) gibi PCR ürününe bağlanan ve floresan veren boya türünün kullanımı da yaygındır (216). EtBr ya da SG I gibi DNA bağlayan boya türleri, hidroliz problemler, hibridizasyon problemler, moleküler beaconlar, sunrise ve scorpion primerler ve peptid nükleik asit light-up problemler gibi çeşitli sistemler mevcuttur. Bu sistemlerin hepsi meydana gelen ürünün her siklusta analizini sağlarlar (41, 201). Problemlere dayalı sistemlerde sadece probun bağlı olduğu bölümden baz değişimlerini görmemiz mümkündür. Kapalı tüpteki homojen erime metodu PCR ürünü üzerindeki tüm baz değişimlerini tespit edebilmektedir (217-221). SG I gibi DNA'ya bağlanan boya türlerinde, problemler metotlarının aksine, tüm DNA'nın baz değişimleri oluşan erime eğrisi ile görülebilmektedir (217).

Roche LC PCR da oluşan ürünlerin ve miktarlarının tespiti için floresansla çalışan hızlı hava ısıtmalı bir thermal cyclerdir. LC programının bir özelliği olan erime eğrisi analizi her PCR basamağından sonra spesifik PCR ürününün identifikasyonunu sağlar (46, 47). Amplifikasyon cam kapillallerin içinde geliştirilmiş PCR miksi kullanılarak gerçekleştirilir ve ürün çift zincirli DNA'ya bağlanan floresans veren boya (SG, Sybr Gold) ile tespit edilir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan birçok boya geliştirilmesine rağmen (222, 223) en çok kullanılan ve en basiti SG'dir (224, 225). SG'nin bu kadar yaygın kullanılmasının sebeplerinden biri de diğer kimyasallarla karşılaştırıldığında ucuz olan maliyetidir (226). Çift sarmal DNA'nın minör boşluğuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası aktivitesinin yalnızca % 6'sını kaybeder (40, 224). SG I floresan boya, DNA'ya bağlandığında çift zincire bağlanmadan serbest halde bulunduğu halinden 1000 kat fazla floresans verir. Bu yüzden tüm

amplifikasyonlar, PCR cihazında okunan floresan miktarının eş zamanlı olarak artmasıyla takip edilebilmektedir (225).

PCR'ın başlangıcında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SG I boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. İlk sikluslarda sinyal zayıftır, ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış Real-Time cihazının monitöründen izlenebilir (40).

LC yöntemi SG I boyası ile optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak vermektedir. Floresan işaretli problemlere ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra bu yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerinin çoğaltılması ile yine floresan açığa çıkacağından, bu artış her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez, yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında, primerlerin birbirleri ile bağlanmaları sonucunda primer dimerler olarak adlandırılan çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışımaya gözlenebilir. SG boyası erime eğrisi analizine etkisi, GC'den zengin sıralara bağlanabilmesi ve PCR'ı inhibe etmesi gibi sınırlamaları da vardır. 2007 yılında Gudnason ve arkadaşları (226) SG ile alınan sonuçlara karşılık, SYTO-13 ve SYTO-82 adlı 2 boyanın PCR'ı inhibe etmediğini, GC'den zengin dizilere bağlanma tercihinde bulunmadığını ve hatta yüksek konsantrasyonlarda bile erime sıcaklığının etkilenmediğini bildirmişlerdir.

SG'in bu sınırlamalarını ortadan kaldırabilmek ve çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını reaksiyon sırasında belirlemek için PCR reaksiyonu sonunda erime eğrisi analizi (melting curve, dissociation) yapılması gerekmektedir. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (T_m) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı her gen için baz dizilimine, çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlı olarak değişmektedir ve her gen bölgesi için farklıdır (227, 228). Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için özeldir. Bu yöntem bilinmeyen 2 DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Erime eğrisi analizleri yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature = T_m) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer (227). Bu sıcaklık erime sıcaklığı olarak adlandırılır ve özgün olmayan ürünlerin ayrımını sağlamanın en kolay yoludur. Primer-dimer ürünler hedef üründen daha kısa oldukları için daha düşük erime sıcaklığına sahiptir ve bu analizle kolayca ayrımları yapılabilir (40). Yani yüksek sıcaklık

pikleri doğru ürün oluştuğuna işaret ederken, düşük sıcaklıklar yanlış ürün ve eşleşmelere işaret etmektedir (217).

MG infeksiyonunun tanısında kültürlerde karşılaşılan zorluklar, serolojik testlerdeki yanıltıcı sonuçlar ve güçlükler nedeniyle, moleküler düzeydeki gelişmeler sonucunda PCR tekniği önem kazanmış ve sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (146, 215, 229- 232). PCR tekniğinin, kısa sürede en doğru sonuç alınabilmesi, bakteriyel kontaminasyonlardan etkilenmemesi, antibiyotik kullanımı sonrasında da doğru sonuç alınması ve tür spesifik olması araştırmacılar tarafından tercih edilme nedeni olarak belirtilmiştir (38, 105, 233).

Sonuç olarak DNA tabanlı testler geleneksel metotların yerini tamamen almasa da PCR metotlarının kullanımı birçok *Mycoplasma* türünün tanısında doğru ve güvenli sonuç verebilir. Buna karşın DNA tabanlı testler yeni çıkan MG türleri ve onların patojenite, immunojenite ve antimikrobiyal direnç gibi özelliklerini tespit etmeye yetmez. Fakat *Mycoplasma* bakteriyolojisi ve serolojisinde yaşanan birçok problemler sebebiyle MG-LC PCR, MG seropozitif damızlık kümeslerden alınan tracheal svablardaki MG infeksiyonunu saptamada oldukça hassas ve etkilidir. Bu hızlı ve hassas Real-Time PCR'ın LC ile kullanımıyla MG'un teşhisinde kısa zamanda oldukça güvenilir sonuçlar almak mümkün olmaktadır.

Bu tez çalışmasında, tavuk tracheal svablarında MG'un aranması için MG-LC PCR sistemi optimize edilmiş ve bakteriyolojik ve serolojik bir yöntemin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

GEREÇ

1. Klinik Örnekler

1.1. Tracheal Svab Örnekleri: Tracheadan örnek almak için steril, uzun pamuk svablar kullanıldı. Aralık 2007- Eylül 2008 tarihleri arasında 31 adet damızlıkçı kümesten toplanan 646 tavuğa ait tracheal svab, fermuarlı steril poşetlerde buz kalıpları ile laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmaması için numuneler alınırken her örnek için ayrı eldiven kullanıldı. Alınan tracheal svablar aynı gün içinde laboratuvara getirildi ve çalışıldı.

1.2. Kan Serumu Örnekleri: Tracheal svabları alınan aynı tavuklardan v. subcutanea ulnaris'ten kan örnekleri de alınarak soğuk zincir altında aynı gün laboratuvara getirildi. Serumları ayrılan kan örnekleri bekletilmeden ÇLA testi ile incelendiler.

1.3. MG-ari Tracheal Svablar: Tavuklardan steril olarak tracheal svablar ve v. subcutanea ulnaris'ten kan örnekleri alındı. Kanların serumları çıkarıldıktan sonra, ÇLA testiyle MG negatif olan serumlara ait 20 adet tavuğun tracheal svabları ayrıldı. Bu svablar MG S6 suşunun Frey's broth'daki kültürünün çeşitli oranlardaki sulandırılmalarıyla karıştırılmak üzere -20 °C'lik derin dondurucuda saklandılar.

2. MG S6 ve İlgili *Mycoplasma* Suşları: Optimizasyonda kullanılan MG S6 suşu Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nde *Mycoplasma* laboratuvarı şefi Dr. Ümit Özdemir'den sağlandı. MG S6 suşu, LC PCR aletinin MG için optimize edilmesi amacıyla ve sonraki klinik örneklerin çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanıldı. Diğer *Mycoplasma* suşları, Dr. Stanley Kleven ve Victoria Leiting'den (Department of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Atina, GA) sağlandı. Bu suşlarda MG-LC PCR'ın spesifitesinin belirlenmesi amacıyla kullanıldılar. Suşlar (Tablo- 1) kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandılar.

3. ÇLA Testi Antijeni: (MG Antijen- Nobilis, Intervet International B.V. Holland). ÇLA testi için antijen olarak, boyalı MG pleyt test antijeni kullanıldı.

4. Besiyerleri

4.1. *Mycoplasma* Buyyon

Alınan tracheal svablardan *Mycoplasma* izolasyonu yapılmasında, LC PCR'ının deteksiyon limitini belirlemede kullanılan sulandırılmaların yapılmasında, *Mycoplasma* suşlarının çoğaltılıp saklanması için kullanılmak üzere Becton Dickinson (BBL) [(*Mycoplasma* Broth Base (Frey), katalog no: 212346)] kullanıldı.

BBL *Mycoplasma* Broth Base (Frey)

1 litre içerisindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

Pancreatic Digest of Casein	7.5 g
Papaic Digest of soybean meal	2.5 g
Yeast extract	5.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Potassium Chloride	0.4 g
Magnesium Sulfate	0.2 g
Disodium Phosphate	1.6 g
Monopotassium Phosphate	0.1 g

Hazırlanışı: Frey's brothdan 22.5 g tartılıp 1 litre distile suyla karıştırıldı. Su banyosunda homojen hale gelene kadar eritildi. 121 °C'de 15 dakika otoklav edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutulup içerisinde steril inaktive at serumundan 100 ml eklendi ve iyice karıştırıldı. Besiyerleri steril vidalı kapaklı cam tüplere 10'ar ml dağıtıldıktan ve sterilite kontrolü için 37 °C'de 1 gün inkube edildikten sonra, kontaminasyon sonucu üremeye bağlı renk değişimi ve bulanıklık yönünden incelendi. Renk değişimi ve bulanıklık görülmeyen steril besiyerleri +4°C'lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde *Mycoplasma* izolasyonu amacıyla kullanıldı.

4.2. *Mycoplasma* Agar

[BBL *Mycoplasma* Agar Base (PPLO Agar Base) (katalog no: 211456)]. MG'un klinik örneklerden izolasyonu için kullanıldı.

BBL *Mycoplasma* Agar Base (PPLO Agar Base)

1 litre içerisindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

Beef heart, infusion from (katı)	2.0 g
Pancreatic digest of casein	7.0 g
Beef extract	3.0 g
Yeast extract	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	14.0g

Hazırlanışı: 34 g tartılarak 1 litre distile suya eklenip karıştırıldı. Tamamen erimesi için su banyosunda 1 dakika kaynayacak şekilde bekletildi. 121 °C'de 15 dakika otoklav edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutulup içerisinde steril inaktive at serumundan 20 ml eklendi ve iyice karıştırıldı. İçerisine steril suyla eritilerek homojen hale getirilen Difco *Mycoplasma* supplementten (penisilinli veya penisilinsiz) % 30 miktarında koyuldu. Steril 9 cm'lik petrilere 25'şer ml döküldükten sonra sterilite kontrolü için, 1 gece 37 °C'lik etüvde bekletildi. Kontrolde geçirilen besiyerleri +4 °C'lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde *Mycoplasma* izolasyonu amacıyla kullanıldı.

4.3. *Mycoplasma* Supplement (Penisilinli)

Difco *Mycoplasma* supplement (katalog no: 283610) BBL *Mycoplasma* Agar Base içerisinde % 30 oranında katılacak şekilde hazırlandı.

Difco *Mycoplasma* Supplement (Penisilinli)

1 şişe [30 ml (100 g besiyeri için)] içeriğindeki maddeler ve miktarları aşağıdaki gibidir.

Yeast extract	0.01 g
---------------	--------

At serumu 1.5 g

1 şişe içine 30 ml steril distile su katılıp karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra 70 g *Mycoplasma* agarın içerisine ilave edildi.

4.4. *Mycoplasma* Supplement (Penisilinsiz)

Difco *Mycoplasma* supplement (katalog no: 212292) BBL *Mycoplasma* Agar Base içerisine % 30 oranında katılacak şekilde hazırlandı.

Difco *Mycoplasma* Supplement (Penisilinsiz)

1 şişe [(30 ml (100 g besiyeri için)] içeriğindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

Yeast extract	10.0 mL
At serumu	20.0 mL
Thallium Acetate	50.0 mg

1 şişe içine 30 ml steril distile su katılıp karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra 70 g *Mycoplasma* agarın içerisine ilave edildi.

5. DNA Ekstraksiyon Kiti: QIAGEN marka (QIAMP DNA mini cit, kod: 51304, Almanya). MG S6 suşu, MG-LC PCR'ın spesifitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan diğer *Mycoplasma* suşları ve klinik örneklerin DNA'sını izole etmek amacı ile kullanıldı. Kit 20-25 °C'de muhafaza edildi.

DNA ekstraksiyon kitinin (QIAMP DNA mini kit) içeriği aşağıdaki gibidir.

- ATL Buffer
- Proteinaz K
- AL Buffer
- Alkol
- AW1 Buffer
- AW2 Buffer

- AE Buffer

6. Spektrofotometre: NanoDrop ND-1000 V3.3 Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA). İzole edilen DNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesinde kullanıldı.

7. Deiyonize ve Ultra Saf Su Sistemi: MILLIPORE marka (ELIX 5, katalog no: ZLXS5V05Y, MILIQ Synthesis A10, katalog no: ZMQ55VFT1, Fransa). Özellikle PCR ve moleküler deneyler için gerekli olan reagentlerin hazırlanmasında, izolasyon sırasında kullanılacak besiyerlerinin hazırlanmasında, kullanılacak olan cam ya da plastik malzemenin temizliğinde kullanılacak olan suyun kalitesi bütün sistemden alınacak sonuçları direkt olarak etkileyeceği için son derece büyük öneme sahip bu sistem kullanılmıştır. Bu sistem ile tüm bakteriyoloji ve PCR denemeleri ve çalışmaları boyunca, aynı kalitede ve standartta deiyonize ve ultra saf su elde edilebilmiştir.

8. PCR Miksi ve Reagentleri: Roche marka (katalog no: 03 003 230 001). PCR reaksiyonu FastStart DNA Master SG I PCR miksi ve reagentleri ile gerçekleştirildi. PCR reaksiyonunda kullanılırken, kit reagentleri özel soğutucunun üzerine koyularak kullanıldılar. Miks ve reagentler kullanılmadığı zamanlarda -20°C 'de saklandılar.

PCR miksi ve reagentleri aşağıda yazılmıştır.

