



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MYCOPLASMA GALLISEPTICUM
VARLIĞININ PCR VE LOOP MEDIATED ISOTHERMAL
AMPLIFICATION YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMALI
OLARAK BELİRLENMESİ**

ELİF BULUT

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. MURAT YILDIRIM**

KIRIKKALE – 2023

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



ElifBULUT 02/01/2023

İmza

ÖZET

MYCOPLASMA GALLISEPTICUM VARLIĞININ PCR VE LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMALI OLARAK BELİRLENMESİ

Kırıkkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Ocak 2023, 66 sayfa

Bu tez çalışmasının amacı, ülkemizde tavukçulukta verdiği kayıplar yönünden önemi bilinen kanatlı mikoplazmoz etkenlerinden *Mycoplasma gallisepticum* (MG)'un kısaca LAMP olarak bilinen tanı yönteminin PCR'a göre daha kısa zamanda, düşük maliyetle ve yüksek doğruluk oranıyla teşhis edilemeyeceğini belirlemektir. Enfeksiyöz özellikte ve solunum yoluyla kısa sürede bulaşan *Mycoplasma gallisepticum*'un kontrolü; düzenli aralıklarla denetlenmesi ile hastalığın endüstriyel işletmelerdeki ciddi maddi zararların önüne geçilmesi mümkündür. Bu enfeksiyöz hastalıkta sadece hayvanın karkas özelliklerinin olumsuz yönde etkilenmemekte, yumurta eldesinin azalması ve hastalığın bertaraf edilmesi için ciddi boyutta sağaltım harcamaları yapılması nedeniyle oldukça düşündürücü sonuçları beraberinde getirmektedir. Kanatlı hayvanlarda MG'nin neden olduğu enfeksiyon sadece solunum sistemini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda bağışıklık sisteminin zayıfladığı durumlarda birçok organ veya sistemde ciddi sonuçlar doğurur. Ayrıca kümes hayvanlarında uzun süreli maruziyetten sonra kronik solunum yolu hastalığına neden olur.

Çalışmada, Kırıkkale ve Ankara çevresindeki kanatlı işletmelerinde solunum sistemi enfeksiyonu belirtileri gösteren tavuklardan alınan trakeal svablar, ölen ve nekropsisi yapılmış hayvanlardan alınan akciğer ve a örnekleri (10 işletmeden işletme başına 20'er adet) ile çalışıldı. Her bir kümeden alınarak beşerli havuzlar (4 havuz) oluşturulan akciğer ve trakea örneklerinden yapılan DNA izolasyonu sonrasında örnekler LAMP ve PCR ile değerlendirildi. İncelenen DNA amplifikasyon sonrası yapılan jel elektroforez görüntüleri sonucunda PCR metoduyla toplam 46 tane havuz örneği (her bir havuz 5 akciğer veya trakeadan oluşmaktadır)'nden akciğer için %32,6 (15 tane akciğer havuz örneği)'i ve trakea için %34,78 (16 tane trakea havuz örneği)'i MG varlığı yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Toplam 46 tane havuz örneğinden izole edilen DNA'ların LAMP metodu ile amplifikasyon sonucunda akciğerde %43,47 (20 adet akciğer havuz örneği) ve trakeada %60,87 (28 adet trakea havuz örneği) MG 'ye özgü DNA varlığı belirlendi. LAMP yöntemi PCR yöntemiyle kıyaslandığında, thermal cycler gibi özel ve pahalı gibi cihazlara ihtiyaç duyulmadan ve kontaminasyon riski olmadan yapılması yanı sıra kullanım kolaylığı ve yaklaşık yarım saat gibi kısa bir sürede sonuç alınabilmesi gibi avantajları ile sahada ve ekipman imkanları az olan laboratuvarlarda validasyon ve verifikasyon çalışmalarının yapılarak rutin kullanıma aday bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı. LAMP yönteminin

Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 2016/31'dir.

ABSTRACT

COMPERATIVE DETECTION OF THE PRECENSE OF MYCOPLASMA GALLISEPTICUM BY CONVENTIONEL POLIMERASE CHAIN REACTION AND LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION

Kırıkkale University
Graduate School of Health Science
Veterinary Microbiology Department, Doctoral Degree Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Murat YILDIRIM
January 2023, 66 pages

The aim of this study reflects on the advantages of infectious *Mycoplasma gallisepticum* (MG) which is one of the newly comprehended poultry mycoplasmosis agents, in terms of losses caused by epidemics in poultry in our country, in a shorter time with low cost and high accuracy rated diagnosis. *Mycoplasma gallisepticum* which is infectious and transmitted by respiration in a short period time, can be controlled regularly and makes serious damages on the material can be prevented in industrial poultry enterprises. With this infectious disease, not only the carcass characteristics of the animal are adversely affected, but also because of the reduction of egg production and the treatment of the disease to a great extent, it gets quite thought-provoking results. The infection caused by MG in poultry does not only affect the respiratory system but also in cases of the weakened immune system, many organs or systems have severe consequences. It also causes chronic respiratory disease after long-term exposure in poultry.

In this study, tracheal swabs taken from chickens showing signs of respiratory system infection, lung and a samples taken from dead and necropsied animals were studied in poultry farms around Kırıkkale and Ankara (20 per farm from 10 farms). After DNA isolation from lung and trachea samples, which were taken from each house and formed pools of five (4 pools), the samples were evaluated by LAMP and PCR. After DNA isolations from lung and trachea samples which were collected from each coop, five pools were formed, then the samples were evaluated with LAMP. As a result of the gel electrophoresis images made after the DNA amplification, a total of 46 pool samples (each pool consists of 5 lungs or trachea) from a total of 46 pool samples 32.6% (15 lung pool samples) for the lung and 34.78% for the trachea (16 tracheal pool samples) were evaluated as positive for the presence of MG. As a result of amplification of DNAs isolated from a total of 46 pool samples by LAMP method, the presence of MG-specific DNA was determined in 43.47% (20 lung pool samples) and 60.87% (28 tracheal pool samples) in the trachea. Compared to the PCR method, the LAMP method is performed without the need for special and expensive devices such as a thermal cycler and without the risk of contamination, as well as its advantages such as ease of use and obtaining results in a short time of about half an hour, by performing validation and verification studies in the field and in laboratories with less equipment facilities. It was concluded that it can be used as a candidate method for routine use. It is thought that it will be useful to make the LAMP method more widespread in the diagnosis of diseases in our country and to reveal its effectiveness for other factors.

This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Kırıkkale University. Project number is 2016/031.



TEŞEKKÜR

Akademik açıdan içinde bulunduğum süreçte bana kazandırmış olduğu yetkinlikler için doktora danışmanım Sayın Prof. Dr. Murat YILDIRIM ve Sayın Prof. Dr. Serdar DİKER' e, okuduğunuz bu çalışma ve akademik hayatımda vermiş olduğu desteği için Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sibel KIZIL'a, bana desteğini esirgemeyen Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Referans Laboratuvarı Dairesi eski başkanı Sayın Prof. Dr. Selçuk KILIÇ' a ve yine çalışma sürecimde önerileri ve teknik bilgi paylaşımları için Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü personeli Doç. Dr. Bekir ÇELEBİ ve aynı bölümde çalışan Sayın Elmas EMİNOĞLU ve Alparslan CERİT'e ve Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen *M. gallisepticum* S6 suşu ve DNA'sının temini için Sayın Dr. Ümit ÖZDEMİR'e şükranlarımı sunarım. Değerli Araş. Gör. Batuhan Bakırarar'a tezin son haline kavuşmasında verdiği emek, ayırdığı zaman ve moral desteği için çok teşekkür ederim. Sevgili doktora öğrencisi veteriner hekim Aziz Utku ÖNEL'e büyük bir özveri ile bu tezi bitirmem konusundaki desteğinden dolayı teşekkür ederim. Sevgi ve moral desteklerini devamlı hissettiğim ve en zor zamanlarımda yanımda olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Serap Şahinoğlu Kuş, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı Başkanı Meltem Dartar Öztan'a ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Yasemin YALIM'a teşekkür ederim. Tezin istatistiksel analizlerinin yapılmasında emekleri geçen ve değerli zamanlarını ayıran Hacettepe Üniversitesi İstatistik Bölümü Öğretim Üyesi Gül ERGÜN'e ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Prof. Dr. Kadir Mutlu HAYRAN'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Akademik hayata başlamam ve devam etmem konusunda bana güç veren ve hayatımda bana en büyük desteği, sevgiyi veren rahmetli ve çok değerli eşim Tabip Yarbay Alper BULUT'a büyük bir özlem ve minnetle teşekkür ediyor ve bu tezi O'na ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikoplazma Etkenlerinin Genel Özellikleri.....	3
1.1.1. M. gallisepticum'un Karakteristik Özellikleri	5
1.1.2. Sınıflandırma.....	7
1.1.3. Mycoplasma gallisepticum Enfeksiyonu	7
1.1.4. Etiyoloji	8
1.1.5. Epidemiyoloji	10
1.1.6. Klinik Belirtiler	11
1.1.7. Morbidite ve Mortalite.....	11
1.1.8. Patogenez	11
1.2. MG Tanı	12
1.2.1. Kültür	13
1.2.2. Seroloji.....	15
1.2.2.1. Çabuk Serum Aglütinasyon Testi.....	16
1.2.2.2. Hemagglütinasyon İnhibisyon Testi.....	16
1.2.2.3. Enzim ile İşaretli İmmunosorbent Testi (ELISA)	18
1.2.3. Moleküler Metodlar ile Tanı	18
1.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)	18
1.2.3.2. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).....	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	31
2.1. Gereç	31
2.1.1. Bakteri Suşu ve DNA'sı	31
2.1.2. Organ Örnekleri.....	31
2.1.3. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Cihaz	32
2.1.4. DNA Amplifikasyonunda Kullanılan Malzemeler.....	32
2.1.4.1. Thermal Cyclers	32
2.1.4.2. Primerler	32
2.2. Yöntem	34
2.2.1. Organların Toplanması	34
2.2.2. Primerlerin Belirlenmesi.....	35
2.2.3. Yapay Kontamine Örneklerin Hazırlanması	35
2.2.3.2. Yapay Kontaminasyon İçin Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ...	37
2.2.3.4. Sıvı Materyalinin Yapay Kontaminasyonu	38
2.2.4. Saha Örneklerinin Hazırlanması	39

2.2.5. Doku Örneklerinden ve Yapay Kontamine Örneklerden DNA Ekstraksiyonu.....	39
2.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	40
2.2.7. Amplifiye Edilen Örneklerin AgaroZ Jel Elektroferez Yöntemi ile	41
Görüntülenmesi	41
2.2.8. LAMP Reaksiyonu	41
2.2.9. LAMP Sonuçlarının Değerlendirilmesi	42
3. BULGULAR.....	43
3.1. PCR Sonuçları.....	43
3.2. LAMP Sonuçları	43
3.3. Yapay Kontaminasyon Sonuçları.....	45
3.4. Mycoplasma gallisepticum S6 DNA sulandırılmalarının PCR ve LAMP Sonuçları.....	46
3.5. LAMP Testinin Geçerliliği	48
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR.....	58
EKLER.....	64
ÖZGEÇMİŞ	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. İşletmelerdeki hayvanlardan toplanan trakea ve akciğer örneklerine ilişkin bilgiler.....	32
Çizelge 2. 2. PCR Primeri (World Organisation for Animal Health, 2008)	33
Çizelge 2. 3. LAMP Primeri (Zhang ve ark., 2015)	33
Çizelge 2. 4. CCU ₅₀ metodu	36
Çizelge 2. 5. PCR Protokolü	41
Çizelge 3. 1. PCR ile MG' ye özgü DNA varlığı belirlenen örnekler	43
Çizelge 3. 2. LAMP ile MG' ye özgü DNA varlığı belirlenen örnekler.....	44
Çizelge 3. 3. Saha Örneklerinin MG Varlığı Yönünden Değerlendirilmesi	45
Çizelge 3. 4. Yapay Kontaminasyon Sonuçları.....	46
Çizelge 3. 5. Mg S6 DNA sulandırmasının PCR ve LAMP Sonuçları	47
Çizelge 3. 6. Akciğer doku örneklerinde teşhis testlerinin çapraz-tablo ile karşılaştırılması.....	49
Çizelge 3. 7. Trakea doku örneklerinde teşhis testlerinin çapraz-tablo ile karşılaştırılması.....	50
Çizelge 3. 8. Trakea veya Akciğer örneklerinde teşhis testlerinin çapraz-t.ablo ile karşılaştırılması.....	51
Çizelge 3. 9. PCR yöntemi ile kümes yaş ortalaması karşılaştırılması.....	52
Çizelge 3. 10. LAMP yöntemi ile kümes yaş ortalaması karşılaştırılması.....	53
Çizelge 3. 11. Ki-kare testi.....	53
Çizelge 3. 12. Simetrik ölçümler	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Boyanmamış etkenler, x10'luk büyütme (Markey ve ark., 2013)	5
Şekil 1. 2. Boyanmamış Mikoplazma mikrokolonileri, tipik sahanda yumurta görünümü, x25'lik büyütme (Markey ve ark., 2013).....	5
Şekil 1. 3. Agardaki bir mikoplazma kolonisinin agar yüzeyi ve yüzeyin hemen altındaki gelişiminin kesitsel şematik görünümü (Markey ve ark., 2013)	6
Şekil 1. 4. LAMP Reaksiyonu (New England Biolabs, n.d.)	22
Şekil 1. 5. LAMP Reaksiyonu (Notomi ve ark., 2015).....	22
Şekil 1. 6. Loop Primerlerine ait sekanslar (Nagamine ve ark., 2002).	23
Şekil 1. 7. PSA: prostat-spesifik antijen, λDNA: Ticari DNA Ultrospec 2000 spektrofotometre (Pharmacia Biotech), 400 nm dalga boyu ile yapılan bulanıklık ölçümü (Mori ve ark., 2001).....	24
Şekil 1. 8. Bulanık belirlenmesi (Huang ve ark., 2017)	25
Şekil 1. 9. Metal iyon konsantrasyonundaki değişimin, floresan parlama veren bir metal indikatör (Kalsein) kullanılarak belirlenmesi (Tomita ve ark., 2008a).	26
Şekil 1. 10. Kalsein kullanıldığında negatif (solda) ve pozitif (sağda) reaksiyonun bir el UV lambasıyla (dalga boyu: 365 nm.) belirlenmesi (Tomita ve ark., 2008a)	26
Şekil 1. 11. Kalsein kullanıldığında negatif (solda) ve pozitif (sağda) reaksiyonun gün ışığında belirlenmesi (Tomita ve ark., 2008a).	26
Şekil 1. 12. Hydroxy naphthol blue ile renk değişiminin belirlenmesi. Solda mor ve berrak tüp (negatif), sağda açık mavi ve bulanık (pozitif) (Britton, Cheng, Sutherland ve McCarthy, 2015)	27
Şekil 1. 13. Agaroz jel elektroforez görüntüsü (2.5%) (Tomita ve ark., 2008a).1. Hedef DNA, Mn ²⁺ iyon konsantrasyonu 0 mM, 2. DNA yok, Mn ²⁺ iyon konsantrasyonu 0 mM, 3. Hedef DNA ve Mn ²⁺ iyon konsantrasyonu 0,5 mM, 4. DNA yok, Mn ²⁺ iyon konsantrasyonu 0,5 mM M. Marker (100 bp)	28
Şekil 2. 1. CCU ₅₀ hesaplanması için mikropleytte hazırlanan Mikoplazma sulandırması.....	36
Şekil 2. 2. Yapay kontamine örneklerin hazırlanması	37
Şekil 2. 3. MagAttract® HMW DNA kit prosedürü.....	40
Şekil 3. 1. MG dsDNA miktarı için Qubit 4 Fluorometer Ölçümleri	46
Şekil 3. 2. PCR ile incelenen M. gallisepticum'a ait DNA dilusyonlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri (mgc2 - 185 bp).....	47
Şekil 3. 3. LAMP ile incelenen M. gallisepticum'a ait DNA dilusyonlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri (pdhA-330 bp)	47
Şekil 3. 4. Akciğer ve trakea doku örneklerindeki PCR sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde LAMP yönteminin tanısal özellikleri.....	48
Şekil 3. 5. Akciğer veya trakea doku örneklerindeki PCR sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde LAMP yönteminin tanısal özellikleri	51
Şekil 3. 6. PCR yöntemi ile farklı değerlendirme yöntemleri ve kümes yaş ortalamasına göre pozitiflik sonuçları.....	52
Şekil 3. 7. LAMP yöntemi ile farklı değerlendirme yöntemleri ve kümes yaş ortalamasına göre pozitiflik sonuçları.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LAMP- Loop Mediated Isothermal Amplification Yöntemi

PCR- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MG- *Mycoplasma gallisepticum*

CRD-Kronik Solunum Yolu Hastalığı

DNA- Deoksiribonükleik asit

OIE- Uluslararası Salgın Hastalıklar Birimi

ELISA-Enzim Linked Immunosorbent Assay

HI-Hemaglütinasyon İnhibisyon

PPLO-Pleuropneumonia – like organism

FA- Floresan antikor

KFT- Komplement Fikzasyon Testi

tRNA- transfer ribonükleik asit

rRNA ribozomal Ribonükleik asit

CRISPR- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

pH- Potansiyal Hidrojen

GAPa- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A

crmA adezinleri-

vlhA ailesi-

rPCR- reverse Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SPAT- Serum Pleyt Aglutinasyon Test

HBV-Hepatit B virüsü

HNB- Hydroxy naphthol blue

LFA- Lateral flow biyosensör

FITC- Fluorescein isothiocyanate

MB- Methylene blue

µl- mikrolitre

ml-mililitre

g- gram

µm- mikrometre

mM-milimolar

1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde tavuk yetiştiriciliği önemli, gelişen ve teknolojiye açık bir sektördür. Hem eti hem de yumurtası ile hayvansal protein ihtiyacının önemli ölçüde giderilmesini sağlayan tavuk, üretiminin kolay ve hızlı olmasının yanında maliyetinin de düşük olması nedeniyle hayvancılık sektöründe özel bir önem arz etmektedir. Pek çok bakteriyel, viral, protozer hastalıklar başta olmak üzere besinsel yetmezlikler de bu sektör içerisinde karşılaşılmaya başlanmıştır. Bakteriyel hastalıklar içerisinde *E.coli*, *Salmonella* türleri ve *Campylobacter*'e ilişkin salgınlar uzun zamandır bilinmekte ve hastalığın tanılandırılması yapılmaktadır. Söz konusu bu hastalıklar, canlıda artan verimle birlikte stres yarattığı için immunitede ciddi bir kırılmaya yol açmaktadır. Hatta bunlar bir veya birkaç hastalık kompleksini içerecek şekilde yaygın ölümlerle kendini göstermektedir. Bu hastalıklardan biri de Kronik Solunum Yolu Hastalığı (Chronic Respiratory Disease-CRD) kompleksidir.

Tavukçuluk işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olan, Kronik solunum yolu hastalığı etkeni *Mycoplasma gallisepticum* (MG) 'un periyodik olarak kontrolü gerekmektedir (Kleven, 2008). Ekonomik kayıplar; karkas kalitesinin ve ağırlığının düşmesi, yumurta verimindeki azalma, tedavi masrafları nedeniyle gerçekleşmekte ve buda mikoplazma infeksiyonlarını dünyanın en maliyetli hastalıklarından biri durumuna getirmektedir (Swayne, 2013). MG özellikle diğer solunum sistemi patojenlerinin varlığında ya da immun sistemin zayıfladığı durumlarda tavuklarda kronik solunum yolu hastalığına neden olmaktadır. MG kaynaklı hastalık belirtileri; burun akıntısı, konjunktivit, öksürük, aksırık, hırıltılı solunumdur (Songer ve Post, 2004). Buna ek olarak, yumurta veriminde düşüş ve keratokonjunktivit, artrit, salpinjit ve ensefalopati de görülebilir (Songer ve Post, 2004; World Organisation for Animal Health, 2008).

Kronik solunum yolu hastalığının primer etkeni olan MG, yumurta yoluyla bulaşması ve hücre duvarının olmaması nedeniyle çevresel etkilere karşı oldukça duyarlıdır ve bu nedenle teorik olarak işletmede kontrolü kolaydır (Kleven, 2008; Swayne, 2013). Hastalığın şiddeti, Newcastle veya İnfeksiyöz Bronşit gibi viral ya da *Escherichia coli* gibi bakteriyel sekonder enfeksiyonlarla komplike olduğunda artar. Damızlık ve yumurtacı sürülerde hastalık yumurta verim düşüklüğüne neden olabilen daha kronik

bir formda da ilerleyebilir (Swayne, 2013; World Organisation for Animal Health, 2008).

Tavuk işletmelerinde Kronik Solunum Yolu Hastalığının kontrolünde öncelikli olarak mikoplazma-ari sürülerin bulunması önemlidir. Bununla beraber iyi biyogüvenlik önlemlerinin alınması ve düzenli izleme programlarının uygulanması hastalığın kontrolünde önem taşımaktadır (Kleven, 2008; Swayne, 2013).

Tavukçuluk işletmelerinde sürülerin MG varlığı yönünden taranması Amerika Birleşik Devletleri'nde National Poultry Improvement Plan Program Standards tarafından düzenlenmiştir (National Poultry Improvement Plan Program Standards 2014). Kanatlı mikoplazma etkenlerinden biri olan kronik solunum yolu hastalığı etkeni MG, World Organisation for Animal Health (OIE) 2017 Hastalıklar Listesinde yer almaktadır (World Organisation for Animal Health, 2017).

Ülkemizde mikoplazma izleme programı, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığınca hazırlanan ve 16.01.2014 tarihinde 28884 sayılı Resmî Gazetede yayımlanan Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği'ne göre düzenlenmektedir. Bu yönetmeliğe göre damızlık sürülerin MG varlığı yönünden negatif olması gerekmektedir. MG ile enfekte damızlık sürülerden elde edilen yumurta ve civcivler hastalığın nesilden nesile aktarılmasına sebep olur (Kleven, 2008; Swayne, 2013). Sürülerde MG varlığı; çabuk serum aglütinasyon, serum plak dilüsyon ve tüp aglütinasyon tarama testleri kullanarak araştırılır, hemaglütinasyon inhibisyon (HI) ve Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi ile doğrulanır (T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2007a). Mikoplazma infeksiyonlarının tanısında altın standart izolasyon ve identifikasyondur (Kleven, 2008). Yani ELISA ve HI ile pozitif çıkan sürüler bakteriyolojik olarak ya da PCR ile doğrulanmalıdır (World Organisation for Animal Health, 2008).

Mikoplazma, kültürünün yapılmasının zorluğu ve yavaş üremesi nedeniyle laboratuvar şartlarında güçlüklerle izole edilmektedir. Ayrıca diğer mikroorganizmalar ya da hızlı üreyen mikoplazmalar tarafından üremenin maskelenmesi mikoplazmaların izolasyonunu daha güç hale getirmektedir (Kempf, 1998; Swayne, 2013). Çabuk serum aglütinasyon, tüp aglütinasyon, hemaglütinasyon inhibisyon ve ELISA gibi serolojik testler MG yönünden kümeslerin denetlenmesinde kullanışlı olmasına rağmen yanlış pozitiflik, düşük özgünlük ve duyarlılıkları nedeniyle yeterli olmamaktadır (Carli ve Eyigor, 2003; Kleven, 2008; Kahya ve ark., 2015).

Bu nedenle patojenik mikoplazmaların, alınan uygun örneklerden DNA'larının amplifiye edilmesi için kullanılan moleküler yöntemler enfeksiyonun belirlenmesinde kullanılmaktadır (Kempf, 1998; Lauerman, Hoerr, Sharpton, Shah, & van Santen, 1993; Swayne et al., 2013; World Organisation for Animal Health, 2008). DNA amplifikasyon yöntemlerinde; doğru örnek alınmasına, DNA ekstraksiyonuna uygun hedef bölgenin seçilmesine ve amplifikasyon inhibitörlerine dikkat edilmesi gerekir (Kempf, 1998). PCR infekte sürülerin belirlenmesinde hızlı aynı zamanda yüksek spesifite ve sensitiviteye sahiptir. Buna rağmen, alınan örneklerdeki PCR inhibitör maddelerinin varlığı, çevresel kontaminasyon riski ve cansız mikoplazmaların da belirlenebilmesine olanak vermesi nedeniyle PCR'nin konvansiyonel yöntemlerin yerini alamayacağı bildirilmiştir (Kempf, 1998).

Konvansiyonel kültür metoduna alternatif olarak kullanılan DNA amplifikasyon metotlarından biri Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) yöntemidir. Kaynakların yetersiz olduğu ya da yüksek maliyetli ekipmanların bulunmadığı durumlarda; MG enfeksiyonunu daha düşük maliyetli, basit ve hızlı yöntemlerle belirlemek önem kazanmaktadır (Zhang et al., 2015). Notomi ve ark., (2000) ilk kez kısa adıyla LAMP olarak bilinen yeni bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem, Nagamine ve ark. (2002) tarafından loop primerlerinin eklenmesiyle reaksiyon hızının ve hassasiyetinin artması sağlanarak daha da geliştirilmiştir (Nagamine, Hase and Notomi, 2002a). LAMP yönteminin sabit ısıda gerçekleşmesi ve thermal cycler gibi pahalı cihazlara ihtiyaç duyulmaması, oluşan son ürünün çıplak gözle görülebilmesi ve değerlendirilebilmesi nedeniyle kaynakları kısıtlı laboratuvarlar için enfeksiyonların belirlenmesinde uygun bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Mori, Nagamine, Tomita and Notomi, 2001; Nagamine et al., 2002a; Notomi, Mori, Tomita, & Kanda, 2015; Notomi et al., 2000; Tang et al., 2011; Zhang et al., 2015).

1.1. Mikoplazma Etkenlerinin Genel Özellikleri

Mollicutes sınıfında yer alan *Mycoplasma* türleri insan, birçok hayvan türü, bitki ve böceklerde bulunur (Markey ve ark., 2013; Quinn ve ark., 2011; Swayne, 2013). Mollicutes sınıfı kendi kendine replike olabilme yeteneğine sahip en küçük prokaryot hücredir. Mollicutes sınıfı üyeleri genetik olarak hücre duvarı sentezleyemezler ve hücre etrafı protein, glikoproteinden, glikolipid, fosfolipidden ve oluşan bir plazma

membranı ile çevrilidir bu nedenle pleomorfiktirler. En küçük reproduktif birim 0,3 µm. çapındadır fakat esnek yapısı nedeniyle 0,22 µm. çaplı membran filtrelerden geçebilir. Karakteristik olarak katı besi yerinde sahanda yumurta benzeri koloniler oluşturan Mollicutes sınıfı üyelerinin çoğu Anaeroplasma türleri hariç fakültatif anaerob veya mikroaerofildir. Mollicutes sınıfı üyeleri peptidoglikan sentezleyemedikleri için Gram boyama yöntemi ile zayıf boyanırlar, Giemsa ve Romanowski boyama yöntemleri ile daha iyi boyanırlar (Markey et al., 2013; Quinn et al., 2011; Swayne et al., 2013). Mikoplazmalar kurumaya, ısıya, deterjanlara ve dezenfektanlara duyarlı iken bakteri hücre duvarı sentezini hedef alan antibiyotiklere karşı dirençlidirler (Quinn et al., 2011).

Mollicutes sınıfında 1890 yılında ilk izole edilen ve bulaşıcı sığır pleuropneumoni hastalığı etkeni olan *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* nedeniyle mikoplazmalara genel olarak pleuropneumonia – like organism (PPLO) denilmektedir. Hayvanlar için önemli olan Mollicutes sınıfına ait cinsler; *Mycoplasma*, *Ureaplasma* ve *Acholeplasma*'dır (Markey et al., 2013; Quinn et al., 2011).

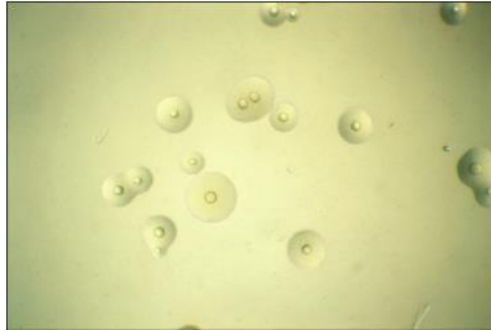
İlk olarak hindilerde epizootik pneumoenterit olarak adlandırılan ve tanımlanan mikoplazma daha sonra hindilerde infeksiyöz sinüzit etkeni olarak tanımlanmıştır. Son olarak tavuklarda kronik solunum yolu hastalığına neden olan etkenin izole edilmesini takiben bu bakterinin pleuropneumonia grubuna dahil olduğu kabul görmüştür (Markey et al., 2013; Quinn et al., 2011).

Birçok metabolik aşama için gerekli olan genlerin kaybedilmesi nedeniyle Mikoplazmaların genomları küçüktür. Kendileri için gerekli olan maddeleri üretememeleri, konak hücrenin esansiyel maddelerine ihtiyaç duymalarına ve in vitro üremelerinin nazlı olmasına neden olur (Quinn et al., 2011).

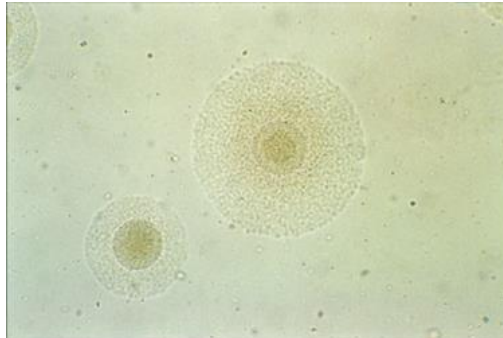
Tüm dünyada yaygın olarak bulunan Mikoplazmalar insan ve hayvanlarda konjunktiva, nazal kavite, orofarenks, intestinal ve genital kanalların mukoza yüzeylerinde bulunur. Bazı türler vücutta birçok lokalizasyonda bulunabilirken bazıları ise belli anatomik bölgelere tropizm gösterirler. Bazı türlerin geniş bir konak dağılımı göstermesine rağmen bazı türler ise konak spesifiktirler (Quinn et al., 2011). Genel olarak mukozal yüzeylerde kolonize olan Mikoplazmalar invaziv değildir. Buna rağmen *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae* hücreye penetre olabilme yetenekleri olduğunu bildirmişlerdir (Winner ve ark., 2000) (Dušanić et al., 2009).

1.1.1. *M. gallisepticum*'un Karakteristik Özellikleri

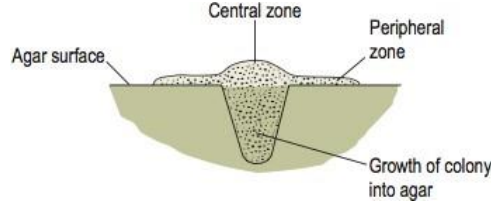
Kanatlı kaynaklı Mikoplazma türleri genel olarak %10-15 hayvan serumu içeren proteinden Kaewphinit in besisi yerine ihtiyaç duyarlar. Maya kaynaklı bileşenler gibi ilave destekler faydalıdır. *M. synoviae*'nin üremesi için Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD)'e ihtiyacı vardır. Çoğunlukla Frey (Frey, Hanson, & Anderson, 1968) veya Bradbury (JANET M Bradbury, 1977) tarafından tanımlanan besiyeri kanatlı Mikoplazmalarının kültürasyonu için kullanılır. Yavaş büyüme eğiliminde olan Mikoplazmalar genellikle 37°C-38 °C' de iyi ürerler, kontaminant bakteri ve mantar üremesini engelleyen penicillin ve thallium acetate'a dirençlidirler. 37°C de 3-10 gün sonunda agarda koloniler oluşmaya başlarken *M. gallinarum* and *M. gallinaceum* gibi patojen olmayan türlerin kolonileri 1 gün içinde agarda şekillenmeye başlar (Kanatlı kaynaklı patojen Mikoplazmaların izolasyonunda *M. gallinarum* ve *M. gallinaceum* sıklıkla kontaminant olarak izole edilirler) (Şekil 1.3). Tipik koloniler küçük, düzgün, yuvarlak, yassıdır ve koloni merkezi agarın içine doğru uzadığı için bu bölge daha yoğun görülür (Markey et al., 2013; Swayne et al., 2013).



Şekil 1. 1. Boyanmamış etkenler, x10'luk büyütme (Markey et al., 2013)



Şekil 1. 2. Boyanmamış Mikoplazma mikrokolonileri, tipik sahanda yumurta görünümü, x25'lik büyütme (Markey et al., 2013)



Şekil 1. 3. Agardaki bir mikoplazma kolonisinin agar yüzeyi ve yüzeyin hemen altındaki gelişiminin kesitsel şematik görünümü (Markey et al., 2013)

Mikoplazma hücresi 0,2–0,5 µm boyutlarında pleomorfik yapıdadır (Şekil 1.1. ve Şekil 1.2.) (Markey et al., 2013). Türler arasında karbonhidrat fermentasyonu çeşitlilik gösterir. Türler, glikozu fermente edip etmemelerine ve fermentasyon sonucu asit oluşturup oluşturmamalarına göre ayrılırlar (Markey et al., 2013; Swayne et al., 2013). Karbonhidrat fermente eden türlerin üremelerini arttırmak amacıyla besi yerine sıklıkla glikoz eklenir. Besi yerindeki glikozun, fermentasyon sonucu oluşan asit nedeniyle renk değiştiren fenol kırmızısı ile üremenin indikatörü olarak da işlevi vardır. Çoğu tür ana enerji kaynağı olarak arginine amino asidini kullanır, glikozu fermente etmez (Swayne et al., 2013).

M. gallisepticum, *M. synoviae* ve *M. meleagridis* önemli özelliklerinden birisi de tavuk ya da hindi eritrositlerini hemaglutine etmeleridir. Hemaglutinasyon özelliği sayesinde bu türlerde, serolojik bir test olan hemaglutinasyon inhibisyon testinden yararlanılabilir (Markey et al., 2013; E. Nascimento, Pereira, Nascimento, & Barreto, 2005; Swayne et al., 2013).

Mikoplazmaların frajil, pleomorfik olmaları ve zayıf boyanmaları nedeniyle çoğu Mikoplazma kaynaklı hastalığın, boyalı sürme preparatlardan direkt mikroskopik incelemeye tanısı zordur (Markey et al., 2013). Bununla birlikte klinik örneklerde Mikoplazma türlerinin identifikasyonuna yönelik floresan antikor teknikleri geliştirilmiştir (Amin & Jordan, 1979; Markey et al., 2013). İzolasyon sonrası agarda oluşan Mikoplazma mikrokolonileri Diene's boyama ile mikroskopta incelenebilir (Markey et al., 2013). Veteriner Hekimlikte önemli olan Mikoplazmaların cins düzeyinde ayrımı için; digitonin duyarlılığı, modifiye üreaz testi ve koloni büyüklüklerinden faydalanılabilir. Tür düzeyinde ayrım için; dokudan yapılan Floresan antikor (FA) boyama, Mikoplazma kolonilerini floresan antikor tekniğiyle (direkt-indirekt) boyama, enzimle işaretli immunoperoksidaz testi, agar jel difüzyon testi, ELISA ve komplement fiksasyon testi (KFT), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), loop mediated isothermal amplification (LAMP), biyokimyasal testler (glikoz

fermentasyon, arjinin hidroliz, fosfataz aktivitesi ve tetrazolyum redüksiyonu), metabolik inhibisyon testi, üreme inhibisyon testi kullanılabilir (Nascimento et. al. 2005; Kleven et al. 2008, Markey et. al. 2013, Swayne 2013, Kursu et. al. 2015, Liu et. al. 2015, Zhang et. al. 2015, Yumiko et. al. 2016).

1.1.2. Sınıflandırma

Mycoplasmatales takımında Mollicutes sınıfında *Mycoplasmataceae* ailesinin bir üyesi olan *Mycoplasma* cinsinde 120'den fazla tür bulunmaktadır. 580–1.350 kb büyüklüğünde genomu olan Mikoplazmaların DNA sı 23%–40% G+C içerir (Swayne et al., 2013). İzolasyon için besi yerinde kolesterole ihtiyacı vardır ve bu genel olarak %20 at serumu ilavesi ile sağlanır. Optimal üreme ısısı 37°C dir. *Mycoplasmataceae* ailesinin bir diğer üyesi olan *Ureaplasma* cinsi üreyi hidrolize edebilmesi ile *Mycoplasma*’lardan ayrılır (Kleven, 2008; Markey et al., 2013; E. Nascimento et al., 2005; Quinn et al., 2011; Swayne et al., 2013). Bazı *Mycoplasma* türlerinin tüm genom sekanslarının bulunduğu, güncellenen ve internet üzerinden ulaşılabilen veri bankası bulunmaktadır (Barré, De Daruvar, & Blanchard, 2004). Bu veri bankası *Mycoplasma* türleri arasındaki filogenetik ilişki, genom büyüklüğü, içerdiği G-C oranı hakkında bilgi vermektedir.

1.1.3. *Mycoplasma gallisepticum* Enfeksiyonu

Tavuklarda kronik solunum yolu hastalığı (Chronic Respiratory Disease, CRD) ve hindilerde infeksiyöz sinüzit (infectious sinusitis) hastalığı olarak bilinen *Mycoplasma gallisepticum* (MG) enfeksiyonları, yem tüketimi ve yumurta üretiminde azalma, hırıltılı solunum, öksürük, aksırık, göz ve burun akıntısı, konjonktivit ve hindilerde infraorbital sinüzitle karakterizedir (E. Nascimento et al., 2005; Quinn et al., 2011; Swayne et al., 2013). MG ve MS enfeksiyonları bazı bakteriler (genellikle *Escherichia coli*) ve solunum sistemi virusleriyle (İnfeziyöz Bronşit ya da Newcastle hastalığı virüsleri gibi) komplike olduğunda ciddi hava kesesi yangısının eşlik ettiği Hava Kesesi Hastalığı ile sonuçlanır (Kleven, 2008; Swayne, 2013).

MG, dünyanın her yerinde kanatlı işletmeleri için ekonomik öneme sahip en patojen bakteriyel solunum sistemi enfeksiyonlarından biridir. Ekonomik kayıplar, yumurta verimi ve kalitesinin düşmesi, zayıf kuluçkalama kabiliyeti (yüksek oranda embriyonik ölüm, zayıf-güçsüz civciv), yemden yararlanmada azalma, mortalitede artış, karkas kalitesinin düşmesi ve bütün bunlara ek olarak tedavi masrafları nedeniyle

görülmektedir (E. Nascimento et al., 2005; Swayne et al., 2013). Koruma ve kontrol programları, izolasyon ve identifikasyon, seroloji, moleküler deteksiyon ve karakterizasyon aşamalarından oluşan izleme, aşılama ve enfekte sürülerin eradikasyonu ise ilave masraflara neden olmaktadır (Swayne et al., 2013).

1.1.4. Etiyoloji

Mycoplasma cinsinde yer alan *M. gallisepticum* 200'den fazla hayvan türü ve insanı enfekte eder (Razin, 1992). Mollicute' ler hücre duvarı olmayan ve kendi kendine replike olabilen en küçük prokaryot hücrelerdir (Markey et al., 2013; Quinn et al., 2011; Swayne et al., 2013). *M. gallisepticum* diğer kanatlı Mikoplazmalarından serotiplendirmeye ilk sınıflandırılan ve ayrılan türdür (Swayne et al., 2013; Yamamoto & Adler, 1958a, 1958b). Genel olarak Serotip A olarak belirlenmiştir (Kleckner, 1960, Swayne 2013, Yoder and Hofstad 1964) . MG türlerinin belirlenmesi 1960 yılında Edward ve Kanarek tarafından yapılmıştır (Swayne 2013). MG ye antijenik ve fenotipik olarak benzer bir Mikoplazma türü, 1993 yılında moleküler teknikler kullanılarak *M.imitans* olarak adlandırılmıştır (Harasawa and Bradbury, 2004).

Mikoplazma taksonomisi ve filogenezi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. DNA-DNA hibridizasyonu (Kleven, Morrow, Whithear, 1988), 16S rRNA geninin sekans analizi (Razin 1992, Weisburg et. al. 1989), 16S rRNA PCR (García, Ikuta, Levisohn and Kleven, 2005), denatüre gradient jel elektroforezi (McAuliffe et.al. 2005, Nascimento et. al. 1991) ve tRNA gen PCR analizi (Bradbury et. al. 1993, Stakenborg et. al. 2005; Swayne 2013) ve CRISPR ile genomundaki evrim incelenmiştir (Delaney et. al. 2012).

M. gallisepticum (MG) Giemsa ile iyi boyanır ve ışık mikroskobu ile genel olarak kokoid şekilde görülür (Markey et. al. 2013, Swayne 2013). *M. gallisepticum*' un üreyebilmesi için besi yerine %10-15 oranında ısı ile inaktive edilmiş domuz, at ya da kanatlı serum ilavesi gerekmektedir. Frey ve arkadaşlarının geliştirdiği gerekli tüm maddeler ile maya özü ve glukoz içeren besi yeri %10-15 domuz serumu eklenerek hazırlandığında çoğu Mikoplazma izolasyonu için uygun olmaktadır (Kleven 2008, World Organisation for Animal Health 2008, Swayne 2013). Bakteriyel ve fungal kontaminasyonun önlenmesi amacıyla besi yerine thallos acetate (1:2000' e kadar) ve penicillin (maksimum 2,000IU/ml) ilavesi gerekmektedir (World Organisation for

Animal Health 2008 Swayne 2013).

Glikozu fermente edebilen MG besi yerinin pH'nın düşmesine neden olmaktadır. Besi yerine eklenen fenol red pH değişimi sonucu, turuncudan sarıya doğru renk değiştirmekte ve üremenin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Swayne et al., 2013; World Organisation for Animal Health, 2008). En iyi üreme sıvı besi yerinde, 7,8 pH, 37°C ve aerobik koşulda, 3-5 günde görülmektedir (World Organisation for Animal Health 2008, Swayne 2013). Bazı saha izolatları için süre uzayabilir ve 5-7 günlük aralıklarla 2-3 kere pasaj yapmak izolasyon şansını arttırabilir (Swayne 2013). Hem Mikoplazma agar hem de Mikoplazma brotha ekilen örnekler, günlük olarak üreme yönünden renk değişimine bakılarak kontrol edilmelidir (World Organisation for Animal Health, 2008). Katı besiyeri, yavaş büyüyen Mikoplazma kolonilerinin belirlenmesine yardımcı olur. Eksudat veya doku svabları direkt Mikoplazma agara ekildikten sonra, 4-5 günlük inkubasyon sonunda koloniler görülebilse de ilk izolasyonda sıvı besiyeri kullanılması daha hassas bir izolasyon metodu olarak bildirilmiştir. Başarılı bir izolasyon için 10^{-3} 'e kadar seri dilüsyonların yapılması gerekebilir (World Organisation for Animal Health 2008, Swayne 2013). MG glikoz ve maltozu asit oluşturarak fermente eder, gaz oluşturmaz. Laktoz, dulcitol ve salisini fermente edemez. Sükrozu nadiren fermente eder. Galaktoz, früktoz, trehaloz ve mannitol değişkendir. Arjinini hidrolize etmez ve fosfataz negatiftir (Swayne et al., 2013). Tavuk ve hindi eritrositlerinde aglutünasyon şekillendiren MG'nin bu özelliğinden hemaglutinasyon inhibisyon testinde faydalanılmaktadır (Gardella & DelGiudice, 1983; Markey et al., 2013; Swayne et al., 2013).