1-a) LC FastStart Enzyme

1-b) LC FastStart Reaction Mix SG I [(10× conc. (FastStart taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix (dUTP yerine dTTP ile), SG I dye ve 10 mM MgCl_2)]

2) MgCl_2 stock solution, 25 mM

3) H_2O , PCR-grade

9. Primerler: PCR reaksiyonunda primer olarak, daha önce Çarlı ve arkadaşları (5) tarafından duyarlılığı ve özgünlüğü belirlenmiş olan MG1[(GAATTTCTGAAGAATCAACTGT) Biogen T75844 kodlu, Biogen Ltd, İstanbul, Türkiye] ve MG2 [(AAGGGATTAATATTCCCAAC) Biogen T75845 kodlu, Biogen Ltd, İstanbul, Türkiye] MG lipoprotein geni kullanıldı. Bu primer çifti expedite DNA synthesier'da (Perspective Systems, USA) sentezlenmiş ve

reverse-faz yüksek basınçlı likit kromatografi (high pressure liquid chromatography) kullanılarak (BioCAD700E, Perspective Systems, USA) saflaştırılmıştır. Primerin amplifiye ettiği PCR ürünü büyüklüğü 400 baz çifti olarak hesaplandı. Stok primer solüsyonu -20 °C'de saklandı ve kullanılacağı zamanlarda çeşitli oranında sulandırılarak kullanıldı. Sulandırılmış primer solüsyonu da -20 °C'de saklandı.

10. Cam Kapilleller [(LC capillaries (20 µl)] ve Plastik Kapakları: Roche marka (katalog no: 11 909 339 001). PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek üzere, kullanılan PCR reagentlerini içerilerine koyarak PCR reaksiyonunu gerçekleştirdiğimiz cam borucuklar, kapiller olarak adlandırılmaktadırlar.

11. Cam Kapillellerin Kapaklarının Kapatılmasını Sağlayan (2 X LC capping tool) Alet: Roche marka (katalog no: 03 357 317 001). Bu alet cam kapillellerin kapaklarının kapatılması amacıyla kullanıldı.

12. LC Karusel [(LC 2.0 sample carousel (20 µl)]: Roche marka (katalog no: 03 603 954 001). Karusel, PCR bileşenlerini cam kapillellere aktardıktan sonra, LC PCR makinesine yerleştirmemizi sağladı.

13. Roche Karusel Santrifüj (LC Carousel Centrifuge 2.0): Roche marka (katalog no: 03 709 582 001). PCR reaksiyonu ürünleri cam kapillellere aktararak ağızları kapatılıp, kapillelleri karusele yerleştirdikten sonra miksin tüm kapillellerin dibine inmesini sağlayan santrifüjdür. Tüm örnekler aynı seviyede (20 µl) reagent içermesi gerektiği için, bu santrifüj sayesinde kapilleller içerisindeki seviyeler kontrol edildi, böylece kişisel bir yanlışlık yapıp yapılmadığı görüldü ve reaksiyon sırasında floresan okunmasının doğru biçimde gerçekleşmesi sağlanmış olundu.

14. LC 2.0 PCR Makinesi: (Roche Diagnostics, Germany, katalog no: 03 531 414 201). PCR reaksiyonları, Roche LC 2.0 PCR makinesinde gerçekleştirilmiştir. LC yüksek kaliteli reagentler ve floresanslı tespit sistemiyle karusel sistemine dayalı bir thermal cyclerdir. LC PCR'ın en önemli özelliği, her siklustan sonra floresan analizi sayesinde hedef nükleik asitin gelişiminin monitörden izlenmesini sağlamaktadır. Bu alet normal bir thermal cycling

makinasına göre sıcaklık değişimlerini 10 kat daha hızlı sağlayarak 30-40 dakika gibi kısa bir sürede reaksiyonu sona erdirmektedir.

LC makinesinin teknik özelliklerini sırasıyla incelersek: LC 2.0 PCR makinesi kalitatif ve kantitatif PCR yapabilmektedir. Cihazda erime eğrisi analizi yapılarak özgün PCR ürünleri ve yan ürünler ayrılabilir. Erime eğrisi analizi hem SG I formatında hem de hibridizasyon probu formatında kullanılabilir. Erime eğrisi analizi koşullarını, kullanıcı belirleyebilmekte ve değiştirebilir. Cihazda hibridizasyon problemleri, TaqMan problemleri ve molecular beacons alternatiflerinin hepsi kullanılabilir. Özgün prob dizileri kullanılarak, bilinen tek nokta mutasyonları ve kromozom translokasyonları saptanabilir. Aynı dizi üzerindeki mutant ve wildtype noktaları, tek prob ile belirlenebilir. Cihazda kullanılacak primer ve prob dizilerinin belirlenme ve hazırlanma kriterleri, alışılmış genel kriterlerden farklı değildir. Kantitasyon hesaplamaları kinetik olarak yapılmaktadır. Amplikon 100 bp-1000 bp arasında olabilir. PCR ürünleri oluştukları anda saptanabilir. PCR siklusları anında ve sürekli olarak izlenebilir. Test verilerine anında ulaşılabilir. Cihazda bir test çalışılırken, eski bir testin verilerine ulaşarak analiz yapmak mümkündür. Çalışma sırasında, istenildiğinde test sonlandırılabilir veya amplifikasyon döngülerinin sayısı artırılabilir. 30-40 sikluluk bir PCR protokolü 25-40 dakikada tamamlanmaktadır. 8 saatlik günlük çalışma süresi içinde 384 test sonucu alınabilir (12 run x 32 test = 384). Cihaza aynı anda en fazla 32 test konulabilir. Cihaza yüklenen reaksiyon ortamı kapiller tüplerdir. Kapillere yüklenen reaksiyon miktarı 10-20 µl'dir. Fotometrede 530 nm, 640 nm ve 705 nm'i okuyan üç ayrı filtre vardır. İki ayrı LC-red boyası ile işaretlenmiş iki ayrı çift prob kullanılarak, iki hedef dizi için multipleks PCR yapılabilir (234).

15. Kapillel Çıkarıcı (LC 2.0 Capillary Releaser) : Roche marka (katalog no: 03 603 920 00). Bu aletle cam kapillerlerle PCR reaksiyonunu gerçekleştirdikten sonra, kapillerlerin karuselin içinden çıkarılması sağlandı.

16. Buzdolabı: Arçelik marka (model: 3061 plus, Türkiye). 2-4 °C'de saklanması gereken malzemelerin ve besiyerlerinin saklanması amacıyla kullanıldı.

17. Vorteks: Nüve marka (Model: nm 110, Türkiye). DNA ekstraksiyonu sırasında ve PCR reagentlerinin karıştırılması amacıyla kullanıldı.

18. Derin dondurucu: Uğur marka, Türkiye. – 20 °C’de saklanması gereken malzemelerin saklanması amacıyla kullanıldı.

19. Isıtıcı Bloklar: Techne marka (Dri-Block, model: FDB 02DD, seri no: 155248 A, UK). DNA ekstraksiyonu sırasında, reagentlerin uygun sıcaklığa getirilmesi ve bu sıcaklıklarda gereken beklemin yapılması amacıyla kullanıldı.

20. PCR Kabineti: Esco marka (model: PCR-3A1, seri no: 2006-14811, Indonesia). PCR reaksiyonu çalışılırken gereken steril ortamın sağlanması ve PCR reagentlerinin bir araya getirilip cam kapillere aktarılması amacı ile kullanıldı.

21. Biyolojik Güvenlik Kabineti Tip II: Esco marka (Biohazard safety cabinetry construction, model: AC2-4E1, seri no: 2007-19982, Indonesia). Bakteri izolasyonu ve DNA ekstraksiyonu yapılırken gereken steril ortamın sağlanması amacıyla kullanıldı.

22. Otomatik Pipetler: 0.1-2.5 µl (Eppendorf, 4681966, Eppendorf AG. Hamburg, Germany), 0.5-10 µl (Eppendorf, 1915724, Eppendorf AG. Hamburg, Germany), 2-20 µl (Eppendorf, 1792574, Eppendorf AG. Hamburg, Germany), 10-100 µl (Eppendorf, 1740954, Eppendorf AG. Hamburg, Germany), 20-200 µl (Eppendorf, 185954, Eppendorf AG. Hamburg, Germany), 10-1000 µl (Eppendorf, 19727844, Eppendorf AG. Hamburg, Germany)’lik pipetler PCR reaksiyonu sırasında, DNA ekstraksiyonları yapılırken, aglutinasyon testinin yapılmasında ve bakteriyoloji çalışmalarında kullanıldı.

23. Santrifüj: Beckman Coulter marka (Microfuge 18 centrifuge, California). DNA ekstraksiyonunda ve PCR yapılırken reagentlerin santrifüje edilmesi amacıyla kullanıldı.

24. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Reagentleri Birleştirirken Kullanılan Buzluk (LC Centrifuge Adapters): Roche marka (katalog no: 11 909 312 001). Bu buzluk ile PCR reaksiyonunu hazırlanırken reagentlerin ve cam kapillelerin PCR reaksiyonu başlatılana kadar soğukta tutulması sağlandı .

25. İnkübatör: Electromag marka (Model: 6040 BP, Türkiye). Bakteri izolasyonu için gerekli inkubasyon ısılarının sağlanması amacıyla kullanıldı.

26. Steriliteyi Sağlayan Filtre: Membran Solutions® (MS) Marka (Nylon Syringe Filtre, katalog no: SFNY025045 NG, Amerika). Sıvı *Mycoplasma* kültürlerinde kontaminasyon görüldüğünde kontaminasyonu gidermek amacıyla kullanıldı.

27. İnkubasyon Kavanozu (Jar): Becton Dickinson (BD) marka (katalog no: 260673, Almanya). MG'un izolasyonunda gerekli % 5-10 CO₂'li ortamın sağlanması amacıyla inkubasyon bu kavonozun içerisinde gerçekleştirildi.

28. Mikroaerofilik Ortam Zarfı (Gas Ped) (GasPak™ EZ CO₂) : BD marka (katalog no: 260679, Almanya). MG'un izolasyonunda gerekli % 5-10 CO₂'li ortamın sağlanması amacıyla kullanıldı.

29. Stereo Mikroskop: Olympus marka (Model: SZ2-ILST, Japan). Tracheal svabların *Mycoplasma* Agar'a ekimini takiben inkubasyon süresi sonunda agar pleytlerde MG-spesifik kolonilerin incelenmesi amacıyla kullanıldı.

30. Hassas Teraz: A& D Company Ltd. Marka (Model: END GX-2000, Japan). MG izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasında gerekli tartımların yapılabilmesi için kullanıldı.

YÖNTEM

1.1. Tracheal Svablarda Kültür İncelenmesi: Tracheal svablar *Mycoplasma* agara sürülerek ekim yapıldı ve agar pleytler içerisinde gas ped bulunan inkubasyon kavanozu içerisine yerleştirilerek 37 °C'lik etüvde inkübe edildi. 3-4 gün sonra stereo mikroskopta ortası düğmeli görünen şüpheli koloniler 'agar blok' yöntemiyle alınarak, Frey's brotha aktarılıp içerisinde gas ped bulunan inkubasyon kavanozu içerisine koyularak 37 °C de inkübe edildiler. Agar blok yönteminde, agardan agara pasaj, blok halinde kesilen agarın spatül ya da öze yardımı ile ekim yapılacak olan agara ters olarak kapatıldıktan sonra agar yüzeyinde gezdirilmek suretiyle yayılımı sağlanarak, agardan sıvı besiyerine pasaj ise yine blok halinde

kesilen agarın sıvı besiyerine atılması suretiyle yapıldı. İnkubasyon sırasında, Freys brothdaki renk değişimi her gün gözlemlendi ve rengin pembeden portakal-sarı renge dönüşümü pozitif olarak kabul edildi. Renk değişimi yönünden inkubasyon 1 hafta daha devam ettirildi. İlk ekimi takiben kontaminasyon gözlemlendiği durumlarda, kontaminasyonu gidermek amacıyla kültürler 0.45 µm'lik filtre ile süzöldükten sonra aynı şekilde *Mycoplasma* buyyonlara ve *Mycoplasma* agarlara pasajları yapıldı. Şüpheli kabul edilen, rengin pembeden portakal-sarı renge dönüşümünün göröldüğü brothlardan 100-200 µl miktarında alınarak *Mycoplasma* agara geçildi içerisinde gas ped bulunan inkubasyon kavanozu içerisine koyularak 37 °C'lik etüvde inkübe edildiler. Petriler stereo mikroskopta ortası düğmeli görünen şüpheli kolonilerin oluşumu yönünden en az 2 hafta kontrol edildiler. Stereo mikroskopta ortası düğmeli görünen şüpheli kolonilerin tekrar *Mycoplasma* agarlara agar blok yöntemiyle pasajları yapıldı. Şüpheli kolonileri diğer bakterilerin L-formlarından ayırt etmek için, 3 kez üst üste penisilinsiz *Mycoplasma* agarlara pasajlandı içerisinde gas ped bulunan inkubasyon kavanozu içerisine koyularak 37 °C'lik etüvde inkübe edildiler.

1.2. Tracheal Svablarda Kültür İncelenmesinin PCR ile Teyidi: Koloni morfolojisinde değişiklik gözlenmeyen MG benzeri koloniler agar blok yöntemiyle alınarak her birinin DNA'sı ekstrakte edildi. Hazırlanan templeytlar FastStart DNA Master SG I PCR miksi ve reagentleri ile birlikte, PCR kapillellerine aktarıldıktan sonra PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

2. ÇLA Testi: *Mycoplasma* pleyt test antijeni ve test serumlarının sıcaklığı 20-25 °C'ye getirildikten sonra temiz fayans üzerinde, 30 µl miktarındaki serum örneklerine eşit miktarda antijen ilave edildi. 1-2 dakika içerisinde aglutinasyon oluşturan serumlar pozitif, aglutinasyon oluşturmayan serumlar negatif olarak değerlendirildi.

3. MG S6 Suşu'nun DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü: NanoDrop ND-1000 V3.3 Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA) ile yapıldı. Cihazın çalışma prosedürü gereği önce ölçüm yapılacak nükleik asidin içinde bulunduğı sıvı ile 'blank ölçüm' yapılması gerekmektedir. Bizim DNA'mız ekstraksiyon kitimizin en son reagenti olan AE Buffer içinde bulunduğundan, ilk önce AE buffer ile blank ölçüm gerçekleştirildi. Daha sonra referans suş MG S6'dan ekstrakte edilen templeyt DNA iyice karıştırılıp içerisinde 1.5 µl alınarak spektrofotometrenin ölçüm noktasına dikkatli bir

şekilde damlatıldı ve ölçüm yapıldı. Hava kabarcığı oluştuğunda ya da ölçüm yapılan DNA sıvısının ölçüm noktasına koyulamadığı durumlarda cihaz otomatik uyarı verdiği için bu durumlarda ölçüm noktası temiz ve kuru peçete ile silinerek anlatılan tüm işlemler tekrarlandı ve ölçüm tekrar gerçekleştirildi.