MG'nin sıvı besiyeri kültürleri -30°C'da saklandığında 2 ila 4 yıl canlı kalabilmekte, +4°C'da saklanan liyofilize sıvı kültürlerinden en az yedi yıl boyunca canlı organizmalar çıkarılabilmektedir. 1965 yılından beri -60°C'da dondurulan MG sıvı kültürleri 20 yıldan fazla süre sonra bile subkültürler için canlı olarak bulunabilmişlerdir. MG, MS ve *M. meleagridis* (MM)'in liyofilize sıvı kültürlerinin 10-15 yıl sonraki subkültürlerinde çoğunlukla canlı olarak tespit edilebildikleri gösterilmiştir. MG canlılığı, suşa, dilüsyon oranına ve ortam ısısına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. *M. gallisepticum* F suşu, yağsız süt tozu, fosfatlı salin (PBS) besiyeri, triptoz fosfat besiyeri ve distile su içinde 4°C, 22°C ve 37°C'da saklanmış, 4°C ve 22°C'daki tüm dilüsyonlarında 24 saat boyunca stabil kalırken 37°C'da stabilitesini koruyamamıştır (Swayne 2013).

MG antijenik özellikleri sayesinde hem mikroorganizmanın tanısında hem de enfeksiyona karşı şekillenen bağışıklık yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Kleven 2008, World Organisation for Animal Health 2008, Swayne 2013). Mikoplazma mebranınin üçte ikisi proteinlerden oluşurken geriye kalanı lipitlerden oluşmaktadır. Membrandaki bu proteinler yüzey antijenini oluşturmakla birlikte konak hücreye adezyonda, kolonizasyonda, konak antikor yanıtından kaçışta, konak immun yanıtının düzenlenmesinde, hareket ve gıda transportunda rol almaktadır (Markey et al., 2013; Swayne et al., 2013). MG antijenlerinden özellikle immun yanıtta ve patogeneizde önemli role sahip adezin ve hemaglutinin ile ilgili daha çok çalışma bulunmaktadır. Adezinler konak epitel hücrelerine bağlanmayı ve kolonizasyonu sağlayan integral membran proteinidirler. Hücre yüzey proteinlerinden biri olan hemaglutinin kodlayan pMGA geni ve putative cytoadhesin-related proteini kodlayan pvpA geni kronik enfeksiyon oluşumunda ve konak immun sisteminden kaçışta önemli olan virülens özelliklerindendir (Swayne 2013).

1.1.5. Epidemiyoloji

Öncelikli olarak tavuksu kuşlarda görülen *M. gallisepticum* özellikle tavuk ve hindilerde enfeksiyon şekillendirmektedir (Swayne 2013). Amerika’da beslenen ispinoz (house finch)’ lar ve saka’ dan (Fischer et. al. 1997), kaz (Buntz and 1986) ve ördekten, sülün, keklik türleri, tavus kuşu, amazon papağanı gibi kuşlardan da izole edilmiştir (Swayne 2013).

MG vertikal (*in ovo* – transovarian) olarak bulaşabildiği gibi horizontal olarak taşıyıcı kanatlılardan duyarlı kanatlılara indirekt ve direkt temas ile bulaşabilmektedir. Subklinik ve klinik enfekte kuşlardan aerosol veya damlacık yoluyla bulaşabilen MG, üst solunum yolu veya konjonktivadan girer. Kontamine yem, su, insan veya kontamine hayvanla temas bulaşmada önemlidir. Transovarian bulaşma da söz konusudur (Nascimento et. al. 2005, Swayne 2013). Asıl bulaşma kaynağı enfekte anaçlar olsa da MG’ nin bir kümeste görülmesi için önemli risk faktörlerinden biri de yakındaki enfekte kümeslerdir (Kleven, 2008). Christensen et. al., (1994) ise MG nin farklı suşlarının farklı ortamlardaki canlılığını araştırdıkları çalışmada; plastik yüzeyde 24 saate, samanda 2 güne, kerestede 1 güne, tüylerde 2-4 güne, suda 2 güne, insan saçında 2-3 güne, insan burun mukozasında 4-24 saate, insan kulağında 4 saate kadar etkenin canlılığını koruyabildiğini ortaya koymuşlardır (Christensen et. al. 1994). Horizontal bulaşma; antikorun, etkenin kanatlılara inoküle olduktan sonra

serumda ilk belirlendiği latent evre (12-21 gün), popülasyonun %5-10'unda enfeksiyonun aşamalı olarak görülmeye başlandığı bir evre (1-21 gün), geri kalan popülasyonun %90-95 inde antikor yanıtının oluştuğu bir diğer evre (7-32 gün) ve kalan tüm popülasyonun serolojik olarak pozitif olduğu terminal evre (3-19 gün) olarak dört evrede değerlendirilir (Swayne et al., 2013).

1.1.6. Klinik Belirtiler

Tavuk ve hindilerde (özellikle genç kanatlılarda) akut solunum yolu hastalığına neden olan MG değişen şiddette klinik belirtilere neden olmaktadır. Hindiler MG'ye tavuklardan daha duyarlıdır ve daha ciddi klinik belirtiler oluşmaktadır. MG enfeksiyonunda en karakteristik bulgular trakeal sesler, hırıltılı solunum, göz ve burun akıntısı, konjonktivit, öksürük, yem alımında azalma, yumurta veriminde azalma, mortalitede artış olarak bildirilmektedir (Fischer et. al. 1997; Nascimento et. al. 2005; Swayne 2013). MG enfeksiyonunun şiddeti, Newcastle virüsü gibi solunum sistemi virüsleriyle ve *Escherichia coli* gibi sekonder enfeksiyonlarla artmaktadır (Kleven, 2008, World Organisation for Animal Health 2008; Swayne 2013).

1.1.7. Morbidite ve Mortalite

Hastalık klinik belirti göstermeyen taşıyıcı kanatlılardan ciddi solunum sistemi hastalık belirtileri gösteren kanatlılara kadar değişen seyir göstermektedir. Enfeksiyonun klinik tablosu diğer patojenlerin varlığı ile daha ciddi olmaktadır. Ayrıca hastalık tablosu soğuk hava, yetersiz veya kötü beslenme, kalabalık ortam gibi kötü işletme ve yönetim faktörlerinden ve MG suşundan da olumsuz etkilenmektedir. Komplike olmayan enfeksiyonlarda morbidite yüksek mortalite düşüktür. Salgınların görüldüğü dönemlerde yumurta verimi %10-20 oranında düşmektedir. Hindiler ve oyun kuşlarında hastalık daha ciddi seyredebilir.

1.1.8. Patogenezi

Doğada nemli mukozal yüzeylerde yaşama eğilimi olan obligat parazit Mikoplazmalar, çeşitli sistemlerde enfeksiyon görülmesine neden olabilirler. Vertikal bulaşma dışında MG enfeksiyonunun vücuda giriş yeri solunum sistemi mukozası ve konjonktivadır. Etkenin vücuda girdikten sonra kolonize olması ve enfeksiyon oluşturması için konak hücrelerine bağlanması gerekmektedir (Gyles et. al. 2008, Swayne 2013). Konak hücre ile ilk olarak sitaderenz GapA proteini ve aksesuar

proteini CrmA adezinleri aracılığıyla etkileşime giren (Gyles et. al. 2008, Swayne 2013) MG aynı zamanda bir multi gen ailesi olan vlhA ailesinin kodladığı lipoproteinler sayesinde antijenik yapı değişikliği oluşturarak antijenik çeşitlilik sağlar ve immün sistemden kaçabilir (Gyles et. al. 2008).

1.2. MG Tanı

Ülkemizde mikoplazma izleme programı, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığınca hazırlanan ve 16.01.2014 tarihinde 28884 sayılı Resmî Gazetede yayımlanan Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği'ne göre düzenlenmektedir. Bu yönetmeliğe göre damızlık sürülerin MG ve Ms varlığı yönünden negatif olması gerekmektedir. MG ile enfekte damızlık sürülerden elde edilen yumurta ve civcivler hastalığın nesilden nesile aktarılmasına sebep olur (Kleven, 2008). Sürülerde MG ve Ms varlığı; çabuk serum aglütinasyon, serum plak dilüsyon ve tüp aglütinasyon tarama testleri kullanarak araştırılır, hemaglütinasyon inhibisyon (HI) ve enzim linked immunosorbent assay (ELISA) testi ile doğrulanır (T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2007a). Mikoplazma infeksiyonlarının tanısında altın standart izolasyon ve identifikasyondur (Kleven, 2008). ELISA ve HI ile pozitif çıkan sürüler bakteriyolojik olarak ya da PCR ile doğrulanmalıdır (World Organisation for Animal Health, 2008).

Kanatlı damızlığı yetiştiren işletmelerin *M.gallisepticum*, *M.synoviae* ve *M.meleagridis* bakımından kontrolleri amacıyla serolojik testlerden ve bakteriyolojik muayenelerden (etken izolasyon ve identifikasyonu) yararlanır.

Sürüde MG, MS için serolojik testler pozitif ise, reaktörlerde solunum yolu hastalığının aktif hava lezyonları, sinusitis sinovitis veya diğer klinik belirtiler ile birlikte mikoplazmanın bakteriyolojik izolasyonu veya PCR ile teşhisi yapılır.

Eğer serolojik testler negatifse, sürü negatiftir. Eğer sürüde mikoplazma, bakteriyolojik olarak izole edilirse veya PCR ile identifiye edilirse sürü enfektedir. Sürüde klinik belirtiler varsa veya serolojik testler pozitif ise sürü şüpheli kabul edilir ve son karar kültür ya da PCR'ye göre verilir (T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2007a).

1.2.1. Kùltür

Ülkemizde, kanatlılarda mikoplazma infeksiyonları (Avian mycoplasmosis)'na neden olan etkenlerin izolasyon ve identifikasyonu için T.C. Gıda Tarım Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2007 de yayınlanan "Teşhiste Metot Birliği Kitabı" rehber olarak kullanılmaktadır. MG izolasyonu için uygun örnek canlı kanatlılarda chonal kleft, orofarinks, özofagus, trakea, göz, kloaka ve fallus svabları; ölü kanatlılarda ise burun boşluğu, infraorbital sinus, trakea ve hava kesesi svabları ile infraorbital sinuslerden alınabilir (T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2007b; World Organisation for Animal Health, 2008).

İzolasyon için alınan örnekler mümkün olan en kısa sürede laboratuvara gönderilmeli ve incelenmelidir. Kanatlı Mikoplazmalarının laboratuvarında üretilmesinde temel prensip besi yerinde mikroorganizma için esas gerekli besin maddelerinin bulunması ve inhibitör ya da öldürücü olabilecek bileşenler (düşük nem, uygun olmayan ozmotik basınç, yüzey aktif ajanlar, ağır metal tuzları ve diğer toksik maddeler gibi) den uzak durulmasıdır (Whithear, n.d.). İzolasyon için iyi kalite pepton içeren ve mineral tuzları da içinde bulunduran temel besi yerine ilave olarak kolesterol ve esansiyel yağ asitleri kaynağı olarak %10-15 serum (domuz, at, tavuk, fetal sığır serumu gibi), maya, DNA, bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacıyla 1 MG/ml geniş spektrumlu bir penicillin (amoxycillin), %0,01 thallos acetat ve miselyal mantar üremesi varsa Actidione eklenebilir (Whithear, 1996). Transport gerekliyse alınan doku örnekleri Mikoplazma sıvı besi yerine konmalı, alınan svaplar ise 1-2 ml. Mikoplazma sıvı besi yerinde kuvvetli bir şekilde çalkalanıp çıkarılmalıdır ya da Mikoplazma sıvı besiyerine batırıldıktan sonra örnek alınabilir (World Organisation for Animal Health, 2008). Bununla birlikte svablar aşağıda formülü verilen Mikoplazma transport besiyerine transfer edilebilir (Markey et. al., 2013).

Mikoplazma Transport Besiyeri:

- PPLO broth (Difco) 16,8 g
- Distile su 800,0 mL
- At serumu 200,0 mL
- 50% maya ekstraktı 10,0 mL
- DNA (Sigma) 0,02 g
- Penicillin 2000 ünite/mL medium

- Thallium acetate 1:100.000

T.C. Gıda Tarım Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2007 de yayınlanan “Teşhiste Metot Birliği Kitabı” nda Mikoplazma izolasyonunda kullanılan besi yeri ve hazırlanışı aşağıdaki şekilde verilmiştir.

Mikoplazma Broth Medium (Frey's):

Otoklavlanacak kısım:

- Deiyonize su 850/815 ml
- Mycoplasma Broth Base (Frey's) 22,5 g
- Glucose 1,5 g
- Phenol red (%1) 2,5 ml

Karıştırılıp pH 7,8'e ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır soğuduktan sonra aşağıdaki steril

- bileşenler aseptik olarak ilave edilir.
- Thallium acetate (%0,05) 5 ml
- Penisilin G (200.000 IU/ml) 2,5 ml
- Domuz serumu 120/150 ml
- β NAD %1 10/12,5 ml
- DL cystein hydrochlorid %1 10/12,5 ml

Mycoplasma Agar Medium (Frey's)

Otoklavlanacak kısım:

- Deiyonize su 850/845 ml
- Mycoplasma Broth Base (Frey's) 22,5 g
- Purified agar 12 g
- Glucose 1,5 g

Karıştırılıp pH 7,8'e ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. 45-56°C'ye kadar soğuduktan sonra aşağıdaki steril bileşenler aseptik olarak ilave edilir.

- Thallium acetate (%0,005) 2 ml
- Domuz serumu 150 ml
- Penisilin G (200.000 IU/ml) 2 ml
- β NAD %1 10/12,5 ml
- DL cystein hydrochlorid %1 10/12,5 ml

Laboratuvara uygun koşullarda gönderilen doku örnekleri dokuya yapılan kesit yüzeyleri agara sürölerek ekim yapılabilirdiği gibi doku parçaları bir homojenizatör yardımıyla ya da havanda steril kum ve sıvı besiyeri ile ezildikten sonra da ekim yapılabilir. İlk izolasyonda doku antijenleri, toksinler ya da antikorların varlığı üremeyi engelleyebileceğinden 24 saat bekledikten sonra ekim yapılabilir veya inokulumun 10^{-3} 'e kadar dilüsyonları yapılıp her dilüsyondan %10 oranında sıvı besi yerine ekilebilir. Sıvı besiyeri içindeki svablar vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra sıvı kısımdan direkt olarak katı ve sıvı besi yerine ekilir. Örneklerin 10^{-3} 'e kadar dilüsyonları yapılıp tüm dilüsyonlardan ekim yapılmalıdır. Katı besi yerine ise 1 damla (yaklaşık 25 μ l) damlatma suretiyle ekim yapılır (T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2007b). Ekim yapılan besi yerleri nemli ve %5-10 karbondioksitli ortamda 37°C'de inkubasyona kaldırılır. Katı besi yerleri üçüncü günden itibaren hergün, sıvı besi yerleri ise renk değişimi yönünden hergün gözlemlenir. İnkubasyona 21 gün devam edilmesi ve üremenin olmadığı takdirde 7 gün sonra üç kere kör pasaj yapılması önerilmektedir.

1.2.2. Seroloji

Mikoplazma, kültürünün yapılmasının zorluğu ve yavaş üremesi nedeniyle laboratuvar şartlarında güçlükle üretilebilir. Ayrıca diğer mikroorganizmalar ya da hızlı üreyen mikoplazmalar tarafından üremenin maskelenmesi mikoplazmaların izolasyonunu daha güç hale getirmektedir (Kempf, 1998). Çabuk serum aglütinasyon, tüp aglütinasyon, hemaglütinasyon inhibisyon ve ELISA gibi serolojik testler MG yönünden kümeslerin denetlenmesinde kullanışlı olmasına rağmen yanlış pozitiflik, düşük özgülük ve özgülükleri nedeniyle yeterli olmamaktadır (Carli vd., 2003; Kleven, 2008; Kahya vd., 2015).

1.2.2.1. Çabuk Serum Aglütinasyon Testi

Serumlar, kümesin bir örneğinden toplanır ve eğer hemen test edilmeyecek ise 4°C’de depolanır ve dondurulmaz. Test, serumlar toplandıktan 72 saat sonra oda sıcaklığında (20-25°C) yapılmalı ve reaktifler oda sıcaklığında olmalıdır. İlk santrifüj, özgül olmayan reaksiyonları azaltacaktır. HSA antijenler ticari olarak mevcuttur ancak farklı üreticilerden ve partiden partiye özgüllük ve hassasiyet açısından farklılık gösterebilir ve üreticinin talimatlarına göre saklanmalıdır. Uygun HSA boyalı antijenler, kültür yöntemleri kullanılarak “in-house” olarak da hazırlanabilir ve ardından kristal violet boyası ile boyanır (OIE Terrestrial Manual 2018).

1.2.2.1.1. Çabuk Serum Aglütinasyon Test Prosedürü

Temiz beyaz bir karo veya cam tabağa bir hacim serumu ve ardından bir hacim boyalı MG veya MS antijeni damlatılmalıdır. Antijen eklenmeden önce serumun kurumamasına dikkat edilmelidir. Doğru miktarda antijeni süspansiyonda tutmak için kullanım sırasında antijen şişesini kuvvetlice ve sık sık sallamak önemlidir. Karışımı yaklaşık 1,5 cm çapında dairesel bir alana yaymak için bir karıştırma çubuğu kullanın. Aglütinasyon, antijenin 2 dakika içinde topaklaşması ile gösterilir. Testte bilinen pozitif ve negatif kontrolleri dahil edilmelidir. Serumlar, 56°C’de 30 dakika ısıtıldıktan sonra aglütine olan herhangi bir serumun seri dilüsyonlarını tekrar test edilmelidir ancak hala güçlü tepki veriyorlarsa, seyreltme konusunda pozitif olarak kabul edilir (1/4 veya daha fazla) (OIE Terrestrial Manual 2018; Allan and Gough, 1974).

1.2.2.2. Hemaglütinasyon İnhibisyon Testi

MG ve MS kanatlı eritrositlerini hemaglütine edebilme yeteneğine sahiptir ve serumdaki spesifik antikorlar inhibisyona sebep olurlar. İyi gelişen ve güvenilir bir şekilde aglütine olan bir suş seçilir. HI testi, tatmin edici bir hemaglütinasyon MG ve MS antijeni, yıkanmış taze tavuk veya hindi eritrositleri ve test serumu gerektirir. Antijen, taze bir et suyu kültürü veya peptonlu tamponlu sıvıda mikoplazma hücrelerinin yıkanmış yoğun bir süspansiyonu olabilir. Yüksek titreli broth kültür antijeni tedarikini sürdürmek zor olabilir ancak konsantre antijen (genellikle %25-50 gliserol içeren ve -70°C’de depolanan) kullanımı, spesifik olmayan reaksiyonların olasılığını artırır. HI testi iyi bilinen prosedürleri takip eder (Allan et. al., 1974). Antijenin HA titresi ilk olarak iki kat seyreltmelerde belirlenir, HA birimi, kullanılan test sisteminde tam HA veren en az antijen miktarı olarak tanımlanır. HI testi,

aşağıdaki yöntem ile 4 HA birimi kullanılarak veya bilinen pozitif serumlar ile yapılan testler ile belirlenen eşdeğer duyarlılığa sahip bir yöntem ile yapılmalıdır. Tüm HA titrasyonları ve HI testleri en iyi, V şekilli kuyucuklara sahip çok kuyucuklu plastik plakalarda ve 50 mikrolitrelik sabit hacimlerde gerçekleştirilir. Bir pozitif ve bir negatif kontrol serumu her teste dahil edilmiştir. Test edilen her bir serum için bir sıra sekiz kuyucuk gereklidir (OIE Terrestrial Manual 2018).

1.2.2.2.1. Hemaglütinasyon İnhibisyon Test Prosedürü

Pleytteki her sıranın ilk kuyucuğuna 50 mikrolitre PBS eklenir. Her sıradaki ikinci kuyucuğa 50 mikrolitre hacimde 8 HA birim antijen eklenir ve 3 ile 8. Sıradaki kuyucuklara 50 mikrolitre 4 HA birimi antijen eklenir. Test edilen serumun önceden hazırlanmış 1/5 dilüsyonundan 50 mikrolitre'yi birinci kuyucuğa eklenir, karıştırın ve 50 mikrolitre'yi ikinci kuyucuğa aktarın ve bu şekilde son kuyucuktan 50 mikrolitre atılır. İlk kuyucuk, serum kontrol kuyucuğudur. Antijen kontrolü için 6 kuyucuk gereklidir. İkinciden altıncı(dahil) kuyucuklara 50 mikrolitre PBS eklenir ve kuyucuk 1 ve 2'ye 8 HA birimi antijen 50 mikrolitre eklenir. İkinci kuyucuğun içeriği karıştırılır ve 50 mikrolitre 3. Kuyucuğa aktarılır, karıştırılır ve 6. Kuyucuğa kadar tekrarlanır ve 50 mikrolitre atılır. Eritrosit kontrolü için iki kuyucuk gereklidir. Bunların her birine 50 mikrolitre PBS eklenir. Tüm kuyucuklara eritrositin %0,5 'lik süspansiyonundan 50 mikrolitre eklenir. Kuyucuk içeriğinin iyice karışmasını sağlamak için plakayı hafifçe sallanır ve oda sıcaklığında yaklaşık 50 dakika bekledikten sonra veya antijen titrasyonu 4 HA birimi iken okunur. Okumak için, plaka eğilmelidir ve yalnızca eritrosit akışının, eritrosit kontrol kuyucuklarındakilerle aynı anda inhibe olduğu düşünülmelidir. Serum kontrolü net bir eritrosit düğmesi göstermeli ve pozitif ve negatif kontroller beklendiği gibi tepki vermelidir. HI titresi, HA'nın tam inhibisyonunu sergileyen en yüksek serum seyreltmesidir. Spesifik olmayan HA veren serumlar, spesifik olmayan tüm zararlı aglütininleri gidermek için adsorbe edilmelidir, böylece kontrol kuyucuğunda HA antijeni olmadan net bir düğme elde edilir. Adsorpsiyon, 1 ml serum seyreltisinin 6-8 damla paketlenmiş yıkanmış tavuk veya hindi eritrositleri ile inkübe edilmesiyle gerçekleştirilir. Eritrositler, 37°C'de 10 dakika inkubasyondan sonra uzaklaştırılır ve süpernatant, hemaglütinin aktivitesi için test edilir (OIE Terrestrial Manual 2018).