4. MG S6 Suşu ve İlgili *Mycoplasma* Suşlarıyla MG-LC PCR'ın Spesifitesinin Tespiti:

Spesifitenin saptanması amacıyla MG S6 suşu ve Tablo- 1'de yazılı olan tüm *Mycoplasma* suşlarının DNA'ları ekstrakte edildi. Tüm templeytlar FastStart DNA Master SG I PCR miksi ve reagentleri ile birlikte PCR kapillelerine aktarıldıktan sonra LC PCR makinesinde PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

5. Saf MG S6 DNA'sının Sulandırmaları: DNA'sı ekstrakte edilen ve başlangıçtaki DNA konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçülen MG S6 suşunun, deiyonize su ile, 10^{-8} 'e kadar 10 katlı sulandırmaları yapıldı. Her sulandırma sıvısı ve FastStart DNA Master SG I PCR miksi ve reagentleri PCR kapillelerine aktarıldıktan sonra PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

6. Saf MG S6 Kültürünün Sulandırmaları: Frey's brothda bulunan MG S6 suşunun bakteri konsantrasyonunun belirlenebilmesi için, suşun on katlı sulandırmaları yapılarak 3'lü kontroller halinde *Mycoplasma* agarı ekimleri yapıldı. Başlangıçtaki stok MG S6'nın 10^6 KOB olduğu belirlendikten sonra bu stok suşun 10^{-3} KOB ml^{-1} olana kadar 10 katlı sulandırmaları hazırlandı. Her sulandırmadan 100 μl alınarak, 900 μl steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile karıştırıldı ve bu sulandırmaların her birinin DNA'sı ekstrakte edildi. Her sulandırmanın templeyti ve FastStart DNA Master SG I PCR miksi ve reagentleri PCR kapillelerine aktarıldıktan sonra PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

7. Yapay Olarak MG S6 Suşu ile Kontamine Edilen MG-ari Tracheal Svabların

Sulandırmaları: MG S6 suşunun Frey's broth'daki konsantrasyonu 10^6 KOB ml^{-1} olan stok kültürünün, konsantrasyonu 10^{-1} KOB ml^{-1} 'e kadar on katlı sulandırmaları yapıldı. Bu sulandırmaların içine serolojik olarak MG-negatif bulunan hayvanların hazırlanan tracheal svabları eklendi. Svablar ile sulandırma sıvısı 2 dakika vortekslenerek, svabın sulandırmayla tam olarak karışması sağlandıktan sonra svablar çıkarıldı ve sulandırmaların DNA'sı ekstrakte edildi. Hazırlanan templeytlar ve FastStart DNA Master SG I PCR miksi ve reagentleri, PCR kapillelerine aktarıldıktan sonra PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

8. Primerler: Primer-dimer oranının azaltılması ve gereksiz oranda fazla primer kullanımından kaçınılması için, stok primer solusyonundan çeşitli oranlarda sulandırmalar yapılarak en uygun miktar bulunmaya çalışıldı. Yapılan sulandırma oranı artırılarak ve bir reaksiyonda kullanılan primer miktarı azaltılarak, en uygun sulandırma ve her bir reaksiyon için en uygun kullanma oranı bulunmaya çalışıldı. En son 25 pmol μl^{-1} sulandırmadan her bir reaksiyon için 0.2 μl oranı en uygun olarak bulundu ve tüm reaksiyonlarda bu oran kullanıldı. Yani geleneksel PCR'da, her 25 μl miks içerisine kullanılan, 50 pmol μl^{-1} 'den 2 μl oranı azaltılarak bu oran 20 μl miks'e, 25 pmol μl^{-1} 'den 0.4 μl (0.2 μl MG₁+0.2 μl MG₂) miktarına kadar indirilerek en uygun miktarın 25 pmol μl^{-1} 'den 0.4 μl (0.2 μl MG₁+0.2 μl MG₂) olduğu bulundu.

9. DNA Ekstraksiyonları

QIAMP DNA mini kitinin kullanma kılavuzunda belirtilen dokudan, katı ve sıvı kültürlerden DNA ekstraksiyonu yöntemlerinin prosedürlerine göre MG S6 suşunun ve MG-LC PCR'ın spesifitenin saptanması amacıyla kullanılan Tablo- 1'deki tüm suşların, analizi yapılan klinik örneklerin ve *Mycoplasma* agarda üreyen tipik MG benzeri kolonilerin DNA'sı ekstrakte edildi. Kitin kullanma kılavuzunda belirtilen örneklerin 20-25 °C'de olması, ısıtıcı blokların önceden hazırlanması, AL, AW1 ve AW2 bufferlarının belirtilen şekilde sulandırılması, tüm santrifuj işlemlerinin 20-25 °C'de gerçekleştirilmesi ve saklanan örneklere tekrar tekrar dondurulup çözülme işleminin yaptırılmamasına özen gösterildi.

9.1. MG S6 ve Tablo 1'de Belirtilen Tüm İlgili *Mycoplasma* Suşlarının DNA

Ekstraksiyonu: QIAMP DNA mini kitinin sıvı kültürden DNA ekstraksiyonu yöntemi aşağıdaki gibidir.

1. 1 ml bakteriyel kültür 1.5 ml'lik mikro santrifuj tüplerine koyuldu, 5 dakika 7500 rpm'de santrifuj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
2. Peletin volümü ya da konsantrasyonu hesaplanıp, toplam miktar 180 μl olacak şekilde ATL buffer eklendi.
3. Üzerine 20 μl Proteinaz K koyuldu, vortekslenip 56 °C'de 1 saat inkübe edildi ve dokunun tamamıyla lize olmasını sağlamak için 20 dakikada bir vortekslendi (saatte 3 kez).

4. Spindown yapıldı (duvarda kondanse olanları dibe indirmek için).
5. 200 µl AL buffer eklenip, 15 saniye pulse vorteks yapıldı. 70 °C'de 10 dakika bekletildi, spindown yapıldı.
6. 200 µl alkol eklendi, 15 saniye pulse vorteks yapıldı.
7. Spin kolon açılıp, mikro santrifüj tüpündeki sıvı presipitat dahil olmak üzere, ağzına pipet ucu yada sıvı değdirmeden spin kolona aktarıldı, kapağı kapatıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı.
9. Spin kolon dikkatlice açıldı, üzerine 500 µl AW1 buffer kolon ağzını ıslatmadan koyuldu. Kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı.
11. Spin kolon açıldı, üzerine 500 µl AW2 buffer eklendi, kapağı kapatılıp 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
12. Spin kolon 1.5 µl'lik mikro santrifüj tüpüne aktarıldı, koleksiyon tüpü atıldı. Spin kolon açıldı, üzerine 200 µl AE buffer eklendi ve 5 dakika 20-25 °C'de inkübe edildi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Spin kolon atıldı, 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpü içinde biriken AE buffer içindeki DNA saklandı ve templeyt olarak PCR reaksiyonunda kullanıldı.

9.2. Yapay Olarak MG S6 Suşu ile Kontamine Edilen MG-ari ve Klinik Örnek Tracheal Svabların DNA Ekstraksiyon Metodu: QIAMP DNA mini kitinin dokudan (tracheal svablardan) DNA ekstraksiyonu yöntemi aşığıdaki gibidir.

1. Tracheal svab bulunan mikro santrifüj tüpü içine 1 ml PBS eklendi. 20-25 °C'de 1 saat beklelettikten sonra 1 dakika vortekslendi ve svab çıkartıldı. (Örnekler direkt PBS içine alındığında bekleme yapmadan vorteks ve santrifüje geçildi).
2. 10 dakika 7500 rpm'de santrifüj edildi. Üzerinde kalan sıvı pelete değmeden ayrılıp atıldı.
3. Pelet 180 µl ATL buffer ile karıştırıldı.
4. Üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi, vortekslenip, 56 °C'de 1 saat inkübe edildi. Dokunun tamamıyla lize olmasını sağlamak için 20 dakikada bir vortekslendi (saatte toplam 3 kez).
5. Spindown yapıldı (duvarda kondanse olanları dibe indirmek için).

6. 200 µl AL buffer eklendi, 15 saniye pulse vorteks yapıldı. 70 °C'de 10 dakika bekletilip, spindown yapıldı.
7. 200 µl alkol koyuldu, 15 saniye pulse vorteks yapıldı.
8. Spin kolon açıldı, mikro santrifüj tüpündeki sıvı, presipitat dahil olmak üzere ağızına pipet ucu yada sıvı değıdirmeden spin kolona aktarıldı, kapağı kapatıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı.
10. Spin kolon dikkatlice açıldı, üzerine 500 µl AW1 buffer spin kolonun kapağını ıslatmadan eklendi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı.
12. Spin kolon açıldı, üzerine 500 µl AW2 buffer eklenerek kapağı kapatıldı. 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
13. Spin kolon, 1.5 µl'lik mikro santrifüj tüpüne aktarılıp eski koleksiyon tüpü atıldı. Spin kolon açılıp üzerine 200 µl AE buffer eklendi ve 5 dakika 20-25 °C'de inkübe edildi. Daha sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
14. Spin kolon atıldı, 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpünde biriken, AE buffer içindeki DNA PCR reaksiyonunda templeyt olarak kullanılmak üzere saklandı.

9.3. MG-Spesifik Kolonilerden DNA Ekstraksiyon Metodu: QIAMP DNA mini kitinin katı kültürdeki kolonilerden DNA ekstraksiyonu yöntemi aşağıdaki gibidir.

1. Agar içinden agar blok yöntemi ile alınan koloniler mikro santrifüj tüpü içinde 180 µl ATL buffer ile karıştırılarak homojen şekilde süspanse edildi.
2. Üzerine 20 µl Proteinaz K eklenerek vortekslendi. 56 °C'de 1 saat inkübe edildi. Dokunun tamamıyla lize olmasını sağlamak için 20 dakikada bir vortekslendi (saatte 3 kez).
3. Spindown yapıldı (duvarda kondanse olanları dibe indirmek için).
4. 200 µl AL buffer eklenerek, 15 saniye pulse vorteks yapıldı. 70 °C'de 10 dakika bekletilip spindown yapıldı.
5. 200 µl alkol eklenerek 15 saniye pulse vorteks yapıldı.
6. Spin kolon açıldı, mikro santrifüj tüpü içindeki sıvı presipitat dahil olmak üzere spin kolonun ağızına pipet ucu yada sıvı değıdirmeden spin kolona aktarılıp kapağı kapatıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

7. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı.
8. Spin kolon dikkatlice açılıp üzerine 500 µl AW1 buffer kolon ağzını ıslatmadan eklendi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Spin kolon alınıp yeni koleksiyon tüpüne aktarıldı.
10. Spin kolon açıldı üzerine 500 µl AW2 buffer eklenerek kapağı kapatıldı. 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
11. Spin kolon 1.5 µl'lik mikro santrifüj tüpüne aktarılarak eskisi atıldı. Spin kolon açılıp üzerine 200 µl AE buffer eklendi ve 5 dakika 20-25 °C'de inkübe edildi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Spin kolon atıldı. 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpünde biriken, AE buffer içindeki DNA PCR reaksiyonunda templeyt olarak kullanılmak üzere saklandı.

10. Optimize Edilen MG-LC PCR Parametreleri: Çalışılan tüm örneklerin DNA'ları ekstrakte edilerek templeytlar hazırlandı. FastStart DNA Master SG I PCR miksi ve reagentleri ile hazırlanan templeytlar PCR kapillelerine aktarıldıktan sonra LC PCR makinesinde PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

FastStart DNA Master SG I PCR miksinin reagentleri olan H₂O, mix ve MgCl₂ (denenerek en uygun kullanma oranı bulunan) ve denenerek en uygun kullanma oranı bulunan primerler karıştırılıp, PCR kapillelerine aktarıldıktan sonra, ekstrakte edilerek hazırlanan templeytlar de eklenerek PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmada negatif kontrol olarak templeyt yerine deiyonize su, pozitif kontrol olarak ise Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nde *Mycoplasma* laboratuvarı şefi Dr. Ümit Özdemir'den sağladığımız MG S6 suşu'nun ekstrakte edilen DNA'sı kullanıldı. Optimizasyonda denenerek bulunan PCR reagentlerinin en uygun oranları aşağıda belirtilmiştir.

<u>PCR İçeriği</u>	<u>Hacim / 1 Reaksiyon</u>
H ₂ O	14 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 µl
Primer 1 (25pmol/ µl)	0.2 µl
Primer 2 (25pmol/ µl)	0.2 µl
Reaksiyon Miksi	2 µl

Templeyt DNA	2	μ l
Toplam	20	μ l

Templeytlar, pozitif ve negatif kontrolleri eklemeyden önce çalışılacak örnek sayısına 1 adet pozitif ve negatif kontrolde eklenerek, reaksiyon miksi hazırlandı ve miks 18'şer μ l oranında borosilikat kapiller PCR tüplerine dağıtıldı. Daha sonra kapillerlerdeki mikslerin üzerine templeyt, negatif ve pozitif kontroller 2'şer μ l oranında eklendi ve cam kapillerlerin plastik kapakları özel kapatıcı (capping tool) ile kapatıldı. Kapillerler karusele yerleştirilerek LC karusel santrifüjünde [Roche Santrifüj (LC Carousel Centrifuge 2.0), katalog no: 03 709 582 001] spindown yapıldı ve self testi yapılan LC PCR aletine yerleştirildi. Çeşitli denemelerle MG PCR reaksiyonu için bulunan en uygun sıcaklık ve zaman parametreleri alete yüklendi, aşağıdaki yazılan bu parametreler çağırılarak reaksiyon başlatıldı.

Reaksiyonda kullanılan DNA amplifikasyon parametreleri aşamalarıyla aşağıda yazılmıştır.

Pre-inkubasyon: 95 ⁰C'de 10 dakika

95 ⁰C'de 10 saniye

Amplifikasyon: 50 ⁰C'de 10 saniye
(40 siklus) 72 ⁰C'de 20 saniye

95 ⁰C'de 00 saniye

Erime: 65 ⁰C'de 15 saniye
95 ⁰C'de 00 saniye

Soğuma: 40 ⁰C'de 30 saniye olarak kullanılmıştır.

11. Erime Eğrisi Analizi: Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde tüm siklulardan sonra (denaturasyon, annealing, ekstensiyon) istenilen süre ve erime sıcaklığına ayarlanan cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar.

Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= T_m) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı düşer. Her bir DNA'nın belirli bir T_m derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünler (primer-dimer) ile aradığımız DNA parçasının T_m derecesi arasında farklılık olacaktır. T_m derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindedir. Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için özeldir.

PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra, LC 2.0 aleti kendi yazılımı ile erime eğrisi analizi yapıldı. Burada Real-Time florometrik görüntüleme yapılarak hem amplifikasyon grafiği, hem de her örneğe ait T_m 'ler, MG pozitif ve negatif kontrole göre karşılaştırılarak değerlendirildi. Beklenen T_m 'ler MG için 80 °C'dir.