1.2.2.3. Enzim ile İşaretli İmmunosorbent Testi (ELISA)

Birkaç ticari MG ve MS antikoru ELISA kiti pazarlanmaktadır. Sensitivite, üreticinin pozitif ve şüpheli reaksiyonlar için “cut-off” seviyelerine yönelik önerileriyle bir dereceye kadar belirlenir. MG ve MS arasında iyi bilinen çapraz reaksiyonu önlemek için bazen sensitivite azaltılabilir. Bir ELISA, MG’nin 56 kDa polipeptidi üzerindeki bir epitopu tanıyan bir mAb kullanır (Czifra, Sundquist, Tuboly and Stipkovits, 1993). Bu sistemde ELISA plakaları tam hücre MG antijeni ile kaplanır ve test edilen serumlar geleneksel mAb’da olduğu gibi eklenir. Benzer bir ELISA da MS için pazarlandı. Bir avantaj ise sistemin herhangi bir kanatlı türünden serumlar için adaptasyon olmaksızın kullanılmasıdır (OIE Terrestrial Manual 2018).

1.2.3. Moleküler Metodlar ile Tanı

1.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Patojenik mikoplazmaların, alınan uygun örneklerden DNA’larının amplifiye edilmesi için kullanılan moleküler yöntemler enfeksiyonun belirlenmesinde kullanılmaktadır (Kempf, 1998; Lauerman et al., 1993; World Organisation for Animal Health, 2008). DNA amplifikasyon yöntemlerinde; doğru örnek alınmasına, DNA ekstraksiyonuna uygun hedef bölgenin seçilmesine ve amplifikasyon inhibitörlerine dikkat edilmesi gerekir (Kempf, 1998). PCR enfekte sürülerin belirlenmesinde hızlı aynı zamanda yüksek spesifite ve sensitiviteye sahiptir. Buna rağmen, alınan örneklerdeki PCR inhibitör maddelerinin varlığı, çevresel kontaminasyon riski ve cansız mikoplazmaların da belirlenebilmesine olanak vermesi nedeniyle PCR’nin konvansiyonel yöntemlerin yerini alamayacağı bildirilmiştir (Kempf, 1998). MG ve Ms nükleik asitlerinin amplifikasyonu için PCR ve real-time Polymerase Chain Reaction (rPCR) yöntemleri kullanılmaktadır (Carli vd., 2003; Kempf, 1998; Kahya vd., 2015). Klinik örneklerden MG ve MS’i belirlemede dubleks ve multiplex rPCR da yapılmaktadır (Fraga et. al. 2013; Huang et. al., 2015). Dakman ve arkadaşları 2009 yılında çeşitli illerdeki damızlık sürülerde PCR ve etken izolasyonunu karşılaştırdıkları bir çalışma yürütmüştür. Çalışmada işletmelerden alınan kan serumu örnekleri *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* yönünden serum pleyt aglutinasyon test (SPAT) ve ELISA ile test edildikten sonra, seroloji ile *M. synoviae* yönünden incelenmiştir. MS pozitif bulunan damızlık işletmelerden alınan trakeal svap örnekleri PCR ile incelenmiş ve etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. İşletmelerin

tamamı MG yönünden negatif bulunurken %8,5'i SPAT, ELISA ve PCR ile MS pozitif bulunmuş ayrıca %2,5'inden etken izolasyonu yapılmıştır. Bu çalışmadan PCR sonuçlarının etken izolasyonu ile desteklenmesi gerektiği sonucu çıkmaktadır.

Kahya ve ark. (2014), 77 damızlık kümeden aldıkları trakea ve kan örneklerinden 16s RNA' yı hedef alan Real Time Polymerease Chain Reaction (rPCR) ve ELISA ile MG ve MS araştırdıkları çalışmada, 28 kümesin %100'ü MG ELISA ile pozitif çıkarken MG rPCR ile negatif bulunmuştur. Diğer 49 kümesin %87,8'i MG seropozitif çıkarken, MG-rPCR ile %42,9'u pozitif bulunmuştur. Ayrıca, ilk 28 kümeden seçilen 5 kümes ve 49 kümeden seçilen 27 kümes rPCR ile Ms varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Yapılan çalışmada ELISA'nın önemli ölçüde yanlış pozitif sonuç verdiği ve tek tip teste dayalı sonucun teşhis için yeterli olmadığı ayrıca mikoplazma enfekte kümeslerin laboratuvar doğrulamalarının uygun primerlerin seçilerek uygulandığı rPCR ile yapılmasının güvenilir bir yöntem olduğu sonucu ortaya konmuştur.

Nükleik asidin amplifiye edilmesi için kullanılan moleküler yöntemler, konvansiyonel kültür metoduyla desteklenmesi gerekse de, enfekte sürülerin özgünlüğü ve özgüllüğü yüksek ve hızlı bir şekilde belirlenmesine olanak vermesi açısından avantajlı olmaktadır (Carli vd., 2003). PCR teknolojisi örnekten nükleik asidin ekstraksiyonu, genin amplifikasyonu ve belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu aşamalarda pahalı cihazlar ve uygun tesis gerektirmesi bu yöntemin herhangi bir yerde uygulanmasını güçleştirmektedir (Notomi et. al., 2015).

1.2.3.2. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Konvansiyonel kültür metoduna alternatif olarak kullanılan DNA amplifikasyon metodlarından biri Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) yöntemidir. Kaynakların yetersiz olduğu ya da yüksek maliyetli ekipmanların kullanılmasının mümkün olmadığı durumlarda, MG ve MS infeksiyonunu daha düşük maliyetli, basit ve hızlı yöntemlerle belirlemek önem kazanmaktadır (Zhang et al., 2015). LAMP ilk olarak 2000 yılında Notomi ve ark. (2000) tarafından geliştirilen yeni bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Bu yöntem Nagamine ve ark. (2002) tarafından loop primerlerinin eklenmesiyle geliştirilmiş, bu sayede reaksiyon hızının ve hassasiyetinin artması sağlanmıştır. LAMP yönteminin izotermal koşullarda gerçekleşmesi ve thermal cycler gibi pahalı cihazlara gereksinim duyulmaması bunun yerine kuru ısı bloğunun yeterli olması, oluşan son ürünün çıplak gözle görülebilmesi ve

değerlendirilebilmesi nedeniyle kaynakları kısıtlı laboratuvarlar için infeksiyonların belirlenmesinde uygun bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Atanur vd., 2010; Notomi et. al., 2000, Mori et. al., 2001; Nagamine et. al., 2002a; Tang et. al., 2011; Notomoi et. al., 2015; Zhang et.al., 2015).

İzotermal koşullarda (60-65°C), sabit ısıda gerçekleşen LAMP reaksiyonu için hedef bölgeye özgü 2 adet iç (forward ve backward) ve iki adet dış (forward ve backward) primer kullanılmaktadır (Notomi et. al., 2000, Notomi et.al., 2015). Bununla birlikte reaksiyona 2 adet loop primerinin eklenmesiyle reaksiyon hızının yarım saatten az bir zamana indiği bildirilmiştir. Bu metodun en önemli özelliklerinden biri çift iplikçikli DNA'nın denatürasyonu aşamasına ihtiyaç duyulmamasıdır (Notomi et. al., 2000; Nagamine et. al., 2002b). Amplifikasyon için zincir yer değiştirme özeliği olan DNA polimeraz kullanılmaktadır. Reaksiyona reverse transkriptaz eklenerek RNA amplifikasyonu da mümkün olmaktadır (Parida et. al., 2004; Notomi et. al., 2015; Rudolph et. al., 2015). Reaksiyon sabit ısıda “loop” ların oluşması ve “loop” bölgelerdeki uzamaların tekrarlanması ile döngüsel amplifikasyon şeklinde ilerler (Notomi et. al., 2015). Reaksiyonda zincir yer değiştirme özelliği olan bir polimeraz kullanılmaktadır. Bunun için *Bacillus stearothermophilus* dan ya da *Bacillus smithii* den elde edilen polimerazlar (Bst ya da Bsm Polimeraz) kullanılmaktadır (Notomi et. al., 2000; Nagamine et. al., 2002a).

LAMP Primerleri tasarlanırken şunlara dikkat edilmektedir:

1. DNA'da hedef bölgenin her iki ucunda 24-24 nükleotidlik sekanslar F2c ve B2 olarak belirlenir.
2. İki adet inner sekansı oluşturmak üzere F2c ve B2 uçlarından 40 nükleotid uzaklıkta 17-21 nükleotidlik sekans F1c ve B1 olarak belirlenir.
3. F2c ve B2 sekanslarının dış kısmı F3c ve B3 olarak işaretlenir.

FIP ve BIP tasarlanır.

4. FIP; F1c, bir adet TTTT spacer'ı ve F2c nin komplementeri olan F2 den oluşur.
5. BIP; B1c komplementeri olan B1, bir adet TTTT spacer'ı ve B2 sekansından oluşur.
6. İki outer primer ise B3 ve F3c sekanslarından oluşur.

1.2.3.2.1. Lamp Reaksiyonu

LAMP Reaksiyonu temel olarak üç adımda tamamlanır:

1. Başlangıç Materyalinin Oluşturulması:

a. Çift iplikçikli DNA yaklaşık 65°C’de dinamik dengede olduğundan primerlerden biri hedefine bağlanarak reaksiyonu başlatır. İner primer FIP, hedef DNA’daki F2c ile bağlanır ve komplementer zincirin sentezi başlar.

b. Reaksiyona daha az konsantrasyonda eklenen ve FIP den daha az sayıda baz içeren outer primer F3, yavaş bir şekilde hedef DNA’daki F3c’ye bağlanır. DNA, zincir yer değiştirme özelliği olan polimeraz sayesinde, yeni zincir sentezi başlar. FIP ile işaretli komplementer zincirin ayrılmasıyla ve loop oluşturmasıyla zincir yer değiştirerek senteze başlar.

Bu tek zincirli DNA, BIP in başlattığı DNA sentezi için kalıp olur.

c. Sonra B3 ile başlayan ve zincir yer değiştirme şeklinde gerçekleşen DNA sentezi, DNA’nın halter benzeri bir şekle dönüşmesine neden olur.

d. Bu yapı ilmeklerden köken alan döngüsel DNA amplifikasyonunun başlangıç materyalini oluşturan stem-loop DNA’ ları oluşturmaktadır.

2. Döngüsel Amplifikasyon:

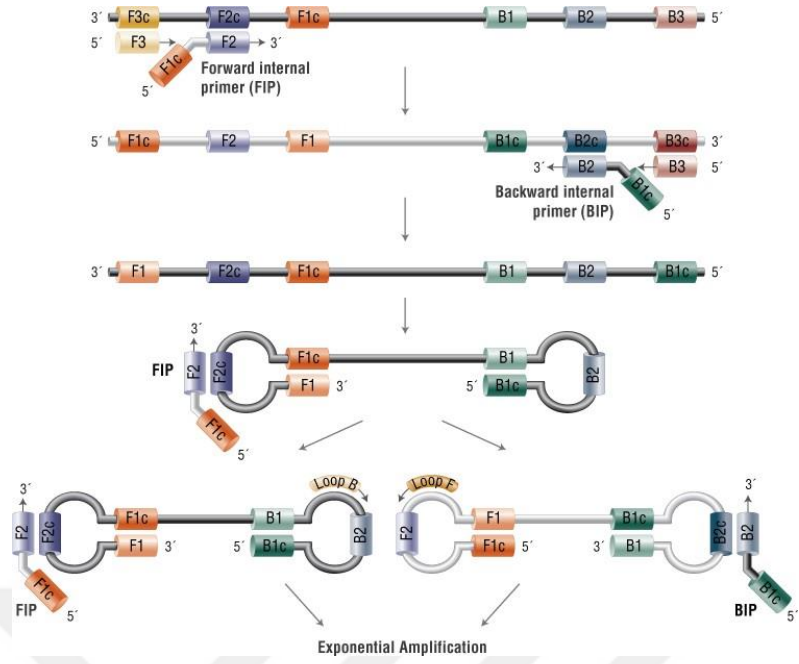
a. FIP ve BIP sekansı, stem-loop DNA’lara bağlanır ve tekrar zincirde yer değiştirme özelliği olan DNA sentezini başlatır.

b. Her iki uçta oluşan aralıkta hedef DNA’nın ters bir kopyası oluşur.

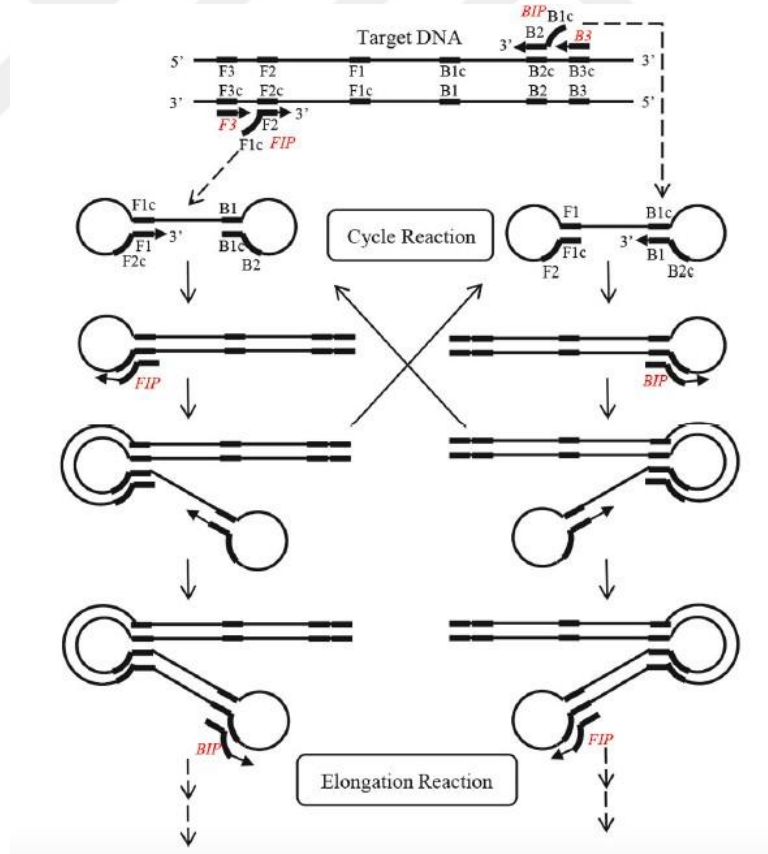
c. Uçlarda kendiliğinden başlayan ve zincir kayması ile oluşan stem-loop DNA’nın orjinal kopyaları oluşur.

3. Elongasyon:

a. Oluşan ürünler (stem-loop DNA’lar) elongasyon ve yeniden reaksiyona girmek için kullanılır.



Şekil 1. 4. LAMP Reaksiyonu (New England Biolabs, n.d.)

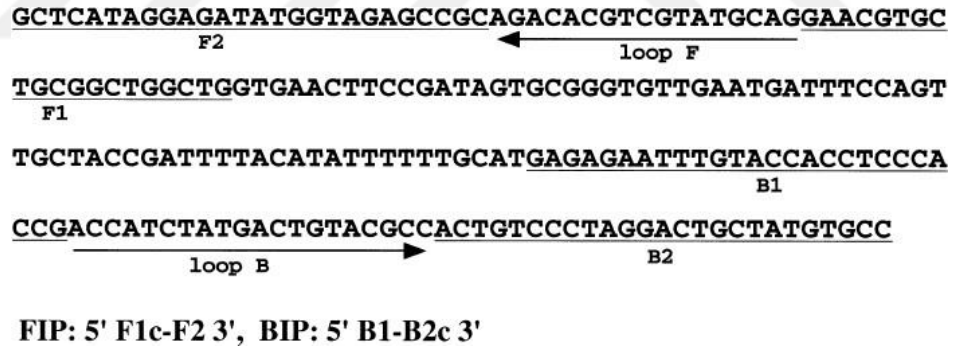


Şekil 1. 5. LAMP Reaksiyonu (Notomi et al., 2015)

Kısaca özetlenecek olursa; ilk aşama, başlangıç materyali olarak DNA' nın her iki ucunda da stem loop DNA yapısının oluşmasıdır. Reaksiyonun başlangıcında iç ve dış primerler kullanılırken döngüsel amplifikasyon başladığında sadece iç primerler (forward inner primer ve backward inner primer) kullanılır (Notomi et al., 2000). Daha sonra uzama ve annealing ile reaksiyon biter (Şekil 1.4).

LAMP reaksiyonunda DNA'daki hedef bölge, her bir yarım döngüde üç kat artar. Son ürün değişik büyüklüklerdeki stem-loop DNA'ların bir karışımından ve loop'lerden oluşur. Çok sayıda bulunan loop' lar ile hedef sekansın ters tekrarları ile annealing gerçekleşir (Şekil 1.5) (Atanur, 2010; Notomi et al., 2000).

2002 yılında Nagamine ve ark. (2002) tarafından, iki adet ilave loop primeri kullanıldığında reaksiyon süresinin kısaldığı gösterilmiştir. Böylece toplam 6 adet primer hedef DNA'da 8 bölgeye bağlanmakta ve reaksiyonun spesifitesi artmaktadır (Nagamine et al., 2002b). Hepatit B virüsü (HBV)'nün yüzey antijenini kodlayan gen (HBs) bölgesini loop primerleri ekleyerek LAMP ile amplifiye ettikleri çalışmada loop primerlerine ait sekanslar aşağıda gösterilmektedir (Şekil 1.6) (Nagamine et. al., 2002).



Şekil 1. 6. Loop Primerlerine ait sekanslar (Nagamine ve ark., 2002).

1.2.3.2.2. LAMP Reaksiyonunun Sonuçlarının Değerlendirilmesi

1.2.3.2.2.1. Bulanıklığın Belirlenmesi

Lamp reaksiyonu sonucu çok miktarda DNA sentezlenir, 1 saatlik reaksiyon sonunda yaklaşık 10^9 kopya oluşur. DNA polimerize olduğunda reaksiyona katılan dNTP' den pirofosfat açığa çıkar (I). Açığa çıkan pirofosfat MG iyonu ile birleşir ve reaksiyon buffer ında beyaz presipitat olarak görülen MG-pirofosfat oluşur (II). Açığa çıkan DNA miktarı ile presipitat yoğunluğu doğru orantılıdır (Şekil 1.7) (Mori et al., 2001).



Turbidity and DNA Yield in the LAMP Reaction Mixture after 60 min Reaction at 65°C				
Amplification method	Template DNA	Starting amount of template DNA (copies)	Turbidity	[DNA] (µg/25 µl)
LAMP	PSA	6000	1.256	11.2
		0	0.001	0.0
	λDNA	6000	1.245	10.9
		0	0.000	0.0
PCR	PSA	6000	0.000	0.2
		0	0.002	0.0

Şekil 1. 7. PSA: prostat-spesifik antijen, λDNA: Ticari DNA Ultrospec 2000 spektrofotometre (Pharmacia Biotech), 400 nm dalga boyu ile yapılan bulanıklık ölçümü (Mori ve ark., 2001)

Mori ve ark., (2001) yaptıkları bir çalışmada LAMP reaksiyonu sonucu şekillenen presipitatın kimyasal ve spektroskopik olarak incelenmesi sonucu, Magnezyum-pirofosfattan oluştuğu sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmaya göre LAMP reaksiyonu sonucu oluşan presipitatın hidroklorik asit ile çözülmesinden sonra titan yellow ile muamelesi sonucu rengin sarıdan kırmızıya dönüşmesi, presipitatta MG iyon varlığını göstermektedir.

LAMP amplifikasyon ürünlerinin direkt görsel olarak veya gerçek zamanlı olarak bir türbiditemetre kullanılarak bulanıklığın ölçülmesiyle tespit edilmesi mümkün olmaktadır (Mori, Kitao, Tomita, & Notomi, 2004; Mori et al., 2001). Buna rağmen pirofosfat iyonunun çeşitli metal iyonlarla çözülmeyen tuzlar meydana getirmesi sonucu oluşan bulanıklığın gözle görülmesi esasına dayanan bu yöntemde reaksiyon için pozitif ya da negatif yönünde karar vermenin güç olabildiği bildirilmiştir (Tomita, Mori, Kanda, & Notomi, 2008a). LAMP ile çok kanallı mikroakışkan çiplerin entegre edildiği ve reaksiyonun bulanıklık ile belirlendiği sistemler de bulunmaktadır (Şekil 1.8) (Huang et.al., 2017).

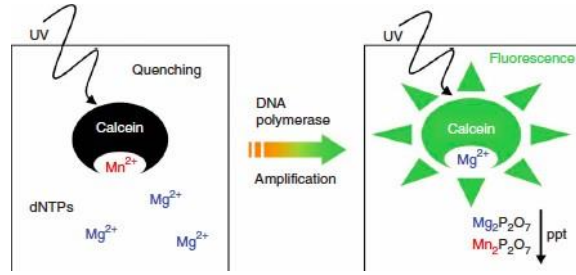


Şekil 1. 8. Bulanık belirlenmesi (Huang ve ark., 2017)

1.2.3.2.2. Metal İyon Konsantrasyonundaki Değişimin Belirlenmesi

Reaksiyon solüsyonundaki metal iyon konsantrasyonundaki değişimin belirlenmesi için gravimetrik metot (ayraçların çöktürülmesi), titrasyon metodu ve kolorimetrik metot olarak birkaç yöntem bulunmaktadır (Şekil 1.9). En yaygın kullanılan kolorimetrik metot reaksiyona katılan metal indikatörlerin parlamalarının veya renk değişiminin tespiti esasına dayanır (Tomita et. al., 2008). Kalsein ve Hydroxy naphthol blue (HNB), LAMP reaksiyonuna engel olmaksızın amplifikasyon öncesi reaksiyona eklenen boyalardandır (Şekil 1.10).

Kalsein, Kalsiyum (Ca) ve Magnesium (Mg) gibi divalen metal iyonlarla kompleks oluşturarak güçlü floresan parlama veren bir metal indikatördür (Tomita, Mori, Kanda, & Notomi, 2008b), 2008). Reaksiyona, Manganez (Mn) ile eklenir. Kalseinin başlangıçta manganez iyonuna bağlanması herhangi bir reaksiyona girmesine engel olur. Amplifikasyon ilerledikçe kalsein Mn iyonundan ayrılır, Mn oluşan pirofosfatla çözünmeyen tuzlar oluşturmaya başlar. Kalsein serbest kaldıkça floresan ışığın emisyonu şekillenir. Serbest kalsein Mg ile bağlanmaya eğilimlidir ve MG ile kompleks oluşturarak floresan parlamasının belirlenebilir düzeyde olmasını sağlamaktadır. Amplifikasyon sonucu oluşan Mg-pirofosfat, karışımdaki Mg konsantrasyonunun düşmesine neden olarak belirgin bir floresan parlamasının olmasını engeller. Reaksiyona eklenen Mn, pirofosfatla çözünmeyen tuzlar oluşturarak, kalseinin ortamdaki Mg ile bağlanmasına olanak verir ve floresan parlama belirlenebilir düzeyde olur. Floresan parlama gün ışığında dahi gözlemlenebilir (Şekil 1.11) (Tomita et. al., 2008).



Şekil 1. 9. Metal iyon konsantrasyonundaki değişimin, floresan parlama veren bir metal indikatör (Kalsein) kullanılarak belirlenmesi (Tomita et al., 2008a).



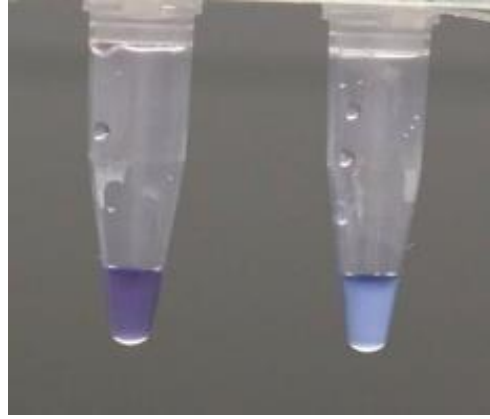
Şekil 1. 10. Kalsein kullanıldığında negatif (solda) ve pozitif (sağda) reaksiyonun bir el UV lambasıyla (dalga boyu: 365 nm.) belirlenmesi (Tomita et al., 2008a)



Şekil 1. 11. Kalsein kullanıldığında negatif (solda) ve pozitif (sağda) reaksiyonun gün ışığında belirlenmesi (Tomita et al., 2008a).

Yine farklı bir metal indikatörü olarak toprak alkali metali olan Hydroxy naphthol blue (HNB) kullanılmaktadır. HNB, alkali ortamda hem kalsiyum hem de magnezyum iyonlarının titrasyonu için uygun bir kolorimetrik indikatör olarak kullanılmaktadır

(Şekil 1.12) (Cardoso et al., 2010; Goto, Honda, Ogura, Nomoto, & Hanaki, 2009).



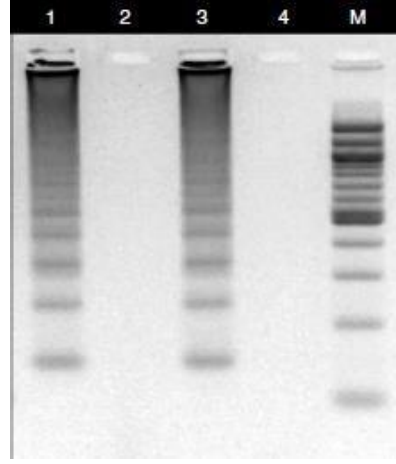
Şekil 1. 12. Hydroxy naphthol blue ile renk değişiminin belirlenmesi. Solda mor ve berrak tüp (negatif), sağda açık mavi ve bulanık (pozitif) (Britton, Cheng, Sutherland, & McCarthy, 2015)

1.2.3.2.2.3. DNA Boyaları ile Belirleme

Çift zincirli DNA' ya non-spesifik bağlanan floresan boyaların kullanımı, primer dimerlerine de bağlanabilmeleri ve yanlış pozitiflik verebilmelerine rağmen, ucuz olmaları ve renk değişimine bakarak sonuç elde edilmesine olanak vermeleri nedeniyle yaygındır. Bununla birlikte kullanılan boyaların reaksiyonu inhibe etmemeleri gerekmektedir (Safavieh et al., 2016). SYBR Green, picogreen, propidium iodide gibi DNA boyalarının tüplerin açılıp reaksiyona sonradan katılması nedeniyle ürünün kontaminasyon riski bulunmaktadır (Balne, Basu, Rath, Barik, & Sharma, 2015; Dukes, King, & Alexandersen, 2006; Hill et al., 2008; Njiru, 2012).

1.2.3.2.2.4. Elektroforez ile Belirleme

En çok kullanılan yöntemlerden biri olan elektroforez tekniğinde hem DNA hem de RNA ampikonların büyüklüklerine ve elektrik yüklerine göre ayrılarak UV ışık altında incelenebilmekte, (Notomi et al., 2000; Safavieh et al., 2016; Tomita et al., 2008a) restriksiyon enzimleri ve southern blot hibridizasyonu ile identifiye edilebilmektedir (Notomi et al., 2000). Hedef DNA içeren örneklerde amplifikasyon ürünleri elektroforez sonrası tipik merdiven benzeri bir yapı göstermektedir (Şekil 1.13) (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008a). Elektroforez sonrası görülen merdiven benzeri şeklin Mn^{2+} iyon konsantrasyonu ile ilgisi olmadığı bildirilmiştir (Tomita et al., 2008a).



Şekil 1. 13. Agaroz jel elektroforez görüntüsü (2,5%) (Tomita et al., 2008a).1. Hedef DNA, Mn²⁺ iyon konsantrasyonu 0 mM, 2. DNA yok, Mn²⁺ iyon konsantrasyonu 0 mM, 3. Hedef DNA ve Mn²⁺ iyon konsantrasyonu 0,5 mM, 4. DNA yok, Mn²⁺ iyon konsantrasyonu 0,5 mM M. Marker (100 bp)

1.2.3.2.2.5. İmmunreaksiyonlardan Yararlanarak Amplifikasyonun Belirlenmesi

İmmunokromatografik Kart Test (Lateral flow biyosensör - LFA) şerit yapıda, kapiller akım prensibine göre çalışan, üstü plastik kapak ile kapalı ve üstünde sadece numune damlatma alanı ile gözlem penceresi olan point of care (POC, hasta başı) testlerdir. Bu testlerin yapısında temel olarak numunenin damlatıldığı örnek pedi, kapiller akımın gerçekleştiği ve testin gerçekleştiği bir nitroselüloz membran, akımın durmasını ve fazla sıvının emilmesini sağlayan absorban ped bulunmaktadır (Bahadır & Sezgintürk, 2016; Zeng & Academy, 2013). Fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli DNA problemleri ile hibridize olan biotin ile işaretli LAMP ampliconlarının, anti FITC antikorları ile belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Safavieh et al., 2016). Kanatlı kaynaklı Influenza A (H7N9) virüsünün (Ge et al., 2013), *Mycobacterium tuberculosis* in (Kaewphinit et al., 2012), *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus*'un (Y. Wang et al., 2017) ve çeşitli hastalık etkenlerinin LFA-LAMP ile belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu tekniğin mikroakışkan platformlara entegre edilmesi çapraz kontaminasyonu engelleyerek önemli veri elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Safavieh et al., 2016).

İmmunreaksiyonlardan yararlanarak amplifikasyonun belirlenmesi için kullanılan sistemlerden bir diğeri ise LAMP ve ELISA (loop-mediated isothermal amplification-enzyme linked immunosorbent hybridization)'nın entegre edildiği metottur (Lee, Chen, & Peng, 2009; Safavieh et al., 2016). Bu metoda örnek olarak, Mei-Feng L. ve arkadaşlarının klinik örneklerden (balgam) canlı *M. tuberculosis* kompleks'in belirlenmesinde 16S rRNA'yı hedefledikleri reverse transkriptase LAMP ile ELISA'

yı kombine ettikleri çalışma verilebilir. Çalışmanın ELISA aşamasında biotin ile işaretli LAMP amplikonlarını hedef alan internal capture prob kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmada RT-LAMP' ın RT-PCR'a göre 100 kat, RT-LAMP-ELISA ise RT-PCR a göre 2000 kat daha hassas olduğu ortaya konmuştur (Lee et al., 2009).

1.2.3.2.2.6. Elektrokimyasal Belirleme

DNA, protein gibi biyomoleküllerin hatta tek gen mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılabilen elektrokimyasal biyosensörler LAMP amplikonlarının belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Ahmed et. al., 2008; Safavieh et. al., 2016). Elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörleri, DNA'yı sekans spesifik olarak tanıma ve sinyal iletimi prensibine dayanmaktadır. Hibridizasyon biyosensörleri, sinyal dönüştürücü bir yüzeye tek zincirli oligonükleotid problemlerinin yapıştırılarak hedef komplementer DNA sekansını tanınması ve elektrik sinyaline dönüştürülmesi ile ya da redoks aracılığı yapan moleküllerin amplikonlara bağlanması ile çalışır (J. Wang, 2006). elektrokimyasal biyosensörlerin mikroakışkan cihazlarla kombine edilerek LAMP reaksiyonu sonucu oluşan DNA amplikonlarının belirlenmesini sağlayan çalışmalar bulunmaktadır (Hsieh, Patterson, Ferguson, Plaxco, & Soh, 2012). Redoks aracılığı yapan ve DNA ya bağlanan Methylene Blue (MB) molekülünün LAMP amplikonlarına bağlanması esasına dayanan ve bir set elektrodun da kullanıldığı çalışmada, MB redoksunun devamlı ölçülmesi ile LAMP amplikonlarının konsantrasyonu eş zamanlı olarak ölçülmüştür (Hsieh et al., 2012).

1.2.3.2.2.7. Hidrojen İyon Konsantrasyonu (pH) 'na Duyarlı Platformlar Kullanılarak Belirlenmesi

Lamp Amplikonları, polimerizasyon reaksiyonu sırasında iyon salınımına bağlı olarak ortam pH'sındaki değişimin elektrokimyasal ya da elektirik sensörleri vasıtasıyla ölçülmesi ile de belirlenebilir (Safavieh et al., 2016).

Çin Halk Cumhuriyeti'nde 2015 yılında Zhang ve arkadaşlarının LAMP yöntemini MG için geliştirdikleri ve optimize ettikleri bir çalışmada, LAMP yöntemi PCR'ye göre 10 kat daha fazla duyarlı bulunmuştur. Aynı çalışmaya kanatlı işletmelerde önemli olan diğer bakteri ve virüsleri de katarak LAMP yönteminin spesifite çalışmaları yapılmış ve bu yöntemin hem sensitivitesinin hem de spesifitesinin yüksek olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

Kursa ve arkadaşları (2014) bilinen Ms suşlarını LAMP ile araştırdıkları çalışmada, LAMP'ın PCR'ye göre sensitivitesinin 1000 kat fazla olduğunu ortaya koymuşlardır. LAMP yöntemi MG ve Ms dışında *Salmonella* spp. (Tang et. al., 2012; Yang JL, 2010), *Campylobacter* spp. (Pham NT, 2015; Zhao X, 2010), *Mycobacterium bovis* BCG (Kouzaki Y, 2015), *E. coli* (Zhao X. 2010), *Listeria monocytogenes* (Wang D. 2015) gibi bakteriyel, West Nile Virus (Parida M. 2004), Mavdil virüsü (Mohandas SS. 2015), Marek Hastalığı Virüsü (Woźniakowski G. 2014) gibi çeşitli viral etkenlerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında MG belirlenmesinde uluslararası salgın hastalıklar birimi (OIE) tarafından önerilen PCR metodu ile literatürdeki LAMP metodunun etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Alternatif ve daha hassas olarak değerlendirilen metodun, OIE tarafından önerilen PCR metoduna göre etkinliğinin belirlenmesi, yeni metodun optimizasyonu ve ileriki çalışmalarda geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

İki metodun deteksiyon limitlerinin belirlenmesi ve PCR inhibitörlerinin iki metod üzerine etkilerinin incelenmesi amacı ile sırasıyla pozitif MG DNA dilüsyonları ile, yapay kontamine örnekler ile ve saha örnekleri ile her iki metod çalışılmıştır.

Bu çalışmanın amacı ülkemizde ve dünyada büyük öneme sahip olan ve damızlık işletmelerde kesinlikle bulunmaması gereken kanatlı mikoplazmoz etkenlerinden *Mycoplasma gallisepticum* (MG)'un kısaca LAMP olarak bilinen sahada hızlı bir şekilde hastalığın belirlenmesini sağlayan tanı metodunun OIE tarafından tavsiye edilen PCR metoduna göre daha kısa zamanda, düşük maliyetle ve yüksek doğruluk oranıyla teşhis edilip edilemeyeceğini belirlemektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 02.02.2016 tarih ve 16/02 sayılı yazısı gereği çalışmanın yürütülmesine karar verilmiştir.

PCR ve LAMP testlerinin tanıları arasındaki uyumluluk Kappa Katsayısı ile belirlendi. Kappa katsayısı $<0,20$ olduğu durumda “düşük uyum”, $0,21-0,40$ olduğunda “kabul edilebilir düzeyde uyum”, $0,41-0,60$ olduğunda “orta derecede uyum”, $0,61-0,80$ olduğunda “iyi düzeyde uyum” ve $>0,80$ olduğunda “mükemmel uyum” şeklinde yorumlanmıştır (Altman, 1991).

İstatistiksel analizlerde SPSS 11.5 paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı olarak nitel değişkenler için sayı ve yüzde verilmiştir. PCR testi altın standart olarak kabul edildiğinde, PCR testine göre LAMP testinin güvenilirliği ise sensitivite, spesifisite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve doğruluk değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. İki bağımlı nitel test arasındaki benzerlik/farklılığa bakmak için McNemar testi kullanılmıştır. İki nitel test arasındaki uyum değerlendirmesinde ise Kappa skoruna bakılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ kabul edilmiştir.

2.1. Gereç

2.1.1. Bakteri Suşu ve DNA'sı

Çalışmada pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (İstanbul) ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilen *M. gallisepticum* S6 suşu ve DNA'sı kullanıldı.

2.1.2. Organ Örnekleri

Kırıkkale ve Ankara çevresinde, yumurtacı tavuk çiftliklerinde *M. gallisepticum* varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve LAMP ile araştırıldı. Solunum sistemi enfeksiyonu belirtileri gösteren farklı yaşlarda 12 kümeden 230 tavuğa ait trakea ve akciğer örneği toplandı. Her bir kümeden alınarak beşerli havuzlar (46 havuz) oluşturulan akciğer ve trakea örnekleri kullanıldı. Hastalığın yaşa göre dağılımının belirlenebilmesi açısından örnekler tavukların yaşına göre sınıflandırıldı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. İşletmelerdeki hayvanlardan toplanan trakea ve akciğer örneklerine ilişkin bilgiler

Kümes No	Yaş (gün)	Toplanan Örnek Sayısı	
		Trakea	Akciğer
1	135	20	20
2	135	20	20
3	135	20	20
4	70	20	20
5	60	20	20
6	45	20	20
7	110	20	20
8	96	20	20
9	52	20	20
10	52	20	20
11	45	20	20
12	120	10	10

2.1.3. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Cihaz

MagNA Lyser Instrument (Roche) cihazı kullanıldı.

2.1.4. DNA Amplifikasyonunda Kullanılan Malzemeler

2.1.4.1. Thermal Cycler

Corbett Research Palm Cycler - Corbett Research (Avustralya) kullanıldı.

2.1.4.2. Primerler

2.1.4.2.1. PCR Primeri

Yapılan literatür taramalarında konvansiyonel PCR ile MG belirlenmesinde kullanılan OIE tarafından önerilen primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerlere ait sekanslar, Çizelge 2.2’de gösterilmektedir (World Organisation for Animal Health, 2008; Zhang ve ark., 2015). Çalışmada kullanılan primerler Integrated DNA Technologies (USA)’ de sentezletirildi.

Çizelge 2. 2. PCR Primeri (World Organisation for Animal Health, 2008)

Primer Adı		Hedef Gen	5'- 3'Primer Dizini
MG	MG-14F	MGc2	5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'
	MG-13R		5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

2.1.4.2.2. LAMP Primeri

Yapılan literatür taramalarında LAMP ile MG belirlenmesinde Zhang ve ark. (2015) tasarladığı primerler kullanıldı. Kullanılan primerlere ait sekanslar, Çizelge 4.1.4.2.2'de gösterilmektedir (Zhang et. al., 2015). Çalışmada kullanılan primerler Integrated DNA Technologies (USA)'de sentezletirildi.

Çizelge 2. 3. LAMP Primeri (Zhang ve ark., 2015)

Primer Adı		Hedef Gen	5'- 3'Primer Dizini
MG	F3	pdhA	TTACCGTCAAGGTCCTCA
	B3		GCTTAACATCGTATTCCTCACT
	FIP (F1c + F2)		TTGCGATTGGATCTGATTTCTTAGCCACAACCTTCAGATGACCCT
	BIP (B1c + B2)		ACAGCTAAAGGTCTATGAGACGAGATCTTAGCTTCGATCTGTT

2.1.4.2.3. Taq Polimeraz

Taq DNA polimeraz (Invitrogen) kullanıldı.

2.1.4.2.4. Deoxynucleotid set

dNTP (Promega) ler 10mM olacak şekilde saf su ile sulandırılarak kullanıldı.

2.1.4.2.5. Oluşan DNA'ların Görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler

1) Tris asetat (TBE) tamponu (10x)

Tris base 60,50 g

Borik asit 30,85 g

Na₂EDTA.2H₂O 3,72 g

H₂O (Distile Su) 1 L'ye ilave edildi, eritildi, hazırlandı ve kullanıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı

2) AgaroZ Gel (%1.5) (w/v)

AgaroZ 1,5 g (w/v)

TBE 100 ml

3) GelRed stok solüsyonu (X10000)

4) Yükleme tamponu

5) 6X Loading Dye solution (MBI Fermentas, R0411)

6) Hassas terazi - Gibertini Europe 200 LCD Elektronik Hassas Terazi

7)PCR

8) Vortex – VelpScientific

9) Santrifüj - Eppendorf minispın

10) UV transilluminatör ve printer - ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD®)

11) Mikrodalga fırın – Miele,

12) Mikropipet – Brand marka mikropipet kullanılmıştır.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Doku Homojenizasyonu – Phosphate buffered saline (PBS, Thermo Fisher)

PCR - Taq DNA Polimeraz (Invitrogen), 10X PCR Buffer (Invitrogen), 25 mM MgCl₂ (Invitrogen), 10mM dNTP (Promega), Dimetil Sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich),

LAMP - Isothermal master mix (Optigene), Primerler (IDT)

2.2. Yöntem

2.2.1. Organların Toplanması

Nekropsisi yapılan 230 tavuğa ait trakea ve akciğer örneği (Toplam onbir kümeste - her bir kümeste 20 hayvana ait akciğer ve trakea dokuları ve bir kümeste 10 hayvana ait akciğer ve trakea dokuları) her seferinde farklı eldiven kullanılarak, beşer adet olacak şekilde steril kaplara alındı ve aynı gün laboratuvara soğuk zincirde gönderildi. Gönderilen örnekler ekstraksiyona kadar -20°C’de saklandı.

Ayrıca MG yönünden negatif olduğu hem serolojik olarak hem de PCR ile doğrulanan akciğer ve trakea örnekleri ile trakealara sürülerek hazırlanan sıvı materyali MG S6

suşu kullanılarak yapay kontaminasyonda kullanıldı. Yapay kontamine örnekler ve sıvı materyali MG varlığı yönünden PCR ve LAMP ile değerlendirildi.

2.2.2. Primerlerin Belirlenmesi

Primerler, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, pozitif ve negatif kontrol bakteri suşlarına ait DNA'ların kullanıldığı PCR ve LAMP testleri ile kontrol edilmiştir.

2.2.3. Yapay Kontamine Örneklerin Hazırlanması

2.2.3.1. *Mycoplasma gallisepticum* Suşlarının Sayımı

Çalışmada bakteri sayımı ve sulandırmaları yapılırken Frey's Broth kullanıldı. Sıvı besi yeri Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (İstanbul) temin edildi. Liyofilize halde gelen MG önerilen şekilde sulandırıldıktan 4 ml si daha sonra yapay kontaminasyonda kullanılmak üzere 2 ml'lik kriyotüplere paylaştırılarak -20°C'ye kaldırıldı. Mikoplazma sayımında CCU₅₀ metodu kullanıldı (Çizelge 4.2.3.1.). Bunun için mikropleyt kuyucuklarına 180 µl. Frey's Broth konuldu. İlk sıradaki tüm kuyucuklara, stok bakteri süspansiyonunun 10⁻¹ sulandırmasını içeren sıra olacak şekilde 20 µl Stok MG kültürü eklendi. Pipetaj sonrası ilk sıradaki kuyucuklardan 20 µl. ikinci sıradaki kuyucuklara aktarıldı ve aynı şekilde diğer sıralara işlem uygulandı. Son kuyucuktan 20 µl. dışarı atıldı. İşlem sonunda bakteri sulandırması mikropleytlere 10⁻⁸ ye kadar yapılmış oldu. Renk değişimi yönünden kuyucuklar iki günde bir gözlemlendi. Bir hafta sonunda oluşan renk değişimi not edildi, ilerleyen günlerde de bir renk değişimi gözlenmedi (Şekil 2.1). Canlı Mikoplazma sayımı için CCU₅₀ belirlenmesinde Reed and Muench metodu modifiye edilerek kullanıldı (Qinyi ve ark., 2013).