Tablo 1: Optimizasyonda Kullanılan MG ve İlgili *Mycoplasma* Suşları

<u>Suş No</u>	<u>Suş İsmi</u>
1	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> S6
2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> A 5969
3	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> K781 (R)
4	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> K810 (F)
5	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> K3254 (6/85)
6	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> K4548 (HF51)
7	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> K4957F (2)
8	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> K4958F (2)
9	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> K4962C (2)
10	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> Ts-11
11	<i>Mycoplasma synovia</i> 1823 (WVU)
12	<i>Mycoplasma synovia</i> K1415 (F10-2A5)
13	<i>Mycoplasma synovia</i> K3904 (F10-2A5)
14	<i>Mycoplasma synovia</i> K4910 (9)
15	<i>Mycoplasma synovia</i> K4927C
16	<i>Mycoplasma synovia</i> K4933D
17	<i>Mycoplasma gallinarum</i> K285-“B”-LPG16
18	<i>Mycoplasma gallinaceum</i> Tulley “DD”
19	<i>Mycoplasma gallopavonis</i> SA (377)
20	<i>Mycoplasma meleagridis</i> E-2 (386)
21	<i>Mycoplasma iowae</i> K3761(1) 22 p (863)
22	<i>Mycoplasma pullorum</i> D2403 (396)
23	<i>Mycoplasma iners</i> K285-“E”-PG30 (19)
24	<i>Mycoplasma columbinasale</i> Bx63 (15)
25	<i>Mycoplasma lipofaciens</i> Bx101 (40)
26	<i>Mycoplasma cloacale</i> Bx101 (48)
27	<i>Acheloplasma laidlawi</i> Bx250 (28)

BULGULAR

Tracheal Svab Örnekleri ile MG-LC PCR Bulguları: Çalışılan tracheal svablarda MG DNA'sı varlığı yönünden 646 tracheal svabın 73'ü (% 11.3) (Tablo- 3), kümes temel alınarak değerlendirildiğinde ise 31 kümeden 9'u (% 29) (Tablo- 2) MG-LC PCR ile MG pozitif olarak bulundu.

Tracheal Svab Örnekleri ile Kültür Bulguları: Çalışılan 646 tracheal svabın 26'sı (% 4) (Tablo- 3), kümes temel alınarak değerlendirildiğinde ise 31 kümeden 5'i (% 16.1) (Tablo- 2) bakteriyolojik olarak MG pozitif olarak bulundu.

Kan Serumu Örnekleri ile ÇLA Testi Bulguları: Tracheal svab örneği alınan 646 tavuğun alınan kanlarından çıkarılan serumlar ile yapılan ÇLA testi sonucunda 227 (% 35.1) tanesi (Tablo- 3), kümes temel alınarak değerlendirildiğinde ise 31 kümeden 15'i (% 48.4) (Tablo- 2) MG seropozitif olarak bulundu.

MG-LC PCR'in Saf MG S6 DNA'sını Tespit Limiti: MG-LC PCR'in saf MG S6 DNA'sını tespit limiti $0.1 \mu\text{l}^{-1}$ (yaklaşık bir MG hücresi) olarak bulundu (Grafik- 1 ve 2).

MG-LC PCR'in Saf MG S6 Kültürünü Tespit Limiti: MG-LC PCR'in saf MG S6 kültürünü tespit limiti 100KOB ml^{-1} olarak bulundu (Grafik- 3 ve 4).

MG S6 Kültürü ile Yapay Olarak Kontamine Edilen MG-ari Svabların MG-LC PCR ile Tespit Limiti: MG S6 kültürüyle yapay kontamine edilen MG-ari svabların MG-LC PCR ile tespit limiti 100KOB ml^{-1} olarak bulundu (Grafik- 5 ve 6).

MG-LC PCR'in Spesifitesi: Spesifitenin saptanması amacıyla, DNA'ları ekstrakte edilerek amplifikasyonu sağlanan Tablo- 1'de yazılı referans suşları ile uygulanan MG-LC PCR'ı sonucunda tüm MG suşları $78.9-79.96 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de erime gerçekleştirdi. MG suşları dışındaki diğer suşlarda herhangi bir amplifikasyon piki gözlenmedi.

Tracheal Svab ve Kan Serumu Klinik Örnekleri ile Çalışılan MG-LC PCR,

Bakteriyoloji ve ÇLA Testi Sonuçlarının Kümes Temel Alınarak Değerlendirilmesi:

Tracheal svab ve kan serumu klinik örnekleri ile çalışılan MG-LC PCR, bakteriyoloji ve ÇLA testi sonuçları kümes temel alınarak değerlendirildiğinde MG-LC PCR ile % 29 oranında MG pozitif kümes tespit edilirken, bakteriyoloji ile % 16.1 ve ÇLA testi ile ise % 48.4 oranında MG pozitif kümes bulundu (Tablo- 2). Altı adet MG seropozitif kümes [(kümes no: 1, 2, 9, 15, 27, 28 (Tablo- 3)] MG-LC PCR ve bakteriyoloji ile MG negatif olarak tespit edildi. Bir adet kümes [(kümes no: 23 (Tablo- 3)] MG-LC PCR ile MG pozitif bulunurken serolojik ve bakteriyolojik olarak MG negatif bulundu. MG-LC PCR sonuçları bakteriyoloji sonuçları ile karşılaştırıldığında, beş adet kümes [(kümes no: 13, 16, 20, 23 ve 24 (Tablo- 3)] MG-LC PCR ile MG pozitif bulunurken, bakteriyolojik olarak MG negatif bulundular. Sadece bir adet MG seropozitif kümes [(kümes no: 11 (Tablo- 3)] bakteriyolojik olarak da MG pozitif bulunurken MG-LC PCR ile MG negatif bulundu. On adet MG seropozitif kümes [(kümes no: 1, 2, 9, 13, 15, 16, 20, 24, 27 ve 28 (Tablo- 3)] bakteriyolojik olarak MG negatif olmasına rağmen, bakteriyolojik olarak MG pozitif ama MG seronegatif kümesine rastlanmadı. Dört adet kümes [(kümes no: 7, 19, 22 ve 26 (Tablo- 3)] hem MG-LC PCR ile hem de bakteriyolojik olarak MG pozitif bulundu. Dolayısıyla, MG-LC PCR ve bakteriyoloji arasındaki MG pozitiflik oranını kümes temel alınarak değerlendirdiğimizde % 55.6 (9/5) oranı bulundu.

Tablo-2 Tracheal Svab ve Kan Serumu Klinik Örnekleri ile Çalışılan MG-LC PCR, Bakteriyoloji ve ÇLA Testi Sonuçları Kümes Temel Alınarak Değerlendirildiğinde Elde Edilen Yüzde Oranları

Sonuç	MG-LC PCR (%)	Bakteriyoloji (%)	ÇLA (%)
Pozitif	9 (29.0)	5 (16.1)	15 (48.4)
Negatif	22 (71.0)	26 (83.9)	16 (51.6)
Toplam	31 (100.0)	31 (100.0)	31 (100.0)

Tracheal Svab ve Kan Serumu Klinik Örnekleri ile Çalışılan MG-LC PCR,

Bakteriyoloji ve ÇLA Testi Sonuçlarının Bireysel Örneğe Dayalı Değerlendirilmesi:

MG-LC PCR, bakteriyoloji ve ÇLA testi sonuçları bireysel örneğe dayalı olarak değerlendirildiğinde, 646 adet tracheal svab ve kan serumu örneğinin 73 adedi MG-LC PCR ile, 26 adedi bakteriyolojik ve 227 adedi ÇLA testi ile serolojik olarak MG pozitif olarak

bulundu (Tablo- 3). Dört yüz on dokuz örnek MG seronegatif olarak bulundu. Bu 419 MG seronegatif örnek arasından MG-LC PCR ile MG pozitif bulunan bir adet örnek [(kümes no: 23 (Tablo- 3)] haricinde hepsi aynı zamanda bakteriyolojik olarak MG-LC PCR ile MG negatif olarak bulundu. İki yüz yirmi yedi MG seropozitif örnekten 72'si MG-LC PCR ve 26'sı bakteriyolojik olarak MG pozitif bulundu. Toplam 25 tracheal svab örneği [(7 no'lu kümeden 2 adet, 19 no'lu kümeden 8 adet, 22 no'lu kümeden 1 adet, 26 no'lu kümeden 14 adet (Tablo- 3)] hem MG-LC PCR ile hem de bakteriyolojik olarak MG pozitif bulundu. Dolayısıyla bireysel örneklerle dayalı değerlendirdiğimizde, MG-LC PCR ve bakteriyoloji arasındaki MG pozitiflik oranı % 35.6 (73/26) olarak bulundu. 15-07-2008 tarihinde çalışılan klinik örneklerin MG-LC PCR sonuçları, tüm Roche LC 2.0 parametreleri, tablo ve grafikleriyle bir örnek teşkil temek üzere verilmiştir (Grafik -7).

Tablo-3 Tracheal Svab ve Kan Serumu Örnekleri ile Çalışılan MG-LC PCR, Bakteriyoloji ve ÇLA Testi Sonuçlarının Bireysel Örneğe Dayalı Değerlendirilmesi

Kümes No	MG-LC PCR Pozitif Örnek Sayısı/ Test Edilen Toplam Tracheal Svab Sayısı	Bakteriyolojik Olarak Pozitif Örnek Sayısı/ Test Edilen Toplam Tracheal Svab Sayısı	ÇLA Testii Pozitif Serum Sayısı /Test Edilen Toplam Serum Sayısı
1	0/15	0/15	7/15
2	0/10	0/10	5/10
3	0/16	0/16	0/16
4	0/20	0/20	0/20
5	0/10	0/10	0/10
6	0/15	0/15	0/15
7	9/14	2/14	14/14
8	0/21	0/21	0/21
9	0/13	0/13	11/13
10	0/25	0/25	0/25
11	0/14	1/14	13/14
12	0/11	0/11	0/11
13	4/10	0/10	10/10
14	0/11	0/11	0/11
15	0/10	0/10	5/10
16	2/19	0/19	9/19
17	0/33	0/33	0/33
18	0/30	0/30	0/30
19	16/20	8/20	20/20
20	3/50	0/50	41/50
21	0/20	0/20	0/20
22	3/10	1/10	6/10
23	1/10	0/10	0/10

24	3/37	0/37	32/37
25	0/16	0/16	0/16
26	32/48	14/48	37/48
27	0/10	0/10	7/10
28	0/12	0/12	10/12
29	0/30	0/30	0/30
30	0/15	0/15	0/15
31	0/71	0/71	0/71
Toplam	73/646	26/646	227/646

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasının ilk basamağında, optimize edilen MG-LC PCR sisteminin arama sınırlarını (deteksiyon limitlerini) ölçmenin anlamlı olacağı düşünüldü. 2002 yılında Çarlı ve Eyigör (23) tavuk tracheal svablarından MG teşhisi için MG-LC PCR sistemi ile çalışmışlar ve MG-LC PCR'ın saf kültürle tespit limitini 3 KOB ml⁻¹ ve yapay kontamine örneklerle tespit limitini ise 3000 KOB ml⁻¹ bulmuşlardır. Çalıştıkları toplam 96 tracheal svabın 68'ini canlı hayvanlardan, 28'ini ise nekropsi yaptıkları hayvanların trachea mukozasına sürterek almışlardır. Canlı hayvanlardan aldıkları tüm svabların MG-LC PCR sonuçları negatif çıkarken, nekropsi yaptıkları hayvanların trachea mukozasına sürterek aldıkları 28 svabtan 18'inin sonucunu MG-LC PCR pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar, bu metodun özgünlüğünü % 100, duyarlılığını % 64.2 bulduklarını ve eğer doğru örnekleme yapılırsa MG'un teşhisinde MG-LC PCR sistemini oldukça hızlı ve hassas bulduklarını bildirmişlerdir. 1993 yılında Slavik ve arkadaşları (235) MG PCR'ın 2 KOB ml⁻¹ miktarına kadar MG titrelerini tespit edebildiğini, özgünlük çalışmaları sonucunda MG serolojik testlerinde MS infeksiyonu yanlış pozitif reaksiyonlara neden olmasına rağmen, MG PCR'nun MS diğer *Mycoplasma*'lar arasında kros reaksiyonlara neden olmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar yine tracheal svab ya da tracheal sıvılardan yaptıkları karşılaştırmada MG PCR'nda tracheal svabların, tracheal sıvılara göre daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Çarlı ve Eyigör (23) ile Slavik ve arkadaşları (235) klinik örneklerden MG izolasyonu için yaptıkları PCR'ın duyarlılığını bizim çalışmamıza göre [(saf MG DNA'sının 0.1 fg µl⁻¹ (Grafik- 1 ve 2) saf MG kültürünün ise 100 KOB ml⁻¹ (Grafik- 3 ve 4)] oldukça düşük bulmuşlardı. Bunun sebebi DNA templeytinin kalitesiyle ilgili olabilir. Bizim çalışmamız sürecinde de DNA ekstraksiyon kiti kullanmadan lizis yöntemi ile (23) hazırladığımız templeytle yaptığımız PCR denemelerinde, benzer düşük duyarlılık problemleri yaşanıldı. MG S6 suşunun DNA'sıyla kit kullanarak elde edilen sonuçlar, aynı suşla kit kullanmadan

lizis yöntemi ile (23) hazırladığımız templeytle çalıştığımız PCR ile karşılaştırıldı. DNA ekstraksiyon kitini kullanarak çalıştığımızda spesifik amplifikasyonlar 15. siklularda oluşmaya başlarken, DNA ekstraksiyon kitini kullanmadan elde edilen templeyt ile çalıştığımız PCR reaksiyonunda 40 amplifikasyon siklusu sonunda MG-LC PCR ekranından daha yeni yeni amplifikasyonların oluşmaya başladığı görüldü. Bunun nedeninin ortamda spesifik DNA olsa bile, DNA ekstraksiyon kitini kullanmadan elde edilen DNA'da, ekstraksiyon sırasında örneklerden uzaklaştıramadığımız PCR inhibitörlerinin amplifikasyonu inhibe etmesi olabileceği kararı verildi. Ayrıca DNA ekstraksiyon kitini kullanmadan elde edilen DNA ile hazırlanan templeylerdeki diğer bir problemin de primer-dimer miktarında oldukça yüksek bir artış olduğu görüldü. Bunun nedenin ise yine ortamdaki giderilemeyen maddelerden kaynaklanan kontaminasyon probleminin oluşturduğu primer-dimerler olduğuna karar verildi (veriler gösterilmedi). Bu yüzden bu denemelerden sonra klinik örneklerimizdeki DNA ekstraksiyonu ticari QIAMP DNA mini kiti (QIAGEN marka, kod: 51304, Almanya) ile gerçekleştirildi. Daha önce yapılan 2 çalışmada (34, 145) DNA templeyti hazırlamada yıkama-kaynatma-santrifüj metodunun iyi sonuç verdiği söylene de, diğer 2 çalışmada da belirlendiği üzere (236, 237) kit çok iyi kalitede templeyt sağladı. Yapay olarak kontamine ettiğimiz tracheal svab çalışmamızda da bulunduğu gibi (Grafik- 5 ve 6) DNA izolasyon kiti MG-LC PCR'ın duyarlılığının (23) artmasını sağladı. Tüm bu sonuçlara göre PCR reaksiyonunda kullanılacak DNA templeyti hazırlaması için DNA ekstraksiyon kitinin kullanılması gerektiğine karar verildi.