Şekil 2. 1. CCU₅₀ hesaplanması için mikropleytte hazırlanan Mikoplazma sulandırması

Çizelge 2. 4. CCU₅₀ metodu

CCU 50 METODU						
Mikoplazma Sulandırması	Renk Değişimi		Toplam Renk Değişimi		Toplam	% Renk Değişimi
	VAR	YOK	VAR	YOK		
-1	12	0	26	0	26	100
-2	10	2	14	2	16	87,5
-3	3	9	4	11	15	26,7
-4	1	11	1	22	23	4,3
-5	0	12	0	34	34	0,0
-6	0	12	0	46	46	0,0
-7	0	12	0	58	58	0,0
-8	0	12	0	70	70	0,0

Logaritmaların farkı hesaplandı. Bunun için aşağıda verilen formül kullanıldı.

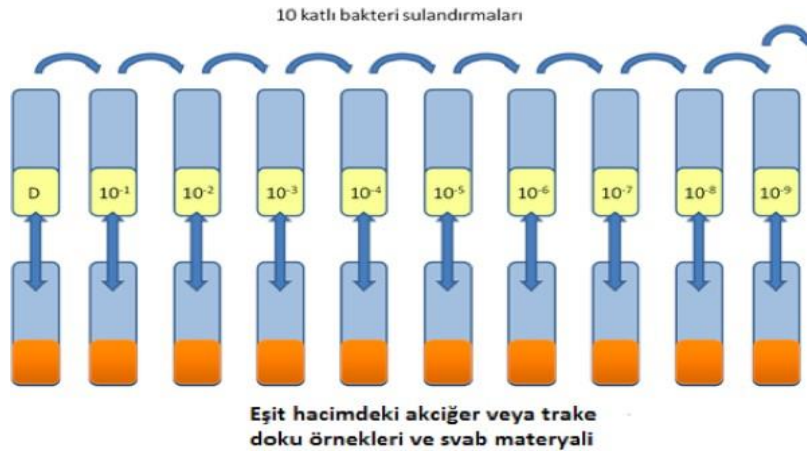
Logaritmaların Farkı = [(%50 nin hemen üstündeki renk değişiminin yüzde değeri)-50]/[(%50 nin hemen üstündeki renk değişiminin yüzde değeri)-(%50 nin hemen altındaki renk değişiminin yüzde değeri)].

Son olarak log 50% bitiş dilüsyonu formül kullanarak hesaplandı ve doku sıvı materyalinin yapay kontaminasyonu için kullanılacak olan stok kültürde canlı Mikoplazma sayısı 4,15 Log₁₀ CCU₅₀/ml olarak belirlendi.

log 50% bitiş dilüsyonu = %50 nin hemen üstündeki renk değişiminin log₁₀ sulandırma değeri - (logaritmaların farkı × sulandırma faktörünün logaritması)

2.2.3.2. Yapay Kontaminasyon İçin Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Yapay kontaminasyon için Frey's brothda bulunan MG stok kültürünün 2 ml. lik steril eppendorf tüplerde on katlı dilüsyonları hazırlandı. Bunun için tüplere 270 µl. Frey's Broth konuldu. İlk tüpte bulunan stok kültürden 30 µl alınıp ikinci tüpe ilave edildikten sonra vortekslendi. Aynı işlem diğer tüplere uygulanarak son tüp (yedinci tüp) e kadar bu şekilde devam etti. Son tüpten alınan 30 µl. dışarı atılarak yapay kontaminasyon için kullanılacak bakteri süspansiyonunun 10⁻¹ den 10⁻⁷ e kadar seri dilüsyonu hazırlandı (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Yapay kontamine örneklerin hazırlanması

2.1.2.3.3. Akciğer ve Trakea Örneklerinin Yapay Kontaminasyonu

Yapay kontaminasyonda çeşitli kanatlı işletmelerinden alınan tavuk kaynaklı akciğer ve trakea örnekleri ile çalışılmıştır. Bu örnekler MG'e spesifik bilinen primerlerle test edilerek PCR sonucu negatif çıkan dokular yapay kontaminasyon çalışmasında kullanıldı.

Stok MG kültürünün Frey's Broth'a direkt, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 'lik dilüsyonları yapılarak çalışma için ayrılacak örneklerle inoküle edildi (Şekil 6). Yapay kontaminasyon için kullanılacak akciğer örneklerinin ilk olarak homojenizasyonu sağlandı. Bu amaçla seramik boncuklu kriyotüplere 2-2,5 x 2-2,5 x 2-2,5 mm (8 - 15,6 μm^3 - μl .) ebatında doku ve üzerine 500 μl . Phosfat Buffered Saline (PBS) eklenerek 7000 rpm. hız ve 60 sn. süre ile tissuelyser (MagNA Roche) kullanılarak doku homojenize edildi.

Daha sonra yapay kontaminasyon amacıyla ependorflara 180 μl . hacimde akciğer ve trakea doku homojenatları konuldu. Doku homojenatlarının üzerine, 20 μl . bakteri süspansiyonu stok ve sulandırılmaları ilave edildi. Yapay kontaminasyon sonunda bakteri süspansiyonları tekrar 10 katlı olarak seyreltilti. Her bir ependorf tüpünde 20 μl . bakteri süspansiyonu ve 180 μl . doku homojenatı olmak üzere toplam 200 μl . hacimde doku-bakteri süspansiyonu yer aldı. Bu doku-bakteri süspansiyonu karışımının hepsi daha sonra ekstraksiyonda kullanıldı.

Yapay kontaminasyonu takiben örneklerden direkt DNA ekstraksiyonu partikül teknolojisine dayalı ticari bir kit (MagAttract® HMW DNA- QIAGEN) modifiye edilerek yapıldı.

2.2.3.4. Sıvap Materyalinin Yapay Kontaminasyonu

Sıvaplar MG ile kontamine edildikten sonra PBS içinde vorteksleneceği için çalışma öncesinde, çalışılacak svab trakea yüzeyine sürtülmüş ve sonrasında çeşitli hacimlerde (10 μl .'den 70 μl .'e kadar) PBS içeren ependorfa konularak vortekslendi. İşlem sonucu sıvabın 50 μl . PBS tutması nedeniyle çalışmada svabın konacağı ependorfa başlangıçta 230 μl . (180 μl .+50 μl .) PBS eklendi. Svap trakea yüzeyine kazınarak sürüldükten ve yapay olarak 20 μl . MG stok ve sulandırılmalarıyla kontamine edildikten sonra ependorfa konulup vortekslendi. Burada svap ependorftan çıkarıldıktan sonra ekstraksiyonda kullanılacak toplam hacmin yaklaşık 200 μl . olması amaçlandı.

Yapay kontaminasyon, nekropsisi yapılan ve MG'ye spesifik bilinen primerlerle test edilerek PCR sonucu negatif çıkan tavuklara ait trakea mukoza yüzeyinden kazınarak alınan svap materyali ile yapıldı (Carli & Eyigor, 2003).

Stok MG kültürünün Frey's Broth'a direkt, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 'lik dilüsyonları kullanıldı. 2ml. lik eppendorf tüplere 230 μl . PBS eklendikten sonra

bakteri süspansiyonu, trakea mukoza yüzeyinden kazınarak alınan swap materyaline inokule edildi (Carli & Eyigor, 2003). İnokulasyon uygulamasında, trakea mukoza yüzeyi swap ile kazındıktan sonra bakteri süspansiyonları önce svabın pamuk kısmının tam üzerine denk getirilerek damlatıldı ve sonra PBS içeren eppendorf konulup vortekslendi. Yapay kontaminasyonu takiben swaplardan direkt DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Yapay kontaminasyon iki yöntemin deteksiyon limitlerinin belirlenmesi ve inhibitörlerin PCR ve LAMP üzerindeki etkilerinin araştırılması için yapıldı.

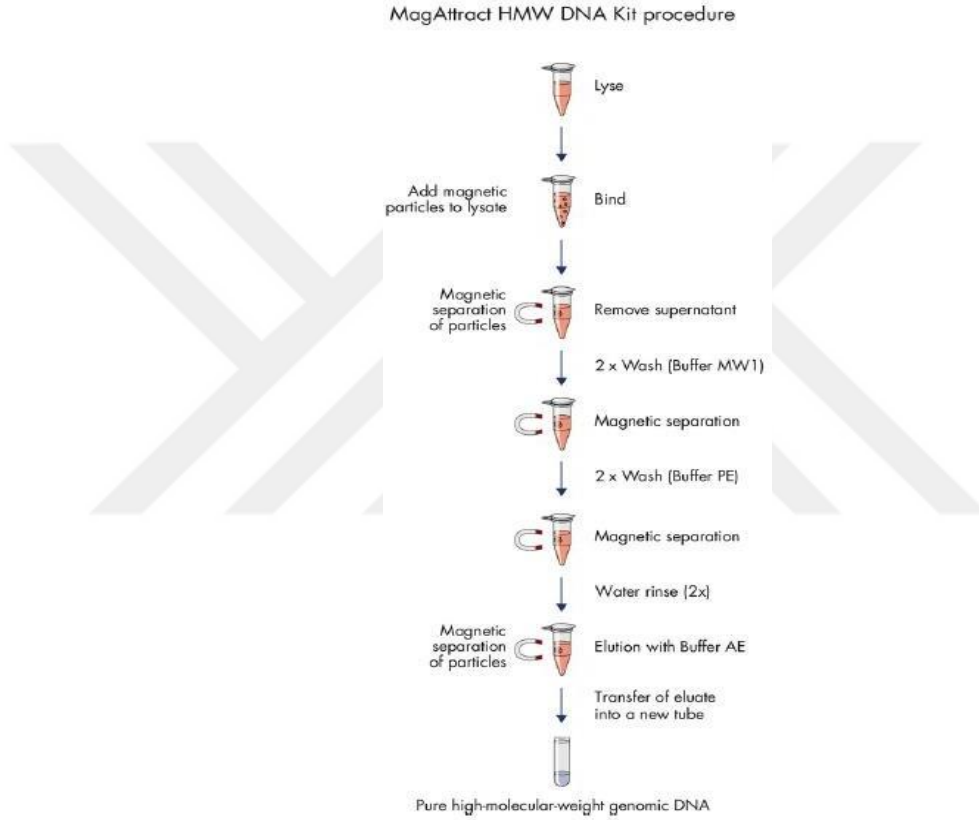
2.2.4. Saha Örneklerinin Hazırlanması

Derin dondurucudan çıkarılan akciğer ve trakea örnekleri oda ısısına getirildi. Doku homojenizasyonu için her bir örnek havuzundan (her bir örnekten alınmak üzere) toplam 1 gr. olacak şekilde doku seramik boncuklu 500 µl. PBS içeren kriyotüplere ilave edildi. Ekstraksiyon öncesi dokular tissuelyser (MagNA Roche) kullanılarak homojenize edildi. Homojenizatör trakea için 7000 rpm. hız ve 1 dk. ve akciğer için 7000 rpm. hız ve 2 dk. süreyle çalıştırıldı.

2.2.5. Doku Örneklerinden ve Yapay Kontamine Örneklerden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için manyetik partikül teknolojisine dayalı ticari bir kit (MagAttract® HMW DNA- QIAGEN) modifiye edilerek kullanıldı (Şekil 4.2.5.). Bu amaçla 2 ml. eppendorf tüpe 20 µl. Proteinaz K eklendikten sonra homojenize edilen doku süspansiyonundan 200 µl. (25 MG. doku) eklenerek vortekslendi. Daha sonra doku parçalanması için ATL buffer ilave edilerek vortekslendi. Sonra 56 °C’de 1 saat inkübe edilerek vortekslendi. Eppendorf tüpe 200 µl. AL buffer eklendikten sonra 70 °C’de 15 dk. heatshakerda 900 rpm çalkalama hızı ayarlanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpe 300 µl bağlama solüsyonu eklenip vortekslenmiştir. Daha sonra eppendorf tüp, 50 µl manyetik boncuk ilave edildikten sonra heatshakerda 900 rpm çalkalama hızında 56°C’de 5 dk. bekletildi. Tüp santrifüjde kısa süreli spin atılarak kapaktaki sıvının dip kısma inmesi sağlandıktan sonra mıknatıs rakına yerleştirildi. Süpernatant 1 ml. lik pipet uç kullanılarak yandan çekilip atılmıştır. Manyetik boncuk içeren eppendorf tüpün içine 750 µl. MW1 buffer eklenip vortekslenmiş, 37°C’de heatshakerda maksimum hızda (1500 rpm.) 1 dk. karıştırıldı. Tüpe tekrar minispin attırdıktan sonra tüp mıknatıs rakına yerleştirildi. Süpernatant 1

ml. lik pipet ucu kullanılarak yandan çekilip atıldı. Manyetik boncuk içeren ependorf tüpün içine 750 µl PE buffer eklendikten sonra vortekslendi ve 37°C’de heatshakerda maksimum hızda 1 dk. karıştırıldı. Son işlem tekrarlandıktan sonra boncuk içeren tüpler PE buffer bileşimindeki PCR inhibitörü olan etanolün uzaklaşması için ağızları açık ısıtıcıda 37°C’de 45 dk. kurumaya bırakıldı. Kurumuş tüplerin içine 200 µl AE buffer eklendikten sonra ağzı kapalı oda ısısında (15-25°C) 1400 rpm çalkalama hızında 3 dk. inkübe edildi. Son olarak mıknatıs rakına yerleştirilen tüplerden 200 µl pipetle DNA temiz bir tüpe alındı.



Şekil 2. 3. MagAttract® HMW DNA kit prosedürü

(Anonim: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=3e331b6c-0742-483b-b74f-a7be2d4c1116&lang=en>)

2.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR Primerleri, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda, pozitif ve negatif kontrol bakteri suşlarına ait DNA’ların kullanıldığı PCR testleri ile kontrol edildi.

Toplam 50 µl. PCR reaksiyon karışımında; 30,75 µl nükleaz ari su, 5 µl. 10X Taq buffer, 3,5 mM MgCl₂, %5 Dimethyl Sulfoxide (sigmaaldrich), 0,2 mM dNTP

karişımı, 200 nM forward ve reverse primerler (IDT), 1,25 U Taq Polimeraz ve 5 µl. kalıp DNA içeren karişım kullanıldı.

Thermal cyclerin ilk adımı 95°C’de 5 dakika n denatürasyon, ikinci adımı 35 kere 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 55°C’de 30 saniye soğutma ve 72°C’de 60 saniye polimerizasyon olacak şekilde programlandı. Son olarak 1 kez 72°C’de 5 dakika son ektensiyon aşaması ile amplifikasyon tamamlandı (izelge 4.2.6.).

Çizelge 2. 5. PCR Protokolü

Adım	Sıcaklık	Süre
n denatürasyon	95°C	5 dakika
Denatürasyon x35	94°C	30 saniye
Soğutma	55°C	30 saniye
Polimerizasyon	72°C	60 saniye
Son ektensiyon	72°C	5 dakika

2.2.7. Amplifiye Edilen rneklerin Agaroze Jel Elektroforez Yöntemi ile

GörüntüLenmesi

Amplifiye edilen DNA rnlerinin görüntülenmesi amacıyla jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla gelred ile %1,5 olarak agaroz jel hazırlandı. Agaroze jel üzerinde açılan çukurlara mikropipetler yardımıyla, boyalı yükleme solusyonu (6X Loading Dye Solution MBI Fermentas, R0411) ve her bir örnek 5 µl. kariştırılarak ilgili çukurlara yüklendi. Pozitif, negatif kontroller ve ladder da sırasıyla çukurlara eklendikten sonra yatay elektroforezde Tris Borat (1X) ile 90V 500 mA de 40 dk. süre ile yürütüldü. Bu süre sonunda ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD®) cihazı ile görüntülendi ve görüntüler bilgisayar ortamına kaydedildi.

2.2.8. LAMP Reaksiyonu

Mycoplasma gallisepticum’a ait LAMP Primeri, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda, pozitif ve negatif (*M. iowa*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, *E.coli*, *S. enterica subs. enterica*) kontrol bakteri suşlarına ait DNA’ların kullanıldığı LAMP testleri ile kontrol edildi.

LAMP reaksiyon karişımı toplam 25 µl. olacak şekilde, cihaza özel sekizli strip tüplere temiz odada paylaştırıldı. Karişımda 15 µl. Isothermal master mix, 2,5 µl. nükleaz ari su, 200 nM F3 ve B3 primerleri (IDT) ve 800 nM FIP ve BIP primerleri (IDT)

kullanıldı. En son olarak örnekler örnek ekleme (kirli) odasında eklendi.

LAMP reaksiyonu Geneie (Optigene) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Cihazda isothermal amplifikasyonun şekillenmesi için 65°C’de 45 dk. (MG DNA sulandırması için 30 dak.) ısıtma ve anneal için 98°C’den 80°C’ye 0,5 derece/saniye 5 dk. (anneal aşaması isteğe bağlı) olarak ayarlandı. Annealing aşaması yapılmayacaksa *Bst* polimeraz etkinliğinin yani reaksiyonun durdurulması için 80°C’de 10 dk. bekletmek yeterlidir.

2.2.9. LAMP Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Amplifiye edilen DNA ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla gel red ile %1,5 olarak agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel üzerinde açılan çukurlara mikropipetler yardımıyla, boyalı yükleme solusyonu (6X Loading Dye Solution MBI Fermentas, R0411) ve her bir örnek 5 µl. karıştırılarak ilgili çukurlara yüklendi. Pozitif, negatif kontroller ve ladder da sırasıyla çukurlara eklendikten sonra yatay elektroforezde Tris Borat (1X) ile 90V 500 mA de 40 dk. süre ile yürütüldü. Bu süre sonunda ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD®) cihazı ile görüntüleri ve görüntüler bilgisayar ortamına kaydedildi.

3. BULGULAR

3.1. PCR Sonuçları

PCR metoduyla toplam 46 tane havuz örneği (her bir havuz 5 akciğer veya trakeaden oluşmaktadır)’nden akciğer için %32,6 (15 tane akciğer havuz örneği)’i ve trakea için %34,8 (16 tane trakea havuz örneği)’i MG varlığı yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Örneklerle ait PCR sonuçları ve örneklerin alındığı kümesteki tavukların yaşları Çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3. 1. PCR ile MG’ye özgü DNA varlığı belirlenen örnekler

Yaş (Gün)	PCR	Akciğer	Trakea
	Toplam	46	46
135	1. kümes	4	0
135	2. kümes	2	3
135	3. kümes	2	3
70	4. kümes	0	0
60	5. kümes	0	0
45	6. kümes	0	0
110	7. kümes	4	4
96	8. kümes	2	4
52	9. kümes	0	0
52	10. kümes	0	0
45	11. kümes	0	0
120	12. kümes	1	2
	Toplam Pozitif	15	16

*n değerleri havuzlanmış 5 akciğer ya da 5 trakea örneğini ifade etmektedir.

3.2. LAMP Sonuçları

Toplam 46 tane havuz örneğinden izole edilen DNA’ların LAMP metodu ile amplifikasyonu sonrasında jel görüntüleri incelendi ve jelde LAMP reaksiyonuna spesifik merdiven benzeri bant görüntüleri pozitif olarak değerlendirildi. Amplifikasyon sonucunda akciğerde %43,5 (20 adet akciğer havuz örneği) ve trakeada %60,9 (28 adet trakea havuz örneği) MG ‘ye özgü DNA varlığı belirlendi. Örneklerle ait LAMP sonuçları ve örneklerin alındığı kümesteki tavukların yaşları Çizelge 3.2’de verildi.

Çizelge 3. 2. LAMP ile MG' ye özgü DNA varlığı belirlenen örnekler

Yaş (Gün)	LAMP	Akciğer	Trakea
	Toplam	46	46
135	1. kümes	2	4
135	2. kümes	1	4
135	3. kümes	3	4
70	4. kümes	3	2
60	5. kümes	0	0
45	6. kümes	2	2
110	7. kümes	2	2
96	8. kümes	3	4
52	9. kümes	0	1
52	10. kümes	2	2
45	11. kümes	0	1
120	12. kümes	2	2
	Toplam Pozitif	20	28

*n değerleri havuzlanmış 5 akciğer ya da 5 trakea örneğini ifade etmektedir.

Akciğer ve trakea örneklerinden aynı kümeden olacak şekilde beşerli havuzlar yapıldı. Kümeslerden onbir tanesinden alınan yirmi akciğer ve yirmi trakea ve bir kümeden alınan on akciğer ve on trakea beşerli havuzlar yapılarak DNA izolasyonu ve sonrasında LAMP ile değerlendirildi. Toplam 46 tane havuz örneği (her bir havuz 5 akciğer veya trakeadan oluşmaktadır)'nden izole edilen DNA'ların amplifikasyon ve annealing eğrileri incelendi.

Yapılan testlerde; PCR ile MG yönünden 46 akciğer havuzundan 15 adet akciğer ve 16 adet trakea havuz örneği, LAMP metodu ile 20 adet akciğer ve 28 adet trakea havuz örneği pozitif olarak değerlendirildi. Toplanan akciğer dokularında ve trakea dokularında PCR ve LAMP ile MG yönünden pozitif ve negatif örneklerin değerlendirilmesi Çizelge 3.3'de mevcuttur.