ÇLA testinde en sık karşılaşılan sorunlar testin yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlar verebilmesidir. Kontamine ya da dondurulmuş serumlar ile test yapıldığında nonspesifik reaksiyonların gözleendiği bildirilmiştir (77, 125, 128, 130, 131). Olsen ve arkadaşları (238) ile Snell ve Cullen (137) tarafından MG ile MS arasında antijenik yakınlık olduğu, ÇLA testi ile özellikle MS infeksiyonunun ilk döneminde kros reaksiyonların görüldüğü, HI testi ile sonuçların tekrar değerlendirilmesi gerektiği ve farklı zamanlarda örnek alınımının da yararlı olacağı bildirilmiştir. Kanatlı sektöründe birçok viral ve bakteriyel infeksiyondan korunmada kullanılan inaktif aşuların da serolojik tanıda sorun olduğu, bu aşuların uygulandığı hayvanlardan alınan kan serumu örnekleri ÇLA testi ile incelendiğinde non-spesifik pozitif reaksiyonlar gözleendiği rapor edilmiştir (77, 123, 130). Roberts (125) bu aşuların uygulanmasını takiben 1 hafta sonra yapılan ÇLA testinde non-spesifik reaksiyonlar görüldüğünü ve bu non-spesifik reaksiyonların ancak 3. hafta içerisinde sonlandığını bildirmiştir. Yoder (130) ise non-spesifik reaksiyonların, aşı uygulamasını takiben 2-3 hafta

içerisinde ortaya çıktığını, serumların ısıyla inaktivasyonunun ya da sulandırılmasının da bu reaksiyonları tam olarak önleyemediğini bildirmiştir. Cullen ve Timms (131) MG'dan ari çiftliklerdeki tavukları, 4 farklı inaktif aşı ile kullanım prosedürüne uygun olarak (3., 9., ve 16. haftalarda birer doz) aşılamışlar, 21 hafta boyunca kan serumlarını ÇLA, HI ve lateks anti-globulin testi ile incelemiştir. ÇLA ve lateks anti-globulin testi ile incelenen serumların, tavuklar 20 haftalık olana kadar yanlış pozitiflik verdiğini bildirmişlerdir. ÇLA testindeki non-spesifik reaksiyonları önlemek amacıyla, serumun ısıyla inaktivasyonu, 2-mercaptoethanol ile veya FTS ile sulandırılması gibi yöntemler önerilmesine rağmen (1, 105) Yoder (130) ile Cullen ve Timms (131) bu sulandırma işlemlerinin, gerçek pozitif olan serumların negatif sonuç verebilmeleri nedeniyle tanıyı yanıltabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ÇLA testi ile seropozitiflik oranının MG-LC PCR sonuçlarına göre yüksek olmasının (Tablo- 2 ve 3) nedeninin, daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi (135, 239), tavuklara uygulanan yağlı adjuvanlı ölü aşıların yol açtığı non-spesifik aglutinasyonlar ya da tavuklarda bulunan non-patojenik *Mycoplasma* veya MG dışındaki diğer patojenik *Mycoplasma*'lar olabileceğine karar verildi. Yüksek duyarlılıklarından dolayı yanlış pozitif reaksiyonlara neden olan aglutinasyon testlerine bağlı olarak, bu tip yanlış yüksek taşıyıcılık oranları ortaya çıkabilmektedir. Bu yüzden bu testlerden sonra ortaya çıkan pozitiflikler OIE ve NPIP'de (3, 10) belirtildiği gibi mutlaka bakteriyoloji ve PCR ile doğrulanmalıdır.

Çalışmamızda ortaya çıkan bir diğer sonuç da kümes bazında ve bireysel olarak tespit edilen pozitiflik oranında, MG-LC PCR sonuçları bakteriyoloji sonuçları ile karşılaştırdığında bakteriyolojik tespit oranının daha düşük olmasıydı (Tablo- 2 ve 3). Kümeslerde sağaltım yöntemlerinin başında gelen antibiyotik uygulamaları hem kültür hem de serolojik tanıyı olumsuz etkilemektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda, antibiyotikle sağaltılmış sürülerde sağaltılmamış sürülere oranla MG'ya karşı daha az humoral immun tepki oluştuğu bildirilmiştir (77). Türkaslan ve Salihoğlu (138) CRD şüphesi ile laboratuvara gönderilen 13 olgunun, 8'inden MG izole ettiklerini, izolasyon yapılamayan sürülerden ikisinde önceden antibiyotik sağaltımının uygulanmış olduğunu bildirmişlerdir. Güler (139) klinik bulgularına bakılarak hastalıktan şüphe edilen 33 işletmeye ait toplam 91 tavuktan kan serumu ile ÇLA testi ve organlardan etken izolasyonu çalışması yaptığında 20 işletmede seropozitiflik saptarken, sadece 9 işletmeye ait toplam 12 tavuktan MG izole ve tanıya ettiğini bildirmiş ve serolojik olarak pozitif sürülerde, etken izolasyonunun gerçekleşmemesini, antibiyotik kullanımına ve diğer *Mycoplasma*'lar tarafından MG'un üremesinin inhibisyonuna bağlamıştır. Jordan ve arkadaşları (240, 241) ile Levisohn ve arkadaşları (242) deneysel yolla

infekte ettikleri tavuklara sağaltım uygulamışlar ve bu hayvanlarda sağaltım yapılmamış hayvanlara oranla sağaltım yapılmışlarda etken izolasyonunun azaldığını, serolojik test sonuçları incelendiğinde de daha az pozitiflik görüldüğünü bildirmişlerdir.

Bakteriyoloji ile ilgili yaşanan bu problemler daha önceki çalışmalarda (138, 139, 240-242) belirlendiğı ve belirtildiğı üzere şu nedenlerden de kaynaklanabilmektedir. Başta MG üreme süresi uzun, üretilmesi oldukça zor olan, üreme ortamında hassas şartlar gerektiren ve svab örneklerinde bulunan non-patojenik diğer *Mycoplasma*'lardan ötürü bakteriyolojisinde problemler oluşturan bir bakteridir. Fakat PCR'da böyle problemler MG'un doğrudan özgün bir gen parçası saptandığı için önemli olmamaktadır (236, 237). Bu yüzden PCR bakteriyolojiden çok daha hassastır. Bu problemin bir diğer nedeni de örneklerde bulunan *Mycoplasma*'lar ölmüş olabileceğı için bakteriyoloji ile MG üretilmemiş buna karşın MG-LC PCR ile pozitiflik saptanabilmiştir (243). Ayrıca tracheal svab örneklerindeki MG DNA'sı tavuklar yeni infekte olmuş durumdaysalar PCR ile tespit edilebilmesine rağmen, bakteriyoloji ile infeksiyonun başlangıcında olunduğı için az sayıda MG etkeni olacağından tespit edilememiş veya serolojik testlerle tavuk kanında yeterli antikor düzeyi oluşmadığı için tespit edilememe durumu da olabilmektedir. Çalışmamızdaki bir örnekte (kümes no: 23, Tablo- 3) de bu durum görüldü. Yirmi üç no'lu kümesimizin sonuçları MG-LC PCR ile pozitif çıkmasına rağmen, serolojik ve bakteriyolojik olarak negatif bulunmuştur. Benzer açıklama diğer beş adet kültür negatif fakat MG-LC PCR pozitif kümes (kümes no: 13, 16, 20, 23, 24. Tablo- 3) için de yapılabilir. Salich ve arkadaşları (233) antikor yanıtının uzun süre saptanabilmesine karşın, tracheadaki etken sayısının belli bir süre artıp pik düzeye eriştikten sonra hızla düştüğünü, bu nedenle serolojik olarak pozitif olgularda etken izolasyonun gerçekleşemeyebileceğini ya da PCR sonucunun negatif olmasının şaşırtıcı olmadığını bildirmişlerdir. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak (233, 244) bir kümes haricinde (kümes no: 11, Tablo- 3) diğer tüm bakteriyolojik pozitif kümes sonuçlarımız MG-LC PCR ile de MG pozitif sonuç verdi (Tablo- 3). Tüm bu sonuçlar ışığında, beklenildiğı gibi kümes yada bireysel veriler bazında, MG-LC PCR ile tespit edilme oranının bakteriyolojik yöntemle tespit edilme oranına göre daha yüksek olduğu sonucuna varıldı.

PCR'nun bakteriyoloji yanındaki üstünlüğü daha önce Callison ve arkadaşları (236) ve Marois ve arkadaşları (245) tarafından çevresel kümes örnekleri ve tracheal svablarla yaptıkları çalışmalarda bulunduğu gibi (% 52.8) bizim çalışmamızda da PCR ve bakteriyolojinin sadece % 55.6 benzer oran göstermesiyle bir kez daha bulunmuştur (Tablo- 2). Sadece bir kümede (kümes no: 11, Tablo- 3) bakteriyolojik olarak MG pozitif, MG-LC

PCR negatif sonucu bulundu. Bunun nedeninin de DNA ekstraksiyonunda kit kullanılmasına rağmen, yine de templeytdaki belki de çok az miktarda bulunan inhibitör maddelerden olabileceği düşünüldü. Bağcıgil ve arkadaşları (246) MG'un saptanmasında PCR, bakteriyoloji ve ÇLA yöntemlerini karşılaştırmışlar, 96 tracheal svabla yaptıkları çalışmada 47 (% 49) PCR pozitif, 3 (% 3.1) bakteriyoloji pozitif, 10 (% 10.4) ÇLA testi ile seropozitif ve 10 (% 10.4) MG seropozitif-şüpheli örnek bulmuşlardır. Sonuçta ÇLA saha koşullarında sürü taranmasında kullanışlı ve pratik olmasına rağmen bu testin tek başına sonucu belirlemede yeterli olmadığını ve PCR tekniğinin bakteriyolojiye göre oldukça pratik ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Callison ve arkadaşları (236) Taqman probolarla MG Real-Time PCR [MG- labeled probe (MGLP)] gerçekleştirmişlerdir. MGLP analizini, MG izolasyonu ile karşılaştırdıklarında MGLP'nin (172/265) izolasyona göre (50/265) daha duyarlı olduğunu görmüşlerdir. Bu sonuçlara göre klinik örneklerden MG saptamada MGLP'nin oldukça duyarlı, özgün olduğunu ve ayrıca miktar tayinine olanak sağladığını bildirmişlerdir.

Salisch ve arkadaşları (233) IDEXX MG PCR-tabanlı test kitinin tür spesifik olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada da kitin özgünlüğünü saptamak için MG PG31, *Mycoplasma gallinarum* PG16, *Acheloplasma axanthum*, MS WVU 1853 suşları ile PCR yapıldığında, kitin sadece MG'ü saptadığını bildirmişlerdir. Khan ve Kleven (106) infekte bir çiftliğe sağlıklı civcivlerin katılmasından çok kısa bir süre sonra sağlıklıların da infekte olduklarını, ancak bu durumun ilk günlerde serolojik testlerle veya kültür ile ortaya çıkartılmasının zor olduğunu, bu aşamada spesifik DNA'nın saptanmasına yönelik tanı yöntemlerinin başarılı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Kempf ve arkadaşları (247) önce MG ile infekte edildikten sonra antibiyotikle sağaltılmaya başlanan tavuklardan 8 farklı günde alınan 80 tracheal svab örneklerinden kültür ile 14, PCR ile 20 pozitif sonuç elde edildiğini, son etken izolasyonunun inokulasyondan 26 gün sonra yapıldığını, PCR ile ise son pozitif örneğin inokulasyondan 54. günde saptandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar başka bir çalışmalarında da (148) tracheal svablardan kültür ve PCR ile MG tanısını karşılaştırdıklarında, 73 svab örneğinden 49'unun kültür, 70'inin ise PCR ile MG pozitif olduğunu bildirmişlerdir. PCR pozitif örneklerin çoğunda kültür ile saptanamayacak kadar az bakteri olduğunu, bu sonucu da PCR tekniğinin yüksek duyarlılığına ve üremeyecek kadar az patojeni saptayabilme yeteneğine bağlamışlardır.

Kempf (230) tüm bu avantajların yanı sıra, PCR tekniği ile sadece bilinen *Mycoplasma* türlerinin identifiye edilebileceğini, yeni türler ve patojenite, immunojenite,

antibiyotik duyarlılığı gibi biyolojik özelliklerin saptanabilmesi için kültür çalışmalarının ve serolojik testlerin de yapılması gerektiğini vurgulamıştır.

Etken izolasyonu ve biyokimyasal özelliklerin saptanmasını içeren kültür yöntemleri, günümüzde hala en güvenilir tanı yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır. Geliştirilen her tanı yönteminin değerlendirilmesinde, saha izolatlarının özelliklerinin saptanmasında, aşuların hazırlanmasında, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde kültür çalışmalarından yararlanılmaktadır. Bunun yanı sıra pratik ve ucuz olması nedeniyle ÇLA testi sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak ÇLA testi de tek başına yeterli olmadığı için ve başka serolojik testlerle ve diğer tanı yöntemleri ile sonuçların doğrulanması gerekmektedir. Kültürde karşılaşılan zorluklar ve bazı serolojik testlerdeki yanıltıcı sonuçlar ve güçlükler nedeniyle, moleküler düzeydeki gelişmeler sonucunda PCR tekniği önem kazanmış ve sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (36, 38, 77, 247, 248). PCR tekniğinin kısa sürede en doğru sonuç alınabilmesi, sekonder bakteriyel kontaminasyonlardan etkilenmemesi, antibiyotik kullanımı sonrasında da yeterli sonuçların alınması ve tür spesifik olması araştırmacılar tarafından tercih edilme nedeni olarak belirtilmiştir (38, 77, 233). Son yıllarda moleküler düzeydeki gelişmelere paralel olarak PCR tekniği birçok infeksiyöz hastalıkta olduğu gibi MG infeksiyonu tanısında da kullanılmaya başlamıştır. Günümüz koşullarında pahalı bir test olmakla birlikte, yüksek duyarlılık ve özgünlüğü ile izolasyon ve identifikasyonun yerini tutabilecek bir teknik olabileceği pek çok çalışmada kanıtlanmıştır. Tez çalışmamızda tavuk tracheal svablarından MG aranma duyarlılığı MG-LC PCR'ın yeniden optimizasyonu ile artırılmıştır. Bu çalışma ile toplam PCR süresi, geleneksel PCR'a göre 3-4 saat daha kısaltılmış ve deteksiyon limiti oldukça fazla azaltılmıştır (Grafik- 1 ve 2) (23).

Çalışmamızın sonunda, bir Real-Time PCR sistemi olan LC PCR ile MG tespit oranı, MG seropozitif damızlık kümeslerde bakteriyolojiden neredeyse 3 kat daha yüksek bulunmuştur (Tablo- 2 ve 3). MG-LC PCR sonuçları bakteriyoloji sonuçları ile kümesler baz alındığında % 55.6 (Tablo- 2), bireysel örnek bazında karşılaştırıldığında ise sadece % 35.6 (Tablo- 3) benzerlik göstermiştir. Bu yüzden MG-LC PCR, MG seropozitif damızlık kümeslerden alınan tracheal svablardaki MG'ü saptamada oldukça duyarlı ve etkin olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında LC PCR sistemi (Roche) MG'un tavuk tracheal örneklerinden aranması amacıyla optimize edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. KLEVEN SH, YODER HW. *Mycoplasmosis*. Editörler: PURCHASE HG, ARP LH, DOMERMUTH CH, PEARSON JE. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3th edition, American Association of Avian Pathologists, Kenet Square, Pennsylvania, page 57-62, 1984.
2. ESSENDAL ÖM. *Mycoplasma* İnfeksiyonları. Editörler: ARDA M, MİNBAŞ A, AYDIN N, AKAY Ö, İZGÜR M. Kanatlı hayvan hastalıkları. Medisan yayınevi, Ankara, sayfa 79-93, 1994.
3. ANONİM. Standart test procedures for *Mycoplasma*. National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions, Animals and Animal Products, Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Part 147, U.S, 2004.
4. KLEVEN S, JORDAN HFTW, BRADBURY JM. Avian *Mycoplasmosis* (*Mycoplasma gallisepticum*). Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International Des Epizootics, Paris, page 512-521, 1996.
5. YODER HW. *Mycoplasma gallisepticum* infection. Editörler: HOFSTAD MS, BARNES HJ, CALNEK BW, REID WM, YODER HW. Diseases of Poultry. 8. edition. Iowa State University Pres, Ames, Iowa, page 190-212, 1984.
6. İZGÜR M. *Mycoplasma, Ureaplasma, Acheloplasma, Spiroplasma ve Erysipelothrix* infeksiyonları. Editörler: AYDIN N, PARACIKOĞLU J. Veteriner Mikrobiyoloji (bakteriyel hastalıklar). İlke Emek Matbaacılık ve Yayıncılık, Ankara, sayfa 293-304, 2006.
7. EVANS JD, LEIGH SA, BRANTON SL, COLLIER SD, PHARR GT, BEARSON SMD. *Mycoplasma gallisepticum*: Current and developing means to control the avian pathogen. Journal of Applied Poultry Research, 14: 757-763, 2005.
8. ÇARLI KT. Kanatlı Hayvanların İnfeksiyöz Hastalıkları. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, yayın no: 2003-1, Bursa, sayfa 33-40, 2003.
9. ESSENDAL ÖM. Mikoplazma infeksiyonları. Editörler: İZGÜR N, AKAN M. Kanatlı Hayvan Hastalıkları, 1. baskı, Medisan yayın serisi, Ankara, sayfa 79-95, 2002.
10. ANONİM. Avian *Mycoplasmosis* (*Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae*). Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.5, Ofis International Epizootic terrestrial manual, Paris, 2008.
11. LEY DH. *Mycoplasma gallisepticum* infection. Editörler: SAIF YM, BARNES HJ, FADLY AM, GLISSON JR, MCDOUGALD LR, SWAYNE DE. Diseases of poultry, Iowa State University Pres, 11. edition, page 722-743, 2003.
12. MOHAMMED HO, CARPENTER TE, YAMAMOTO R. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial layer flocks. Avian Diseases, 31: 477-82, 1987.

13. RHORER AR. National Poultry Improvement Plan, Conyers, GA, Personal communication, 2002.
14. ERDEM P. Türk tavukçuluk sektörü Avrupa Birliği'ne hazır mı? İzmir Ticaret Odası, 2006.
15. AKSOY F. Tavuk yetiştiriciliği. Bölüm 1, Şahin matbaa, Ankara, sayfa 1-10, 1994.
16. ERENSAYIN C. Bilimsel-teknik-pratik tavukçuluk. Cilt 1, Bölüm 1, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, sayfa 1-30, 2000.
17. HAAHEIM H, VORLAND L, GUTTEBERG TJ. Laboratory diagnosis of respiratory diseases: PCR versus serology. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 20: 1255-1258, 2001.
18. SARKAR SK, RAHMAN M, AMIN KMR, KHAN MFR, RAHMAN MM. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection of chickens in model breeder poultry farms of Bangladesh. *International Journal of Poultry Science*, 4: 32-35, 2005.
19. BARUA SR, PRODHAN AM, ISLAM S, CHOWDHURY S. Study on *Mycoplasma gallisepticum* in chickens in selected areas of Bangladesh. *Journal of Veterinary Medical Science*, 4: 141-142, 2006.
20. HOSSAIN KMM, ALI MY, HAQUE MI. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chicken in the greater rajshahi strict of Bangladesh. *Journal of Veterinary Medical Science*, 5: 9-14, 2006.
20. SIKDER AJ, ISLAM MA, RAHMAN MM, RAHMAN MB. Seroprevalence of *Salmonella* and *Mycoplasma gallisepticum* infection in the six model breeder poultry farms at Patuakhali district in Bangladesh. *International Journal of Poultry Science*, 4: 905-910, 2005.
21. BLANCHARD B, CHEVALLIER B, VERMISSE Y, CHARBONNIER A, GUENNEC JLE. Detection by PCR of avian *Mycoplasmas* from environmental swabs of poultry houses. *British Poultry Science*, 42: 59-63, 2001.
23. ÇARLI KT, EYİĞÖR A. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. *Avian Diseases*, 47: 712-717, 2003.
24. DOVC P, BENCINA D, ANTES R, MANN W. Recombinant DNA probes and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* strains. *Federation of European Microbiological Societies*, 122: 79-84, 1994.
25. FAN HH, KLEVEN SH, JACKWOOD MW. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 39: 729-735, 1995.
26. FAN HH, KLEVEN H, JACKWOOD MW, JOHANSSON KE, PETTERSON B, LEVISOHN S. Species identification of avian *Mycoplasmas* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, 39: 398-407, 1995.
27. SAIF EM. Situation of *Mycoplasma* infections among chickens in upper Egypt with evaluation of different diagnostic techniques. *Journal of Veterinary Medicine*, 37: 54-67, 1997.
28. ROSENFELD LE. Isolation and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* from a fowl. *Australian Veterinary Journal*, 47: 492-495, 1971.
29. COLUSI A. Microbiologic study of strains of *Mycoplasma* infection in poultry previously vaccinated with killed adjuvant vaccines. *Brazilian Veterinary Journal*, 128: 94-100, 1972.
30. O'CONNOR RJ, TURNER KS, SANDER E, KLEVEN SH, BROWN TP, GOMEZ L, CLINE JL. Pathogenic effects on domestic poultry of a *Mycoplasma gallisepticum* strain isolated from a wild house finches. *Avian Diseases*, 43: 640-648, 1999.

31. SAIF-EDIN M, ALY M, MOUSA S. Field evaluation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in broiler breeder chickens. Faculty of Veterinary Medicine Assiut University, 9th Scientific Congre, Egypt, 2000.
32. SOERIPTO, WHITHEAR KG, COTTEW GS, HARRIGAN KE. Virulence and transmissibility of *Mycoplasma gallisepticum*. Australian Veterinary Journal, 66: 65-72, 1989.
33. ANONİM. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü. Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği, Ankara, 2007.
34. MEKKES DR, FEBERWEE A. Real time polymerase chain reaction for qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Pathology, 34: 348-354, 2005.
35. MOSCOSO H, THAYER SG, KLEVEN SH. Materials and methods optimization and application of PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases, 48: 841-850, 2004.
36. NASCIMENTO ER, YAMAMOTO R, HERRICK KR, TAIT RC. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases, 35: 62-69, 1991.
37. NASCIMENTO ER, YAMAMOTO R, KHAN MI. *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain specific polymerase chain reaction. Avian Diseases, 37: 203-211, 1993.
38. SALISCH H, RYLL M, HINZ KH, NEUMANN U. Experiences with multispecies polymerase chain reaction and specific oligonucleotide probes for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Pathology, 28: 337-344, 1999.
39. MACKAY IM. Real time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10: 190-212, 2004.
40. KUBISTA M, ANDRADE JM, BENGTSSON M, FOROOTAN A, JONAK J, LIND K. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects in Medicine, 27: 95-125, 2006.
41. VALASEK MA, REPA JJ. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29: 151-159, 2005.
42. ANONİM. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 1.1.5, Ofise International Epizootic terrestrial Manual, Paris, 2008.
43. ANONİM. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine developments. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 1.1.7. Office International Epizootics Terrestrial Manual, Paris, 2009.
44. HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH PS, GRIFFITH R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology, 10: 413-417, 1992.
45. KISS I, MATIZ K, KASZANYITZKY E, CHAVEZ Y, JOHANSSON KE. Detection and identification of avian *Mycoplasmas* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. Veterinary Microbiology, 58: 23-30, 1997.
46. MATTHEWS JA, KRICKA LJ. Analytical strategies for the use of DNA probes. Analytic Biochemistry, 169: 1-25, 1988.
47. ÇARLI KT. Hayvan infeksiyonlarının tanısında LightCycler PCR kullanımı. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1: 1-10, 2008.
48. HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R. Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology, 11: 1026-1030, 1993.
49. NITSCHKE A, STEUNER N, SCHMIDT CA, LANDT O, ELLERBROK H, PAULI G, SIEGERT W. Detection of human cytomegalovirus DNA by Real-Time quantitative PCR. Journal of Clinical Microbiology, 38: 2734-2737, 2000.
50. WITTEWER CT, FILLMORE C, GARLING DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. Analytical Biochemistry, 186: 328-331, 1990.

51. WITTEWER CT, RIRIE KM, ANDREW RV, DAVID DA, GUNDRY RA, BALIS UJ. The LightCycler™: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22: 176-181, 1997.
52. KLEVEN SH. *Mycoplasmosis*. Editörler: SAIF YM, BARNES HJ, FADLY AM, GLISSON JR, McDOUGALD LR, SWAYNE DE. *Diseases of Poultry*, 11th ed Iowa State University Pres, Amerika, page 719-721, 2003.
53. BARROW GI, FELTHAM RKA. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Third Edition, Cambridge University Pres, UK, page 164-176, 2003.
54. HIRSH DC, ZEE YC. *Veterinary Microbiology*. Blackwell Publishing, California, page 165-172, 2002.
55. QUINN DJ, MARKEY BK, CARTER ME, DANNELLY WJ, LEONARD FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. Blackwell Publishing, Amerika, Chapter: 33, page 189-195, 2003.
56. NASCIMENTO ER, PEREIRA VLA, NASCIMENTO MGF, BARRETO ML. Avian *Mycoplasmosis* update. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7: 1-9, 2005.
57. SONGER JG, POST KW. The genera *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. *Veterinary Microbiology, Bacterial and fungal agents of animal diseases*. Elsevier Saunders, 1. edition, San Bernardino, page 305-316, 2005.
58. SALAMI JO, ADDO P, UMOH JU, ADEGBOYE DS. Chicken *Mycoplasmosis*: A review with special reference to *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Veterinary Bulletin*, 62: 511-520, 1992.
59. CARTER GR, WISE DJ. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. Iowa State Pres, Amerika, page 172-175, 2004.
60. RAZIN S, BARILE MF, HARASAWA R, AMIKAM D, GLASER G. Characterization of the *Mycoplasma* genome. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 56: 357-366, 1983.
61. BISPING W, AMSTSBURG G. *Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals*. Paul Parey Scientific Publishers, Washington, page 306-310, 1988.
62. QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR. *Clinical veterinary microbiology*, Amerika, page 320-326, 2000.
63. KONAMAN EW, ALLEN SD, JONDA WM, SCHRECKENBERGER PC, WINN WC. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, Fourth Edition, J.B. Lippincott company, Amerika, page 675-690, 1992.
64. WILLEY JM, SHERWOOD LM, WOOLVERTON CJ. The low G+C gram positives in Prescott. *Harley and Klein's Microbiology*, Chapter: 23, UK, Higher Education, page 571-575, 2008.
65. TALARO KP. *Foundation in Microbiology*. sixth edition, higher education, Amerika, page 651-652, 2008.
66. BROCK TD, MADIGAN MT. *Biology of microorganisms*, Sixth edition, New Jersey, page 779-781, 1991.
67. CHIN RP, DAFT MB, METEYER CU, YAMAMOTO R. Meningoencephalitis in commercial meat turkeys associated with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 35: 986-993, 1991.
68. NELSON JB, GOWEN JW. The incidence of middle ear infection and pneumonia in albino rats at different ages. *Journal of Infectious Diseases*, 46-53, 1930.
69. DELAPHANE JP, STUART HO. The propagation of a virus in embryonated chicken eggs causing a chronic respiratory disease of chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 4: 325-32, 1943.
70. MARKHAM FS, WONG SC. Pleuropneumonia-like organisms in the etiology of turkey sinusitis and chronic respiratory disease of chickens. *Poultry Science*, 31: 902-904, 1952.

71. ROEKEOL VH, OLESIUK OM. The etiology of chronic respiratory disease. Proceedings of 90th Annual Meeting of American Veterinary Medical Association, page 289-303, 1953.
72. EDWARD DG, KANAREK AD. Organisms of the pleuropneumonia group of avian origin: Their classification into species. Annals of the New York Academy of Sciences, 79: 696-702, 1960.
73. ADEGBOYE DS. Recent advances in poultry *Mycoplasmas* infections. Scientific Workshop in Poultry Diseases, National Veterinary Research Institute, Nigeria, 1985.
74. BRADBURY JM, JORDAN FTW, SHIMIZU T, STIPKOVITS L, VARGA Z. *Mycoplasma anseris* sp. Nov. found in geese. International Journal of Systematic Bacteriology, 38: 74-76, 1988.
75. BENCINA D, DORRER D, TADINA T. *Mycoplasma* species isolated from six avian species. Avian Pathology, 16: 653-664, 1987.
76. KLEVEN SH. *Mycoplasmas* in the etiology of multifactorial respiratory diseases. Poultry Science, 77: 1146-1149, 1998.
77. LEVISOHN S, KLEVEN SH. Avian *Mycoplasmosis* (*Mycoplasma gallisepticum*). Rev. Sci. Tech. Off. Epiz, 19: 425-442, 2000.
78. KLEVEN SH. *Mycoplasma* research methods for lab and field explained. Poultry Digest, 54: 38-41, 1995.
79. TIMONEY JF, GILLESPIE JH, SCOTT FW, BARLOUGH JE. Hogan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. Eight Edition, Amerika, page 312-314, 1984.
80. LEY DH, YOEVER HW. *Mycoplasma gallisepticum* infection. Editörler: CALNEK BW, BARNES HJ, BEARD CW, McDOUGALD, SAIF YM. Diseases of Poultry, Iowa State University Pres, Iowa, page 194-207, 1997.
81. GUNDERSEN DE, LEE IM, REHNER SA, DAVIS RE, KINGSBURY DT. Phylogeny of mycoplasmalike organisms (phytoplasmas): A basis for their classification. Journal of Bacteriology, 176: 5244-5254, 1994.
82. CHRISTENSEN NH, YAVARI CA, McBAIN AJ, BRADBURY JM. Investigation into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in poultry house environment. Avian Pathology, 23: 127-143, 1994.
83. STIPKOVITS L, KEMPF I. *Mycoplasmosis* in Poultry. Review of Sciences Technical Official International Epizootic, 15: 1495-1525, 1996.
84. MUCH P, WINNER F, STIPKOVITS L, ROSENGARTEN R, CITTI C. *Mycoplasma gallisepticum*: Influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 34: 181-186, 2002.
85. THU NV, THUY LT, PHUONG PT. Investigation of avian *Mycoplasma* infection in Vietnam by molecular tools. International Research on Food Security, natural resource management and rural development. Proceeding 379, Germany, 2003.
86. TIMMS LM. The effects of infectious bronchitis superimposed on latent *Mycoplasma gallisepticum* infection in adult chickens. Veterinary Record, 91: 185-190, 1972.
87. CHU HP, UPPAL PK. Single and mixed infections of Avian Infectious Bronchitis Virus and *Mycoplasma gallisepticum*. Developments in Biological Standardization, 28: 101-114, 1975.
88. SOERIPTO, WHITHEAR KG, COTTEW GS, HARRIGAN KE. Virulence and transmissibility of *Mycoplasma gallisepticum*. Australian Veterinary Journal, 66: 65-72, 1989.
89. SATO S, NONOMURA I, SHIMIZU F, SHOYA S, HOIUHI T. Mixed infection with *Mycoplasma gallisepticum* and the B1 strain of Newcastle Disease Virus in chickens. National Institute of Animal Health Quarterly, 10: 58-65, 1970.