Çizelge 3. 3. Saha Örneklerinin MG Varlığı Yönünden Değerlendirilmesi

Kümesler		PCR		LAMP	
		Pozitif (nx5)	Negatif (nx5)	Pozitif (nx5)	Negatif (nx5)
1.kümes	Akciğer	4	0	2	2
	Trakea	0	4	4	0
2.kümes	Akciğer	2	2	1	3
	Trakea	3	1	4	0
3.kümes	Akciğer	2	2	3	1
	Trakea	3	1	4	0
4.kümes	Akciğer	0	4	3	1
	Trakea	0	4	2	2
5.kümes	Akciğer	0	4	0	4
	Trakea	0	4	0	4
6.kümes	Akciğer	0	4	2	2
	Trakea	0	4	2	2
7.kümes	Akciğer	4	0	2	1
	Trakea	4	0	2	0
8.kümes	Akciğer	2	0	3	1
	Trakea	4	0	4	0
9.kümes	Akciğer	0	4	0	4
	Trakea	0	4	1	3
10.kümes	Akciğer	0	4	2	2
	Trakea	0	4	2	2
11.kümes	Akciğer	0	4	0	4
	Trakea	0	4	1	3
12.kümes	Akciğer	1	1	2	2
	Trakea	2	0	2	2
Total	Akciğer	15	31	20	26
	Trakea	16	30	28	18

3.3. Yapay Kontaminasyon Sonuçları

Yapay kontaminasyon sonuçları, her iki yöntem için de amplifiye DNA ürünlerine jel elektroforezi uygulandıktan sonra bantların görüntülenmesi transillüminatör ile değerlendirildi. Yapay kontamine akciğer, trakea ve sıvı örneklerinde iki yöntemle amplifikasyon sonrası MG S6'ya ait DNA molekülü, PCR ile 10^{-5} katlı dilüsyona kadar ve LAMP ile 10^{-3} dilüsyona kadar tespit edilebilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 4. Yapay Kontaminasyon Sonuçları

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
PCR	+	+	+	+	+	-
LAMP	+	+	+	-	-	-

Akciğer, trakea numuneleri ve sıvay materyalleri

Yapay kontaminasyon sonuçları, her iki yöntem için de amplifiye DNA ürünlerine jel elektroforezi uygulandıktan sonra bantların görüntülenmesi (transillüminatör ve printer marka bilgisi) ile değerlendirilmiştir. Yapay kontamine akciğer, trakea ve sıvay örneklerinde iki yöntemle amplifikasyon sonrası MG S6'ya ait DNA molekülü, PCR ile 10⁻⁵ katlı dilüsyona kadar tespit edilirken LAMP ile 10⁻³ dilüsyona kadar tespit edilebilmiştir.

3.4. *Mycoplasma gallisepticum* S6 DNA sulandırılmalarının PCR ve LAMP Sonuçları

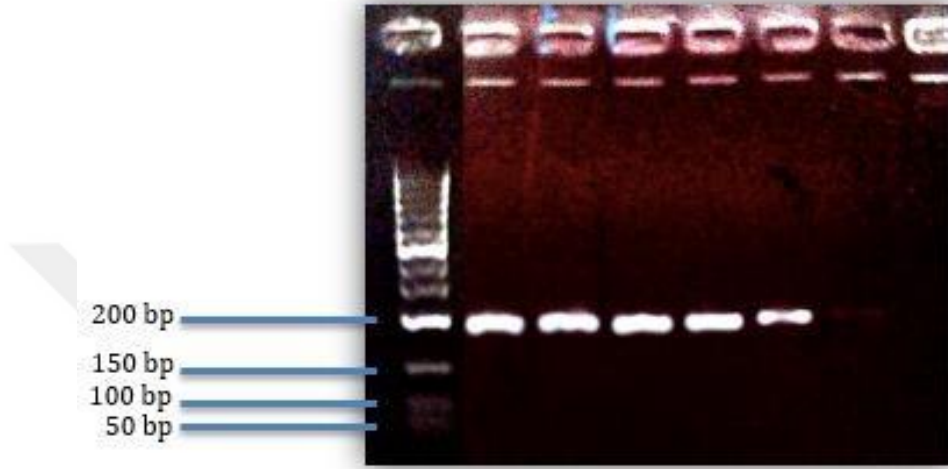
MG stok solüsyonunun 10 katlı sulandırmaları her iki teknik kullanılarak amplifiye edilmiştir. Seri dilüsyonda kullanılan stok MG dsDNA miktarı Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) cihazı ile ölçümleri yapıldığında 10⁻¹ dilüsyondaki DNA miktarı 32.6 ng/mL, 10⁻² dilüsyondaki DNA miktarı 3.90 ng/mL ve 10⁻³ dilüsyondaki DNA miktarı 0.380 ng/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 3.1). Şekil 3.2'de amplifikasyon sonrası PCR ile 10⁻⁶ ve Şekil 3.3'te ise LAMP ile 10⁻² dilüsyona kadar tespit edilmiştir (Çizelge 3.5).



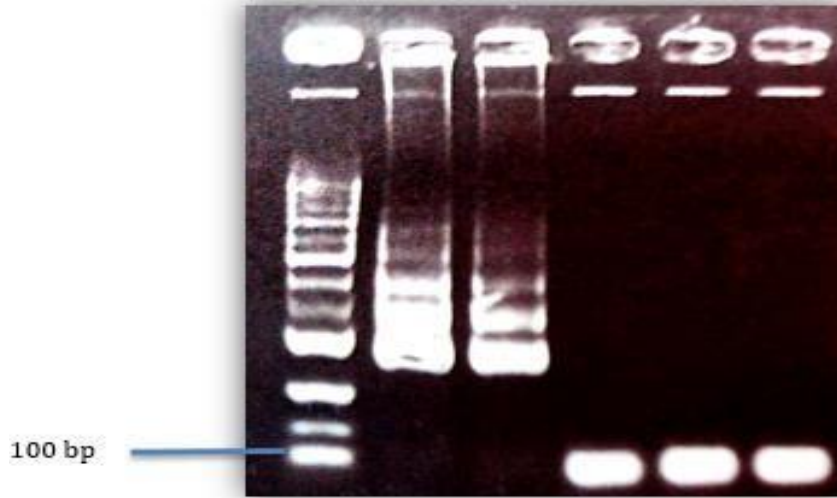
Şekil 3. 1. MG dsDNA miktarı için Qubit 4 Fluorometer Ölçümleri

Çizelge 3. 5. Mg S6 DNA sulandırılmalarının PCR ve LAMP Sonuçları

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
PCR	+	+	+	+	+	+	-
LAMP	+	+	-	-	-	-	-



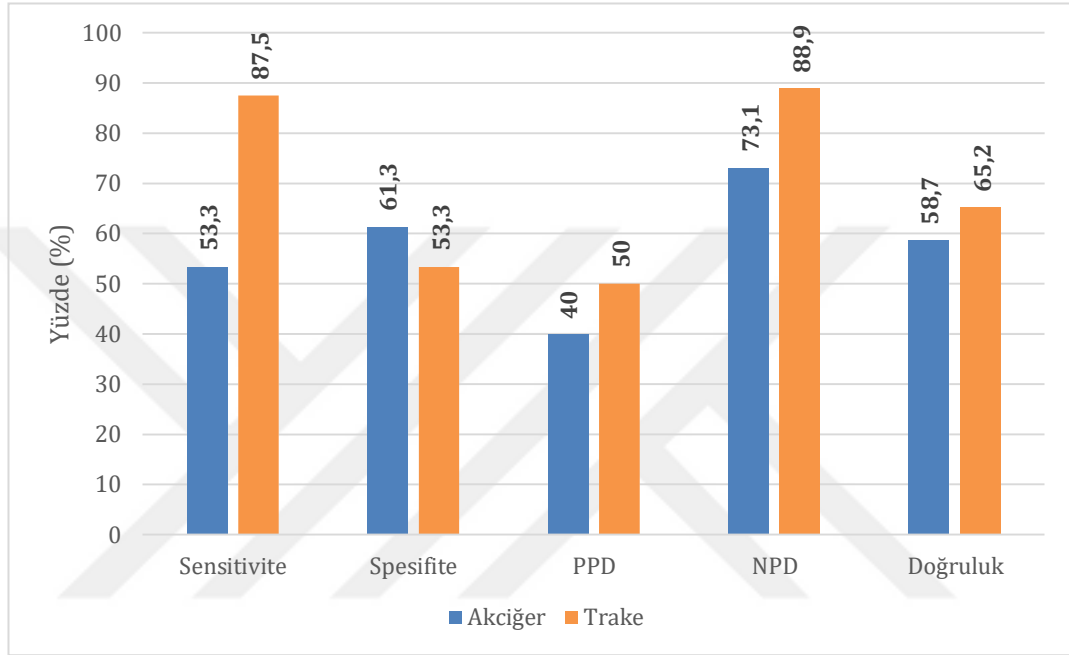
Şekil 3. 2. PCR ile incelenen *M. gallisepticum*'a ait DNA dilasyonlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri (mgc2 - 185 bç)



Şekil 3. 3. LAMP ile incelenen *M. gallisepticum*'a ait DNA dilasyonlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri (pdhA-330 bç)

3.5. LAMP Testinin Geçerliliği

Akciğer ve Trakea doku örneklerinde PCR sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde, LAMP testinin geçerliliği hesaplandı. Veriler, Akciğer için; %53,3 sensitivite, %61,3 spesifisite, %40 PPD, %73,1 NPD ve %58,7 doğruluk, Trakea için; %87,5 sensitivite, %53,3 spesifisite, %50 PPD, %88,9 NPD ve %65,2 doğruluk olduğunu göstermiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4. Akciğer ve trakea doku örneklerindeki PCR sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde LAMP yönteminin tanısal özellikleri

Akciğer doku örneklerinde PCR tekniği ve LAMP tekniği arasında Mg pozitiflik oranları arasında benzerlik bulunmamaktadır (Mc Nemar testi, $p=0,360$). PCR tekniği ile %32,6, LAMP tekniği ile %43,5 pozitiflik tespit edilmiştir. PCR gold (standart) ve LAMP alternatif test olarak alındığında, LAMP yöntemi PCR ile pozitif olarak belirlenen örneklerin %53,3'ünü (8/15) pozitif olarak (sensitivite), PCR yöntemi ile negatif olarak belirlenen örneklerin ise %61,3'ünü (19/31) ise negatif olarak belirlemiştir (spesifisite). LAMP yöntemi ile pozitif olarak belirlenen örneklerin gerçekte %40,0'ı (8/20) pozitifdir (pozitif prediktif değer) ve LAMP yöntemi ile negatif olarak belirlenen örneklerin ise gerçekte %73,1'i (19/26) negatiftir (negatif prediktif değer). İki teknik arasındaki uyuma Kappa skoru ile bakıldığında ise düşük uyum bulunmuştur. (Kappa skoru=0,135, $p=0,35$) (Çizelge 3.6).

Çizelge 3. 6. Akciğer doku örneklerinde teşhis testlerinin çapraz-tablo ile karşılaştırılması

			Akciğer (PCR)		Toplam	p değeri
			Pozitif	Negatif		
Akciğer (LAMP)	Pozitif	N	8	12	20	0,360
		Akciğer içindeki % (LAMP)	% 40,0	% 60,0	% 100,0	
		Akciğer içindeki % (PCR)	% 53,3	% 38,7	% 43,5	
	Negatif	N	7	19	26	
		Akciğer içindeki % (LAMP)	% 26,9	% 73,1	% 100,0	
		Akciğer içindeki % (PCR)	% 46,7	% 61,3	% 56,5	
Toplam		N	15	31	46	
		Akciğer içindeki % (LAMP)	% 32,6	% 67,4	% 100,0	
		Akciğer içindeki % (PCR)	% 100,0	% 100,0	% 100,0	

Trakea doku örneklerinde PCR tekniği ve LAMP tekniği arasında Mg pozitiflik oranları arasında anlamlı benzerlik bulunmaktadır (McNemar testi, $p=0,040$). PCR tekniği ile %34,8, LAMP tekniği ile %60,9 pozitiflik tespit edilmiştir. PCR gold (standart) ve LAMP alternatif test olarak alındığında, LAMP yöntemi PCR ile pozitif olarak belirlenen örneklerin %87,5'ini (14/16) pozitif olarak (sensitivite), PCR yöntemi ile negatif olarak belirlenen örneklerin ise %53,3'ünü (16/30) ise negatif olarak belirlemiştir (spesifisite). LAMP yöntemi ile pozitif olarak belirlenen örneklerin gerçekte %50'si (14/28) pozitifdir (pozitif prediktif değer) ve LAMP yöntemi ile negatif olarak belirlenen örneklerin ise gerçekte %88,9'u (16/18) negatiftir (negatif prediktif değer). İki teknik arasındaki uyuma Kappa skoru ile bakıldığında ise kabul edilebilir düzeyde uyum bulunmuştur. (Kappa skoru=0,348, $p=0,007$) (Çizelge 5.5.2).

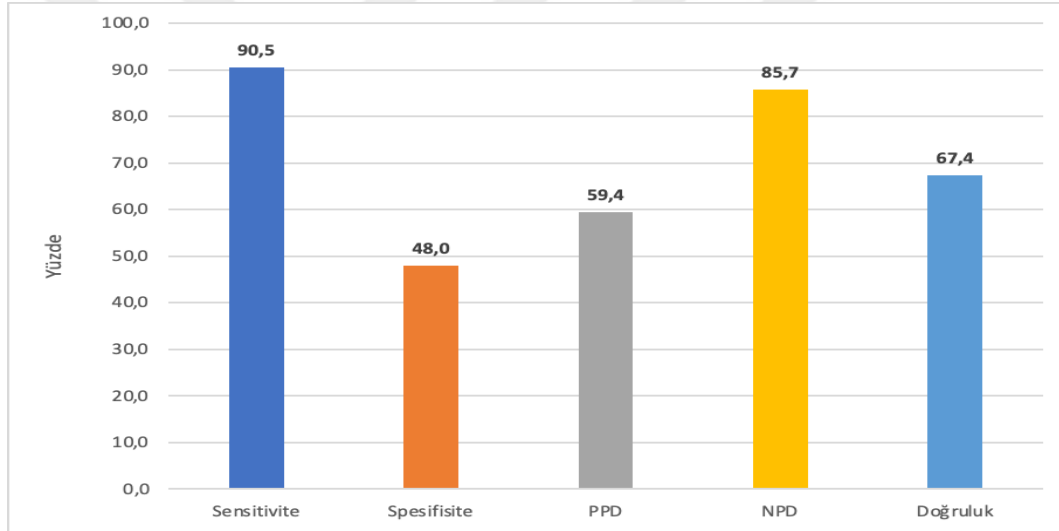
Çizelge 3. 7. Trakea doku örneklerinde teşhis testlerinin çapraz-tablo ile karşılaştırılması

			Trakea (PCR)		Toplam	p değeri
			Pozitif	Negatif		
Trakea (LAMP)	Pozitif	N	14	14	28	0,040
		Trakea içindeki % (LAMP)	% 50,0	% 50,0	% 100,0	
		Trakea içindeki % (PCR)	% 87,5	% 46,7	% 60,9	
	Negatif	N	2	16	18	
		Trakea içindeki % (LAMP)	% 11,1	% 88,9	% 100,0	
		Trakea içindeki % (PCR)	% 12,5	% 53,3	% 39,1	
Toplam		N	16	30	46	
		Trakea içindeki % (LAMP)	% 34,8	% 65,2	% 100,0	
		Trakea içindeki % (PCR)	% 100,0	% 100,0	% 100,0	

Akciğer veya trakea doku örneklerinden herhangi birinin pozitif olma durumuna göre PCR tekniği ve LAMP tekniği arasında Mg pozitiflik oranları arasında anlamlı fark bulunmaktadır (McNemar testi, $p=0.007$). PCR tekniği ile %45,7, LAMP tekniği ile %69,6 pozitiflik tespit edilmiştir. İki teknik arasındaki uyum zayıf orta arası düzeydedir (Kappa skoru=0.369, $p=0.005$) (Çizelge 3.8). Akciğer veya Trakea doku örneklerinde PCR sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde, LAMP testinin geçerliliği hesaplandı. Veriler, %90,5 sensitivite, %48,0 spesifite, %59,4 PPD, %85,7 NPD ve %67,4 doğruluk olduğunu göstermiştir (Şekil 3.5).

Çizelge 3. 8. Trakea veya Akciğer örneklerinde teşhis testlerinin çapraz-tablo ile karşılaştırılması

			PCR		Toplam
			Pozitif	Negatif	
LAMP	Pozitif	Sayı	19	13	32
		% LAMP	% 59,4	% 40,6	% 100,0
		% PCR	% 90,5	% 52,0	% 69,6
	Negatif	Sayı	2	12	14
		% LAMP	% 14,3	% 85,7	% 100,0
		% PCR	% 9,5	% 48,0	% 30,4
Total		Count	21	25	46
		% within LAMP	% 45,7	% 54,3	% 100,0
		% within PCR	% 100,0	% 100,0	% 100,0

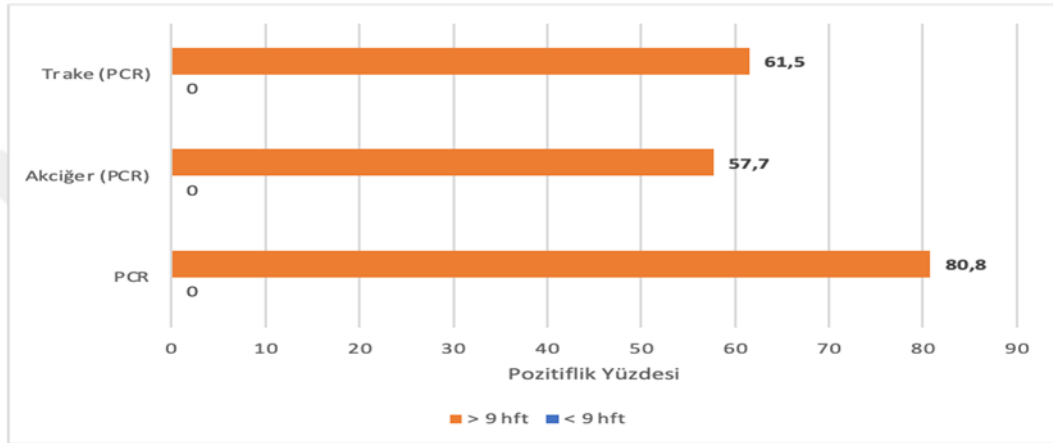


Şekil 3. 5. Akciğer veya trakea doku örneklerindeki PCR sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde LAMP yönteminin tanısal özellikleri

PCR yönteminin kullanıldığı her üç değerlendirme şekli (akciğer, trakea, akciğer ya da trakea pozitifliği) ile de 9 hafta altı ve 9 hafta üstü yaş ortalamasına sahip kümesler arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde Mg pozitifliği bakımından fark bulunmaktadır (Fisher testi, $p < 0,001$) (Çizelge 3.9). Akciğer ve trakea dokuları PCR yöntemi ile değerlendirildiğinde; 9 hafta üzeri ortalamaya sahip gruplarda trakea için %61,5, akciğer için %57,7 pozitiflik gözlemlenirken, 9 hafta altı ortalamaya sahip gruplarda pozitiflik gözlenmemiştir (Şekil 3.6).

Çizelge 3. 9. PCR yöntemi ile kümes yaş ortalaması karşılaştırılması

Testler		Yaş Grubu					
		< 9 hft		>9 hft		Toplam	
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
PCR	Pozitif	0	% 0,0	21	% 80,8	21	% 45,7
	Negatif	20	% 100,0	5	% 19,2	25	% 54,3
Akciğer (PCR)	Pozitif	0	% 0,0	15	% 57,7	15	% 32,6
	Negatif	20	% 100,0	11	% 42,3	31	% 67,4
Trakea (PCR)	Pozitif	0	% 0,0	16	% 61,5	16	% 34,8
	Negatif	20	% 100,0	10	% 38,5	30	% 65,2

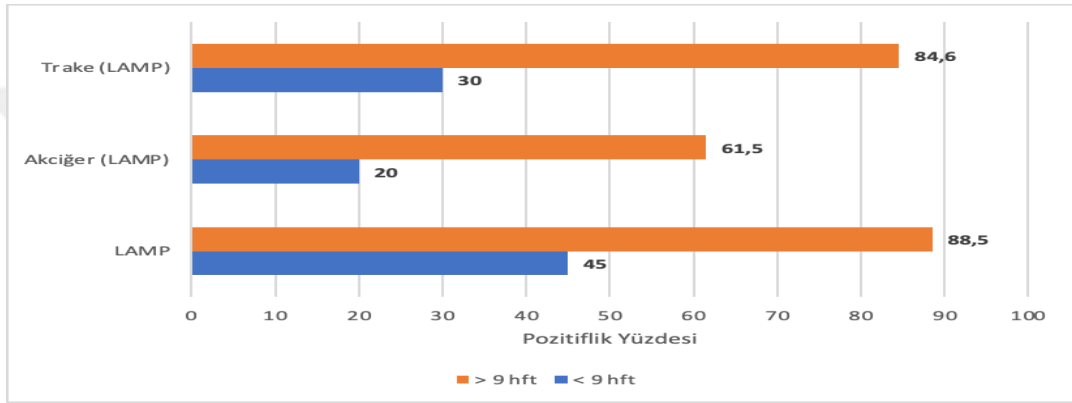


Şekil 3. 6. PCR yöntemi ile farklı değerlendirme yöntemleri ve kümes yaş ortalamasına göre pozitiflik sonuçları

LAMP yönteminin kullanıldığı her üç değerlendirme şekli (akciğer, trakea, akciğer ya da trakea pozitifliği) ile de 9 hafta altı ve 9 hafta üstü yaş ortalamasına sahip kümesler arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde Mg pozitifliği bakımından fark bulunmaktadır (Fisher testi, akciğer, trakea ve kombine değerlendirmeler için sırasıyla $p=0,005$, $p<0,001$, $p=0,001$) (Çizelge 3.10). Akciğer ve trakea dokuları LAMP yöntemi ile değerlendirildiğinde; 9 hafta üzeri ortalama yaşı olan gruplarda trakea için %84,6, akciğer için %61,5 pozitiflik gözlemlenirken, 9 hafta altı ortalama yaşı olan gruplarda trakea için %30, akciğer için %20 pozitiflik gözlemlenmiştir (Şekil 3.7).