90. RANCK FM, GRUMBLES LC, HALL CF, GRIMES JE. Serology and gross lesions of turkeys inoculated with an Avian Influenza A Virus, a Paramyxovirus and *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 14: 54–65, 1970.
91. AGHAKKAN SM, PATTISON M, BUTLER M. Infection of the chicken with an Adenovirus and *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Comparative Pathology*, 86: 1-9, 1976.
92. KATO K. Infectious Coryza of chickens V, Influence of *M. gallisepticum* infection of chickens infected with *H. gallinarum*. *National Institute of Animal Health*, 5: 183–189, 1965.
93. UCHIDA K, TAKAYAMA K, FURUYA T, YANO Y. An outbreak of respiratory diseases associated with Infectious Coryza and *Mycoplasma gallisepticum* infection in commercial broilers. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 43: 29-32, 1990.
94. BATRA GL, SINGH B. *Mycoplasmosis* in domestic fowl with particular reference to the genital system: an experimental study. *Indian Journal of Animal Sciences*, 50: 263-270, 1980.
95. LO SC, DAWSON MS, WONG DM, NEWTON PB, SONODA MA, ENGLER WF, WANG RY, SHIH JW, ALTER HJ, WEAR DJ. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients with AIDS: An immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41: 601–616, 1989.
96. VOGL G, PLAICKNER A, SZATHMARY S, STIPKOVITS L, ROSENGARTEN R, SCOSTAK P. *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. *Infection and Immunity*, 76: 71-77, 2008.
97. CHAMBAUD I, WROBLEWSKI H, BLANCHARD A. Interactions between *Mycoplasma* lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiology*, 7: 493-499, 1999.
98. GAUNSON JE, PHILIP CJ, WHITHEAR KG, BROWNING GF. Lymphocytic infiltration in the trachea in response to *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Microbiology*, 146: 1223-1229, 2000.
99. LEVISOHN S, ROSENGARTEN R, YOGEV D. In vivo variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. *Veterinary Microbiology*, 45: 219-231, 1995.
100. LEVISOHN S, MENAKER D, ROSENGARTEN R, YOGEV D. Experimental infection with *Mycoplasma gallisepticum* clones derived by selection for surface antigen variation in pathogenic strain R. *International Organization for Mycoplasmaology, Letter 3*: 553-554, 1994.
101. BOGULAVSKY S, MENAKER D, LYSNYANSKY I, LIU T, LEVISOHN S, ROSENGARTEN R, GARCIA M, YOGEV D. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* pvpA gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infectious Immunity*, 68: 3956-3964, 2000.
102. YOGEV D, MENAKER RD, STRUTZBERG K, LEVISOHN S, HIRCHHOFF H, HINZ H, ROSENGARTEN R. A Surface epitope undergoing high-frequency phase variation is shared by *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma bovis*. *Infectious Immunity*, 62: 4962-4968, 1994.
103. BENCINA D. Hemagglutinins of pathogenic avian *Mycoplasmas*. *Avian Pathology*, 31: 535-547, 2002.
104. WINNER F, ROSENGARTEN R, CITTI C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infectious Immunity*, 68: 4238-4244, 2000.
105. KEMPF I, GESBERT F, GUITTET M. Experimental infection of chickens with an atypical *Mycoplasma gallisepticum* strain: comparison of diagnostic methods. *Research of Veterinary Sciences*, 63: 211-213, 1997.

106. KHAN MI, KLEVEN SH. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in field samples using samples using a species-specific DNA probe. *Avian Diseases*, 37: 880-883, 1993.
107. LEVISOHN S, DYKSTRA MJ, LIN MY, KLEVEN SH. Comparison of in vivo and in vitro methods for pathogenicity evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in respiratory infection. *Avian Pathology*, 15: 233-246, 1986.
108. CHRISTENSEN NH, YAVARI CA, McBAIN AJ, BRADBURY JM. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. *Avian Pathology*, 23: 127-143, 1994.
109. LEY DH, BERKHOFF E, McLAREN JM. *Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*Carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis. *Avian Diseases*, 40: 480-483, 1996.
110. LEY DH, BERKHOFF JE, LEVISOHN S. Molecular epidemiologic investigations of *Mycoplasma gallisepticum* conjunctivitis in songbirds by random amplified polymorphic DNA analyses. *Emerging Infectious Diseases*, 3: 375-380, 1997.
111. LIERZ M, HAGEN N, BROWN NH, DIVERS SJH, LÜSCHOW D, HAFEZ HM. Prevalance of *Mycoplasmas* in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific *Mycoplasma* polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 36: 145-150, 2007.
112. LUTTRELL MP, FISCHER JR, STALLKNECHT DE, KLEVEN SH. Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches (*carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. *Avian Disease*, 40: 335-341, 1996.
113. NAGATOMO H, KATO H, SHIMIZU T, KATAYAMA B. Isolation of *Mycoplasmas* from fantail pigeons. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59: 461- 462, 1997.
114. RAVIV Z, CALLISON SA, FERGUSON-NOEL N, KLEVEN SH. Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. *Veterinary Microbiology*, 129: 179-187, 2008.
115. BOZEMAN LH, KLEVEN SH, DAVIS RB. *Mycoplasma* challenge studies in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and chickens. *Avian Diseases*, 28: 426-434, 1983.
116. JORDAN FTW, AMIN MM. A survey of *Mycoplasma* infections in domestic poultry. *Research Veterinary Science*, 28: 96-100, 1980.
117. KLEVEN SH, FLETCHER WO. Laboratory infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with *Mycoplasma gallisepticum* and. *Avian Diseases*, 27: 308-311, 1983.
118. JAIN NC, CHANDIRAMANI NK, SINGH IP. Studies on avian pleuro-pneumonia-like organisms. 2. Occurrence of *Mycoplasma* in wild birds. *Indian Journal of Animal Sciences*, 41: 301-305, 1971.
119. SHIMIZU TK, NUMANO K, UCHIDA K. Isolation and identification of *Mycoplasmas* from various birds: An ecological study. *Japon Journal of Veterinary Sciences*, 41: 273-282, 1979.
120. GÖKÇELİK G. *Mycoplasma* infeksiyonlarının teşhisi ve serolojik izleme programlarının önemi. *Veteriner Tavukçuluk Derneği Dergisi*, 1: 6-11, 2008.
121. MOHAMMED HO, CARPENTER TE, YAMAMOTO R, MCMARTIN DA. Prevalance of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layers in southern and central California. *Avian Diseases*, 30: 519-526, 1986.
122. TALHA AFSM. Investigation on the prevalence and significance of *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens in Bangladesh. The Royal Veterinary and Agricultural University, department of Veterinary Microbiology, Doktora tezi, Bangladesh, 2003.
123. BRADBURY JM, McCARTHY JD, METWALF AZ. Microimmunofluorescence for the serological diagnosis of avian *Mycoplasma* infections. *Avian Pathology*, 19: 213-222, 1990.

124. KEMPF I, GESBERT F, GUITET M, BENNEJEAN G, STIPKOVITS L. Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies. *Avian Pathology*, 23: 329-338, 1994.
125. ROBERTS DH. Non-specific agglutination reactions with *Mycoplasma gallisepticum* antijens. *Veterinary Record*, 87: 125-126, 1970.
126. ESSENDAL ÖM. Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum*'a karşı oluşan antikorların çeşitli serolojik yöntemlerle (lam aglutinasyon, hemaglutinasyon inhibisyon, agar jel presipitasyon, ELISA) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 41: 18-47, 1994.
127. MAY JD, BRANTHON SL, CUTHENS MA. Identification of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by flow cytometry. *Avian Diseases*, 32: 513-516, 1988.
128. BRADLEY LD, SNYDER DB, VAN DEUSEN RA. Identification of species-specific Polypeptides of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *American Journal of Veterinary Research*, 49: 511-515, 1988.
129. ESSENDAL ÖM, YARDIMCI H, AYDIN N. Kanatlı hayvanlarda *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae*' ye karşı oluşan antikorların tesbitinde serum lam aglutinasyon (SPA), hemaglutinasyon inhibisyon (HI) ve immunocomb katı-fazi Immunoassay yöntemlerinin karşılaştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi*, 8: 33-45, 1996.
130. YODER HW. Nonspecific reactions to *Mycoplasma* serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. *Avian Diseases*, 33: 60-68, 1989.
131. CULLEN GA, TIMMS LM. Diagnosis of *Mycoplasma* infection in poultry previously vaccinated with killed adjuvant vaccines. *Brazilian Veterinary Journal*, 128: 94-100, 1972.
132. PATTEN BE, HIGGINS PA, WHITHEAR KG. A Urease-ELISA for the detection of *Mycoplasma* infections in poultry. *Australian Veterinary Journal*, 61: 151-155, 1984.
133. EWING ML, KLEVEN SH, BROWN MB. Comparison of enzyme linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition for detection of antibody to *Mycoplasma gallisepticum* in commercial broiler, fair and exhibition and experimentally infected birds. *Avian Diseases*, 40: 13-22, 1996.
134. AHMAD I, KLEVEN SH, GLISSON JR, AVAKIAN AP. Further studies of *Mycoplasma gallisepticum* serum plate agglutination antigen growth in medium with artificial liposomes substituting for serum. *Avian Diseases*, 33: 51-526, 1989.
135. AVAKIAN AP, KLEVEN SH, GLISSON JR. Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test and the hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 32: 262-272, 1988.
136. KLEVEN SH. Antibody response to avian *Mycoplasmas*. *American Journal of Veterinary Research*, 36: 563-565. 1975.
137. SNELL GC, CULLEN G. An evaluation of rapid serum agglutination inhibition tests for *Mycoplasmosis* in Turkeys. *Brazilian Veterinary Journal*, 138: 198-204, 1978.
138. TÜRKASLAN J, SALİHOĞLU H. Çeşitli besiyerleri kullanılarak *Mycoplasma gallisepticum*'un bakteriyolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu. *Pendik Hayvan Hastalıkları Merkezi Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2: 53-59, 1989.
139. GÜLER L. Konya bölgesinde kanatlıların kronik solunum yolu hastalığı (chronic respiratory diseases-CRD)' nin serolojik ve etken izolasyonu ile karşılaştırmalı teşhisi üzerine çalışmalar. *Veterinarium*, 6: 7-15, 1995.
140. EVANS JD, THORNTON DL, BRANTON SL. Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from broiler breeder flock: comparison of three diagnostic methods. *International Journal of Poultry Science*, 8: 104-107, 2009.

141. VAN HW, EATON MD. An unidentified pleuropneumonia-like organism isolated during passages in chick embryos. *Journal of Bacteriology*, 50: 47–55, 1945.
142. ÜLGEN M. Kanatlıların kronik solunum yolu infeksiyonu üzerine karşılaştırmalı bakteriyolojik ve serolojik araştırmalar. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, doktora tezi, 1991.
143. RODRIGUEZ R, KLEVEN SH. Pathogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in broiler chickens. *Avian Diseases*, 24: 800-807, 1980.
144. YODER HW. A Historical account of the diagnosis and characterization of strains of *Mycoplasma gallisepticum* of the virulence. *Avian Diseases*, 30: 510-518, 1986.
145. LAUERMAN LH. Nucleic amplification assays for diagnosis of animal diseases. Ed. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL, USA, page 41–52, 1998.
146. GHARAIBEH S, ROUSSAN DA. The use of molecular techniques in isolation and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* from commercial chickens in Jordan. *International Journal of Poultry Science*, 7: 28-35, 2008.
147. COCKERILL FR. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 127: 1112-1120, 2003.
148. KEMPF I, BLANCHARD A, GESBERT F, GUITTET M, BENNEJEAN G. The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* detection. *Avian Pathology*, 22: 739-750, 1993.
149. LAUERMAN LH, CHILINA AR, CLOSSER JA, JOHANSEN D. Avian *Mycoplasma* identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, 39: 804-811, 1995.
150. LAUERMAN L, HOERR FJ, SHARPTON AR, SHAH SM, SANTEN VLV. Development and application of polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 37: 829-834, 1993.
151. LEY DH, AVAKIAN AP, BERKHOFF JE. Clinical *Mycoplasma gallisepticum* infection in multiplier breeder and meat turkeys caused by F strain: identification by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, restriction endonuclease analysis and the polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 37: 854- 862, 1993.
152. MARDASSI BBA, MOHAMED RB, GUERIRI I, BOUGHATTAS S, MLIK B. Dublex PCR to differentiate between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 948-958, 2005.
153. MAROIS C, DUTFOUR-GESBERT F, KEMPF I. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 73: 311-318, 2000.
154. MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273, 1986.
155. MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology*, 155: 335-351, 1987.
156. FAN HH, KLEVEN SH, JACKWOOD MW. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 39: 729-735, 1995.
157. GARCIA M, JACKWOOD MW, HEAD M, LEVISOHN S, KLEVEN SH. Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* and

- M. iowae* PCR amplification products. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 8: 56-63, 1996.
158. GARCIA M, IKUTA N, LEVISOHN S, KLEVEN SH. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Diseases, 49: 125- 132, 2005.
159. GARCIA M, JACKWOOD MW, LEVISOHN S, KLEVEN SH. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Avian Diseases, 39: 606-616, 1995.
160. GEARY SJ, FORSYTH MH, SAOUD A, WANG G, BERG DE, BERG CM. *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. Molecular and Cellular Probes, 8: 311-316, 1994.
161. HESS M, NEUBAUER C, HACKL R. Interlaboratory comprison of ability to detect nucleic acid of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. Avian Pathology, 36: 127-133, 2007.
162. SACHSE K. Specifity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. Molecular Biotechnology, 26: 61-79, 2004.
163. CARLI KT. Tavuklarda *Mycoplasma* infeksiyonlarında Real-Time PCR ve *Mycoplasma gallisepticum* infekte sürülerin durumu. Veteriner Tavukçuluk Derneği dergisi, 1: 3-5, 2008.
164. KESLER K, GÜLER L, ORHAN G. Tavuklarda kronik solunum sistemi hastalığının (CRD) teşhisinde PCR tekniğinin kullanılması. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Hayvan Sağlığı Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı, Antalya sayfa 215-224, 2008.
165. ERLICH AH, GELFAND D, SNINSKY JJ. Recent advances in polymerase chain reaction. Science, 252: 1643-1652, 1991.
166. PERSING HD. Polymerase chain reaction: trenches to benches. Journal of Clinical Microbiology, 29: 1281-1285, 1991.
167. SCHOCHETMAN G, JONES KW. Polymerase Chain Reaction. Journal of Infectious Diseases, 158: 1154-1157, 1998.
168. SAIKI KR, GELFAND HD, STOFFI S, SCHARF JS, HIGUCHI R, HORN TG. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487-491, 1988.
169. WALKER J, DOUAN G. DNA Probes: A new role in diagnostic microbiology. Journal of Applied Microbiology, 67: 229-230, 1989.
170. ARDA M. Biyoteknoloji (bazı temel ilkeler). Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, No: 3, Ankara, 1995.
171. DEVRİM K, KAYA N. Polimeraz zincir reaksiyonu. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 10: 209-214, 2004.
172. COCKERILL FR, SMITH TF. Rapid-cycle real-time PCR: A revolution for clinical microbiology. American Society for Microbiology News, 68: 77-83, 2002.
173. SARIKAYA AT. DNA'nın izolasyonu ve analizi. Editörler: TEMİZKAN G, ARDA N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Biyogem yayınları, Nobel Tıp Kitabevleri, No:1, Bölüm 2, İstanbul, sayfa 55-80, 2004.
174. GREENFIELD L, WHITE TJ. Sample preparation methods. Editörler: PERSING DH, SMITH TFS, TENOVER FC, WHITE TJ. Diagnostic molecular microbiology, 1 baskı. American society for microbiology, Washington, page 122-137, 1993.
175. SILVEIRA RM, FIORENTIN L, MARQUES EK. Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* diagnosis. Avian Diseases, 40: 218-222, 1996.

176. HANGEN-MANN KC. Polymerase chain reaction-some guidelines for a successful amplification. *British Forum for Ethnomusicology*, 7: 313-316, 1990.
177. LAWYER FC, STOFFEL S, SAIKI RK, MYAMBO K, DRUMMOND R, GELFAND DH. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 6427- 6437, 1989.
178. WILSON IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3741-3751, 1997.
179. ARI Ş. DNA' nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. Editörler: TEMİZKAN G, ARDA N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Biyogem yayınları, Nobel Tıp Kitabevleri, No:1, Bölüm 5, İstanbul, sayfa 101-120, 2004.
180. ALDEMİR OS, UÇAN US. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Temel prensipler. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 1: 53-59, 2001.
181. INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ. Optimization of PCR's . Editörler: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ. PCR Applications protocols for functional genomics. Academic press, San Diego, page 39-67, 1995.
182. ROUX KH. Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research*, 4: 185-194, 1995.
183. STEFFAN RJ, ATLAS RM. Polymerase chain reaction: Applications in environmental microbiology. *Annual Review of Microbiology*, 45: 137-161, 1991.
184. PERSING DH. Diagnostic molecular microbiology, principles and applications. Editörler: PERSING DH, SMITH TF, TENOVER FC, WHITE TJ. American Society for Microbiology, Washington, page 88-104, 1993.
185. SAIKI RK, WALSH PS, LEVERSON CH, ERLICH HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proceedings of National Academic Sciences, USA*, 86: 6230-6234, 1989.
186. BİLGEHAN H. Klinik mikrobiyoloji Tanı. Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, Ankara, sayfa 56-68, 1992.
187. SAMBROOK J, RUSSELL DW. Molecular cloning, A laboratory manual. Third edition, Volume 2, chapter 8, New York, 2001.
188. HOWE CJ, WARD ES. Nucleic acids sequencing. IRL Pres at Oxford University Pres, Oxford, page 53-114, 1989.
189. McPHERSON MJ, HAMES BD, TAYLOR GR. PCR 2. A practical approach. Oxford University Pres, Amerika, page 7-118, 1995.
190. ÇETİNKAYA B. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temel prensipler. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 12: 149-156, 1998.
191. LOWE T, SHAREFKIN J, YANG SQ, DİEFENBACH CW. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research*, 18: 1757-1761, 1990.
192. RYCHLIK W, RHOADS RD. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 17: 8543-8549, 1989.
193. HE Q, MARJAMAKI M, SOINI H, MERTSOLA J, VILJANEN MK. Primers are decisive for sensitivity of PCR. *BioTechniques*, 17: 82-87, 1994.
194. ŞAHİN F, ÇİFTÇİ M, PİRİM İ. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR). II. Uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri kurs notları. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2000.
195. MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology*, 155: 335-351, 1987.

196. SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB. Enzymatic amplification of B-Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354, 1985.
197. WITTEWER CT, FILLMORE GC, GARLING DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Analytical Biochemistry*, 186: 328-331, 1990.
198. WITTEWER CT, FILLMORE GC, HILLYARD DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Research*, 17: 4353-4357, 1989.
199. WITTEWER CT, GARLING DJ. Rapid cycle DNA amplification: Time and temperature optimization. *Biotechniques*, 10: 76-83, 1990.
200. ELENITOBA-JOHNSON O, DAVID D, CREWS N, WITTEWER CT. Plastic versus glass capillaries for rapid-cycle PCR. *Biotechniques*, 44: 487-492, 2008.
201. TEO IA, CHOI JW, MORLESE J, TAYLOR G, SHAUNAK S. LightCycler QPCR optimization for low copy number target DNA. *Journal of Immunological Methods*, 270: 119-133, 2002.
202. LEE DS, TSAI CY, YUAN WH, CHEN PH. A new thermal cycling mechanism for effective polymerase chain reaction in microliter volumes. *Microsystem Technologies*, 10: 579-584, 2004.
203. CAPLIN BE, RASMUSSEN R, BERNARD PS, WITTEWER CT. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. *Biochemica*, 1: 5-8, 1999.
204. BERRY O, SARRE SD. Gel-free species identification using melt-curve analysis. *Molecular Ecology Notes*, 7: 1-4, 2007.
205. SAGNER G, GOLDSTEIN C, MILTENBURG RV. Detection of multiple reporter dyes in Real-Time, Online PCR analysis with LightCycler system. *Biochemica*, 2: 7-11, 1999.
206. REED GH, WITTEWER CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry*, 50: 1748-1754, 2004.
207. AHMED FE. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20: 215-223, 2002.
208. KLEIN D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260, 2002.
209. MHLANGA MM, MALMBERG L. Using Molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-Time PCR. *Methods*, 25: 463-471, 2001.
210. GIBSON UE, HEID CA, WILLIAMS PM. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6: 995-1001, 1996.
211. BUSTIN SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193, 2000.
212. WALKER NJ. A technique whose time has come. *Science*, 296: 557-559, 2002.
213. GÜNEL T. Gen anlatımının kantitatif analizi "Real-Time PCR". *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27: 763-767, 2007.
214. RAYMAEKERS M, SMETS R, MAES B, CARTUYVELS R. Checklist for optimization and validation of Real-Time PCR assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23: 1445-151, 2009.
215. EVANS JD, LEIGH SA. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used *Mycoplasma gallisepticum* challenge strains by PCR. *Avian Diseases*, 52: 491-497, 2008.

216. PONCHEL F, TOOMES C, BRANSFIELD K, LEONG FT, DOUGLAS SH, FIELD SL, BELL SM, COMBARET V, PUISIEUX A, MIGHELL AJ, ROBINSON PA, INGLEHEARN CF, ISAACS JD, MARKHAM AF. Real-Time PCR based on SYBR Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BioMed Central Biotechnology*, 3: 3-18, 2003.
217. HERRMANN MG, DURTSCHI JD, BROMLEY LH, WITTWER CT, VOELKERDING KV. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clinical Chemistry* 52: 494-503, 2006.
218. LAY MJ, WITTWER CT. Real-Time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid cycle PCR. *Clinical Chemistry*, 43: 2262-7, 1997.
219. CROCKETT AO, WITTWER CT. Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time PCR: Using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Analytical Biochemistry*, 290: 89-97, 2001.
220. ZHOU L, MYERS AN, VANDERSTEEN JG, WANG L, WITTWER CT. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clinical Chemistry*, 50: 1328-35, 2004.
221. WITTWER CT, KUSUKAWA N. Nucleic acid techniques. Editörler: BURTIS C, ASHWOOD ER, BRUNS DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 4th ed. Philadelphia: Elsevier Science, Newyork, page 1407-1449, 2005.
222. SKEIDSVOLL J, UELAND PM. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR Green I. *Analytic Biochemistry*, 231: 359-365, 1995.
223. ZIPPER H, BUTA C, LAMMLE K, BRUNNER H, BERNHAGEN J, VITZHUM F. Mechanisms underlying the impact humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Research*, 31: 31-39, 2003.
224. KUBISTA M, STALBERG A, BAR T. Light-up probe based real-time Q-PCR. *Genomics and Proteomics Technologies*, 4264: 53-58, 2001.
225. WITTWER CT, HERRMANN MG, MOSS AA, RASMUSSEN RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22: 130-138, 1997.
226. GUDNASON H, DUFVA M, BANG DD, WOLFF A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: Effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*, 35: 127-136, 2007.
227. VELDEN VDVH, HOCHHAUS A, CAZZANIGA G, SZCZEPANSKI T, GABERT J, DONGEN VJJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17: 1013-1034, 2003.
228. RIRIE KM, RASMUSSEN RP, WITTWER CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245: 54-60, 1997.
229. WANG H, FADL AA, KHAN MI. Multiplex PCR for avian pathogenic *Mycoplasmas*. *Molecular and Cellular Probes*, 11: 211-216, 1997.
230. KEMPF I. DNA Amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian *Mycoplasmosis*. *Avian Pathology*, 27: 7-14, 1998.
231. KOJIMA A, TAKAHASHI T, KIJIMA M, OGIKUBO Y, NISHIMURA M, NISHIMURA S, HARASAWA R, TAMURA Y. Detection of *Mycoplasma* in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. *Biologicals*, 25: 365-371, 1997.

232. PANG Y, WANG H, GIRSHICK T, XIE Z, KHAN MI. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Diseases*, 46: 691-699, 2002.
233. SALISCH H, HINZ KH, GRAACK HD, RYLL MA. 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, 1998.
234. <https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCSiteIndexView?krypto=SkaAACQwJShtROvCu8OWoxd4osPP7Twa3pE%2F1GIbYhs%3D&ddkey=http:RCTopNav>.
235. SLAVIK MF, WANG RF, CAO WW. Development and evaluation of polymerase chain reaction method for diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infections in chickens. *Molecular and Cellular Probes*, 7: 459-463, 1993.
236. CALLISON SA, RIBLET SM, SUN S, IKUTA N, HILT D, LEITING V, KLEVEN SH, SUAREZ DL, GARCIA M. Development and validation of real-time Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected birds. *Avian Diseases*, 50: 537-544, 2006.
237. RAVIV Z, KLEVEN SH. The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian *Mycoplasmas*. *Avian Diseases*, 53: 103-107, 2009.
238. OLSAN NO, YAMAMOTO R, ORTMAYER H. Antigenic relationship between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum*. *American Journal of Veterinary Research*, 26: 195-198, 1965.
239. GLISSON JR, DAWE JF, KLEVEN SH. The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Diseases*, 28: 397-405, 1984.
240. JORDAN FTW, FORRESTER CA, HODGE A, JOHNSON-REEVE LG. Comparison of an aqueous preparation of tilmicosin with tylosin in the treatment of *Mycoplasma gallisepticum* infection of turkey poults. *Avian Diseases*, 43: 521-525, 1999.
241. JORDAN FTW, FORRESTER CA, RIPLEY PH, BURCH DGS. In vitro and in vivo comparisons of valnemulin, tiamulin, tylosin, enrofloxacin and lincomycin/spectinomycin against *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 42: 738-745, 1998.
242. LEVISOHN S, HERZ A, WEISMAN Y. The therapeutic effect of tiamulin on chicks experimentally infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Revue Veterinaire*, 37: 124-130, 1980.
243. KEMPF SH. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian *Mycoplasmiasis*. *Avian Pathology*, 27: 7-14, 1998.
244. HILL D. *Mycoplasma* field issues, diagnostics. *Poultry Digest*, 54: 32-34, 1995.
245. MAROIS C, DUTFOUR-GESBERT F, KEMPF I. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 73: 311-318, 2000.
246. BAGCIGİL AF, ILGAZ A. Studies on the diagnosing of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Medycyna Weterynaryna*, 61: 158-161, 2005.
247. KEMPF I, GESBERT F, GUITET M, BENNEJEAN G. *Mycoplasma gallisepticum* infection in drug-treated chickens: comparison of diagnosis methods including polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine B*, 41: 597-601, 1994.
248. HOPERT A, UPHOFF CC, WIRTH M, HAUSER H, DREXLER HG. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for the detection of *Mycoplasma* contamination in cell lines. *Journal of Immunology Methods*, 164: 91-100, 1993.

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aŐamalarında ve bu zamana kadar ki akademik hayatımda hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, değerli fikirlerini, zamanını ve engin bilgilerini ayırarak bana yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. K. Tayfun ÇARLI'ya, ne zaman istersem bana her tür desteği veren ve engin bilgilerini sunan saygıdeğer hocam Doç. Dr. AyŐegöl EYİGÖR'e, her türlü desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Uzman Dr. Esra Büyükcangaz'a ve Laborant Özlem ZENGİN'e, yetişmemde büyük emekleri olan Ana Bilim Dalımız'ın değerli hocaları Prof. Dr. AyŐin Ően, Prof. Dr. Mihriban Ülgen ve Prof. Dr. Cengiz etin'e, çalışma arkadaşlarım Araştırma Görevlisi Kaan Önat ve Laborant AyŐe Őerikoęlu'na, Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nde *Mycoplasma* laboratuvarı Şefi Dr. Ümit Özdemir'e, her zaman, her Şekilde, maddi veya manevi olarak hep yanımda olan aileme teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

08.06.1981 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlkokul öğrenimimi İstanbul Pendik Merkez İlkokulu'nda, ortaokul öğrenimimi İstanbul Pendik'te Orhan Sinan Hamzaoğlu İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi 1998 yılında İstanbul Pendik Lisesi'nde tamamladım. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde eğitimime başladım ve 2003 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldum. 2004 yılında İstanbul'daki özel bir ilaç firması olan Medicavet'te ilaç ruhsatlandırma departmanında çalıştım. 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 2007 yılında Uludağ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi kadrosunda görev yapmaktayım.