Çizelge 3. 10. LAMP yöntemi ile kümes yaş ortalaması karşılaştırılması

Testler		Yaş Grubu					
		< 9 hft		> 9 hft		Toplam	
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
LAMP	Pozitif	9	% 45,0	23	% 88,5	32	% 69,6
	Negatif	11	% 55,0	3	% 11,5	14	% 30,4
Akciğer (LAMP)	Pozitif	4	% 20,0	16	% 61,5	20	% 43,5
	Negatif	16	% 80,0	10	% 38,5	26	% 56,5
Trakea (LAMP)	Pozitif	6	% 30,0	22	% 84,6	28	% 60,9
	Negatif	14	% 70,0	4	% 15,4	18	% 39,1



Şekil 3. 7. LAMP yöntemi ile farklı değerlendirme yöntemleri ve kümes yaş ortalamasına göre pozitiflik sonuçları

İstatistiksel olarak Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12’de verilen Ki-kare testi ve Simetrik ölçümlerde açıklanmıştır.

Çizelge 3. 11. Ki-kare testi

	Value	Exact. Sig. (2-sided)
McNemar Test		.359 ^a
N of Valid Cases	46	

a. Binomial distribution used

Çizelge 3. 12. Simetrik ölçümler

	Value	Asymptotic Standart Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Measure of Agreement Kappa	0,135	.144	.938	.348
N of Valid Cases	46			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standart error assuming the null hypothesis

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikoplazmozis tüm dünyada kanatlı işletmelerinde en önemli solunum sistemi hastalıklarındandır. Kanatlılar için önemli olan bu hastalığın en önemli etkeni *Mycoplasma gallisepticum* varlığının belirlenmesinde rutinde kullanılan yöntemler; kültür, serolojik testler ve konvansiyonel PCR yöntemleri olarak bilinmektedir. Bunların içinde kültür, çok dikkatli bir laboratuvar çalışması gerektiren, uzun inkübasyon süresi ve özel büyüme ortamı gerektiren, örnekteki mikroorganizmaların canlı olmaması ya da diğer mikoplazmalar ve/veya bakteriler tarafından üremenin baskılanabilmesi ihtimalleri nedeniyle bir yöntem olarak rutinde kullanılabilir olmaktan uzaktır (Ratliff, Duffy and Waites, 2014). PCR yöntemleri yüksek düzeyde spesifik ve sensitif olmalarının yanında en az birkaç saatlik bir sürede yanıt verebilmekte ve sonuçların analizi için elektroforez gereksinimi duyulmaktadır. Multiplex PCR yönteminin tavuklarda MG'nin gösterilmesinde ve ayrımının yapılmasında kullanılabilir ve değerli bir metot olarak sunulmuştur (Fraga et. al., 2013).

Rutinde kullanılan bu yöntemlere bir alternatif olan LAMP, termal cykler gibi cihazlara ihtiyaç duymaması, kolay hazırlanması, sahada kullanım kolaylığı ile diğer yöntemlere göre bir üstünlüğe sahiptir. LAMP yöntemi daha önceden *M. hyorhinis* (Du, Liu, Wu, Xiong, Bai, Feng and Shao, 2013) ve *M. mycoides subsp. mycoides* (Mair, Vilei, Wade, Frey and Unger, 2013) için de karşılaştırmalı olarak denenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. LAMP yönteminin etkinliği çocuklardaki alt solunum yolları enfeksiyonu etkeni olan *M. pneumoniae* izolasyonunda gösterilmiştir (Ratliff et. al., 2014). LAMP metodu ile farklı çalışmalarda farklı mikroorganizmaların izolasyonu çalışılarak yöntemin etkinliği bu çalışmalarla da gösterilmiştir. Örneğin Tang ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı bir çalışmada, şüpheli Salmonella enfekte 115 ördeğe ait dokuda LAMP, PCR ve konvansiyonel kültür metodlarını karşılaştırmışlar; LAMP ve kültür metodu ile 8 karaciğer ve 3 dalak örneğini pozitif olarak belirlenmişken PCR ile 7 karaciğer ve 1 dalak örneğini Salmonella yönünden pozitif olarak bulmuşlardır (Tang et al., 2012)

LAMP metodu yapılan literatür taramalarında da belirtildiği üzere kolay uygulanabilir, hızlı bir amplifikasyon yöntemidir.

Bu tez çalışmasında konvansiyonel kültür metoduna alternatif olarak kullanılan DNA amplifikasyon metotlarından LAMP ve PCR, MG belirlenmesi yönünden karşılaştırılmıştır. Tez laboratuvar çalışmasının yürütüldüğü tarihte literatürde bulunan tek LAMP primerinin, OIE’de belirtien MGC2 bölgesini hedef alan PCR’ye göre alternatif olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır.. PCR metoduyla toplam 46 tane havuz örneği (her bir havuz 5 akciğer veya trakeadan oluşmaktadır)’nden akciğer için %32,6 (15 tane akciğer havuz örneği)’i ve trakea için %34,78 (16 tane trakea havuz örneği)’i MG varlığı yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Toplam 46 tane havuz örneğinden izole edilen DNA’ların LAMP metodu ile amplifikasyon sonucunda akciğerde %43,47 (20 adet akciğer havuz örneği) ve trakeada %60,87 (28 adet trakea havuz örneği) MG ‘ye özgü DNA varlığı belirlendi. Akciğer doku örneklerinde PCR ve LAMP tekniği arasında MG pozitiflik oranları arasında anlamlı fark bulunması, sahada LAMP tekniğinin akciğer doku örneklerinde MG varlığının belirlenmesinde kullanımının hatalı değerlendirmelere sebep olabileceği şeklinde yorumlandı. Bununla birlikte, trakea doku örneklerinde PCR ve LAMP tekniği için MG pozitiflik oranları arasında anlamlı fark bulunmaması bu tekniğin bu örneklerde MG varlığı tespiti amacıyla kullanılabileceğini desteklemiştir.

Yanlış pozitifliğin;

- Doku örneklerindeki kalıp DNA konsantrasyonunun düşük olabilme ihtimaline karşı, reaksiyon süresinin 45 dakika tutulması nedeniyle, primerlerin üst üste binmesi,
- Jel elektroforezi için, tüpleri tekrar açtığımızda, amplikonların kontaminyonu, (Liu et. al., 2017)
- Jel elektroforezde interkatalize olan boyalarda amplifikasyonların belirlenmesi sonucu gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

İki metod arasındaki anlamlı farkın, aynı bölgeleri hedef alan primer tasarımı kullanılması, PCR’de kullanılabilen florasen boyalarla işaretli problemlerin LAMP tekniğine uyarlanması (Liu et. al., 2017), dikkatli primer dizaynı ve optimal reaksiyon koşulların yerine gelmesi (Hardinge and Murray, 2019) ile azaltılabileceği düşünülmektedir. Uygun şekilde optimize edilmiş koşullarda, CRISPR-Cas teknolojisi yardımı ile de LAMP testlerinin özgüllüğü artırılarak yanlış pozitif sonuçların azaltılması sağlanabilmektedir (Trung et. al., 2022).

MG'nin 9 hafta altı yaş ortalamasına sahip kümeslerde görülmemesi, halihazırda damızlık kümeslerden MG negatif olarak gelen civcivlerin, ilerleyen yaşlarda, işletmedeki biyogüvenlik yönetiminin bir şekilde ihlali ya da gevşetilmesi yönünde yorumlanabilir. Bu durum, işletmenin organizasyonel ve biyogüvenlik politikalarının değerlendirilmesi ve şekillenmesi açısından önem arz etmektedir. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından hazırlanan Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği'ne göre düzenlenmektedir. Bu yönetmeliğe göre damızlık sürülerin MG varlığı yönünden negatif olması gerekmektedir. Sürülerde MG varlığı; serum aglütinasyon ve ELISA testi ile doğrulanır fakat serolojik testler yeterli olmamaktadır. Mikoplazma infeksiyonlarının tanısında altın standart izolasyon ve identifikasyondur (Kleven, 2008). Yani ELISA ve HI ile pozitif çıkan sürüler bakteriyolojik olarak ya da PCR ile doğrulanmalıdır (World Organisation for Animal Health, 2008).

Kültür, inkübasyon süresinin uzun olması ve örnekteki mikroorganizmaların canlı olmaması ya da diğer mikroorganizmalar tarafından üremenin baskılanabilmesi ihtimalleri nedeniyle bir yöntem olarak rutinde kullanılabilir olmaktan uzaktır (Ratliff et. al., 2014).

Moleküler tanı özellikle MG enfeksiyonlarında önem kazanmaktadır ve bununla ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Dovč, Benčina, Antes, & Mann, 1994; Garcia, Jackwood, Levisohn, & Kleven, 1995; Kempf, 1998; Marois, Dufour-Gesbert, & Kempf, 2002). Gelecekte geliştirilecek yeni teknikler ile MG varlığının tespitinde daha verimli, hızlı ve güvenilir tekniklere başvurulmasına ihtiyaç vardır. Aynı gen bölgesini hedef alan LAMP ve PCR primerlerinin kullanılacağı çalışmaların, iki tekniğin spesifikite ve sensitivitelerinin karşılaştırmaları açısından faydalı olacağı değerlendirilmektedir. 2015 yılında Zhang ve arkadaşlarının MG nin tespiti için geliştirdikleri ve optimize ettikleri pdhA bölgesini hedef alan LAMP ve PCR primerlerinin kullanıldığı bir çalışmada, LAMP yöntemi PCR' ye göre 10 kat daha fazla duyarlı bulunmuştur.

Saha şartlarında thermal cyler gibi cihazların kullanımının mümkün olmaması ya da kaynakları yetersiz laboratuvarlarda su banyosu veya kuru ısı bloğu ile amplifikasyon yapılmasına olanak sağlayan LAMP, uygulama kolaylığı açısından da avantaj sağlamaktadır. Tek tüpte isothermal mastermix kullanarak yapılan LAMP reaksiyonu tüplerin kapaklarının sadece bir kez açılması nedeniyle kontaminasyon açısından da en az riskli DNA amplifikasyonu metotlarından biridir. Saha şartlarında hızlı, spesifik ve

daha hassas tanıya olanak sağlayan LAMP ile hastalık tanısını koymanın yararlı olacağı düşünülmektedir. Bunun için de çalışmaya dikkat edilmeli, DNA kontaminasyonuna yol açabilecek durumlardan kaçınılmalı, temiz çalışmaya özen gösterilmeli, LAMP metodunun yanlış pozitifliğin engellenmesi için florasan boyalardan yararlanılması, sürenin uzun tutulmaması ve bu amaçla da optimum koşulların sağlanması için çalışmaların tekrarlanması ve optimize edilmesinin faydalı olacağı değerlendirilmektedir. Saha şartlarında MG her zaman önemli bir mikroorganizma olmuştur ve hızlı tespiti önem arz etmektedir. Bu amaçla moleküler metodlardan yararlanılması MG nin hızlı tespitine olanak sağlayan yeni moleküler metdoların da kullanılması için yeni çalışmaların planlanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Bu amaçla bu tez çalışması OIE'nin önerdiği PCR tekniğine alternatif olarak kullanılabileceği düşünülerek yürütülmüştür.

KAYNAKLAR

Altman, D. G., & Bland, J. M. (1991). Improving doctors' understanding of statistics. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A (Statistics in Society)*, 154(2), 223-248.

Ahmed, M. U., Hossain, M. M., & Tamiya, E. (2008). Electrochemical biosensors for medical and food applications. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 20(6), 616-626.

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

Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 286-306.

Balne, P. K., Basu, S., Rath, S., Barik, M. R., & Sharma, S. (2015). Loop mediated isothermal amplification assay using hydroxy naphthol blue, conventional polymerase chain reaction and real-time PCR in the diagnosis of intraocular tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(4), 568-571.

Carli, K. T., & Eyigor, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. *Avian diseases*, 47(3), 712-717.

Cardoso, T. C., Ferrari, H. F., Bregano, L. C., Silva-Frade, C., Rosa, A. C. G., & Andrade, A. L. (2010). Visual detection of turkey coronavirus RNA in tissues and feces by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) with hydroxynaphthol blue dye. *Molecular and cellular probes*, 24(6), 415-417.

CONTENT, F. E. O. V. M. (2011). OF CBPP VACCINES (Microtitration Method).

Czifra, G., Sundquist, B., Tuboly, T., & Stipkovits, L. (1993). Evaluation of a monoclonal blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*-specific antibodies. *Avian Dis.* (37), 680-688.

Dovč, P., Benčina, D., Antes, R., & Mann, W. (1994). Recombinant DNA probes and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* strains. *FEMS microbiology letters*, 122(1-2), 79-84.

Du GM, Liu MJ, Wu YZ, Xiong QY, Bai FF, Feng ZX, Shao GQ (2013). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma hyorhinis*. *Clin Lab* 59:1363–1371

Esendal Ö. Mikoplazma infeksiyonları (2002) Editörler: İZGÜR M, AKAN M. Kanatlı Hayvan Hastalıkları, 1. baskı, Medisan Yayın Serisi, Ankara, sayfa 79-95

Fraga, A. P., Vargas, T. De, Ikuta, N., Salvador, A., Fonseca, K., Celmer, Á. J., ... Lunge, V. R. (2013). A Multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma*

gallisepticum and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks, 510, 505–510.

Garcia, M., Jackwood, M. W., Levisohn, S., & Kleven, S. H. (1995). Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian diseases*, 606-616.

Ge, Y., Wu, B., Qi, X., Zhao, K., Guo, X., Zhu, Y., ... & Cui, L. (2013). Rapid and sensitive detection of novel avian-origin influenza A (H7N9) virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow device. *PloS one*, 8(8), e69941.

Glennsonger J, Karen W. Post, Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., syf:306-307, 2012.

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46(3), 167-172.

Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, J. G., & Thoen, C. O. (Eds.). (2008). Pathogenesis of bacterial infections in animals. John Wiley & Sons.

Hardinge, P., & Murray, J. A. (2019). Reduced false positives and improved reporting of loop-mediated isothermal amplification using quenched fluorescent primers. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

Hsieh, K., Patterson, A. S., Ferguson, B. S., Plaxco, K. W., & Soh, H. T. (2012). Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(20), 4896-4900.

Huang, L., Xie, Z., Xie, L., Deng, X., Xie, Z., Luo, S., ... & Feng, J. (2015). A duplex real-time PCR assay for the detection and quantification of avian reovirus and *Mycoplasma synoviae*. *Virology journal*, 12(1), 1-9.

Kahya Demirbilek, S. E. R. P. İ. L., Yilmaz, O., Eyigor, A. Y. Ş. E., Temelli, S., & Carlı, K. A. M. İ. L. (2015). Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by Real-Time PCRs and *Mycoplasma gallisepticum*-antibody detection by an ELISA in chicken breeder flocks. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 21(3).

Kaewphinit, T., Santiwatanakul, S., Jaratsing, P., Chansiri, K., Arunrut, N., & Kiatpathomchai, W. (2012, January). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick biosensor. In *The 4th 2011 Biomedical Engineering International Conference* (pp. 86-88). IEEE.

Kempf, I. (1998). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathology*, 27(1), 7-14.

Kleven, S. H. (2008). Invited Review — Control of Avian Mycoplasma Infections in Commercial Poultry, (140), 367–374.

Kleven, S. H., Morrow, C. J., & Whithear, K. G. (1988). Comparison of Mycoplasma gallisepticum strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.* (32), 731-741.

Kouzaki, Y., Maeda, T., Sasaki, H., Tamura, S., Hamamoto, T., Yuki, A., ... & Kawana, A. (2015). A simple and rapid identification method for Mycobacterium bovis BCG with loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*, 10(7), e0133759.

Kursa, O., & Woz, G. (2015). Rapid detection of Mycoplasma synoviae by loop - mediated isothermal amplification, 319–325. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1063-2>

Lauerman, L. H., Hoerr, F. J., Sharpton, A. R., Shah, S. M., & van Santen, V. L. (1993). Development and application of a polymerase chain reaction assay for Mycoplasma synoviae. *Avian Diseases*, 829–834.

Lee, M. F., Chen, Y. H., & Peng, C. F. (2009). Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA–hybridization assay for molecular detection of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Microbiological Methods*, 76(2), 174-180.

Liu, W., Huang, S., Liu, N. *et al.* (2017) Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci Rep* 7, 40125.

Mair G, Vilei EM, Wade A, Frey J, Unger H (2013) Isothermal loop- mediated amplification (LAMP) for diagnosis of contagious bovine pleuro-pneumonia. *BMC Vet Res* 9:108

Marois, C., Dufour-Gesbert, F., & Kempf, I. (2002). Polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma gallisepticum in environmental samples. *Avian pathology*, 31(2), 163-168.

Mohandas, S. S., Muthuchelvan, D., Pandey, A. B., Biswas, S. K., Chand, K., Venkatesan, G., ... & Mondal, B. (2015). Development of reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bluetongue viruses. *Journal of virological methods*, 222, 103-105.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1), 150-154.

Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. J. M. C. P. (2002a). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*, 16(3), 223-229.

Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. J. M. C. P. (2002b). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular*

probes, 16(3), 223-229.

Njiru, Z. K. (2012). Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. PLoS neglected tropical diseases, 6(6), e1572.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA, 28(12).

Jeon, Y. S., Park, S. C., Lim, J., Chun, J., & Kim, B. S. (2015). Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform. Journal of Microbiology, 53(1), 60-69.

OIE Terrestrial Manual 2018. (tarih yok). Nisan 20, 2021 tarihinde <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>:https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf adresinden alındı

Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F., & Morita, K. (2004). Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. Journal of clinical microbiology, 42(1), 257-263.

Pham, N. T. K., Trinh, Q. D., Khamrin, P., Ukarapol, N., Kongsricharoern, T., Yamazaki, W., ... & Ushijima, H. (2015). Application of the LAMP method for the detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Thai children with diarrhea. Japanese journal of infectious diseases, JJID-2014.

Swayne, D. E. (2013). Diseases of poultry. John Wiley & Sons

Safavieh, M., Kanakasabapathy, M. K., Tarlan, F., Ahmed, M. U., Zourob, M., Asghar, W., & Shafiee, H. (2016). Emerging loop-mediated isothermal amplification-based microchip and microdevice technologies for nucleic acid detection. ACS biomaterials science & engineering, 2(3), 278-294.

Qingyi S, Congyan L, Qianqian F, Wei S, Yibao N, Liangquan Z, Fang W. (2013). J Microbiol, Acta Microbiologica Sinica 53(12) :1347 — 1352.

T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. (2007b). *Teşhiste Metot Birliği*.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., & FitzPatrick, E. S. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley & Sons.

Ratliff AE, Duffy LB, Waites KB (2014) Comparison of the illumigene *Mycoplasma* DNA amplification assay and culture for detection of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 52:1060–1063

Swayne, D. E. (2013). Diseases of poultry. John Wiley & Sons.

T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Kuluçkahane Ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği Uygulama Talimatı (2007). Retrieved from https://www.tarim.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Talimatlar/gkgm/kuluckahane_damizlik_

Tang, T., Cheng, A., Wang, M., Li, X., He, Q., Jia, R., ... Chen, X. (2011). Development and clinical verification of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of Salmonella species in suspect infected ducks.

Tang, T., Cheng, A., Wang, M., Li, X., He, Q., Jia, R., ... & Chen, X. (2012). Development and clinical verification of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of Salmonella species in suspect infected ducks. *Poultry science*, 91(4), 979-986.

Tezel A., Burkan T. Z., Özkök S., Akçelik E. N, Çalım H. D., Koluman A., (2010) Tek tüpte mikrobiyolojik tanı loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi Cilt:1 Sayı: 1,

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols*, 3(5), 877-882.

Trung, N. T., Son, L. H. P., Hien, T. X., Quyen, D. T., Bang, M. H., & Song, L. H. (2022). CRISPR-Cas12a combination to alleviate the false-positive in loop-mediated isothermal amplification-based diagnosis of Neisseria meningitidis. *BMC infectious diseases*, 22(1), 1-5. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Services August 2014, National Poultry Improvement Plan Program Standards,

Wang, J. (2006). Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(10), 1887-1892.

Wang D, Wang Y, Xiao F, Guo W, Zhang Y, Wang A, Liu Y.,(2015) A comparison of in-house real-time lamp assays with a commercial assay for the detection of pathogenic bacteria, *Molecules* 20, 9487-9495; doi:10.3390/molecules20069487

Whithear, K. G. (1996). Control of avian mycoplasmoses by vaccination. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(4), 1527-1553.

World Organisation for Animal Health. (2008). AVIAN MYCOPLASMOSIS. In *OIE Terrestrial Manual* (pp. 482–496). Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.05_AVIAN_MYCO.pdf

World Organisation for Animal Health. (2017). OIE Listed Disease 2017. Retrieved from <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>

Woźniakowski, G., & Samorek-Salamonowicz, E. (2014). Direct detection of Marek's disease virus in poultry dust by loop-mediated isothermal amplification. *Archives of virology*, 159(11), 3083-3087.

Wang, Y., Li, H., Wang, Y., Zhang, L., Xu, J., & Ye, C. (2017). Loop-mediated isothermal amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for

detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 8, 192.

Zeng, L., Lie, P., Fang, Z., & Xiao, Z. (2013). Lateral flow biosensors for the detection of nucleic acid. In *Nucleic Acid Detection* (pp. 161-167). Humana Press, Totowa, NJ.

Zhang, F., Bao, S., Yu, S., Cheng, J., Tan, L., Qiu, X., ... & Ding, C. (2015). Development of a loop-mediated isothermal amplification targeting a gene within the pyruvate dehydrogenase complex, the *pdhA* gene, for rapid detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(3), 260-267.

Zhao X, Li Y, Wang L, You L, Xu Z, Li L, He X, Liu Y, Wang J, Yang L., (2010) Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples, *Mol Biol Rep* 37:2183–2188 DOI 10.1007/s11033-009-9700-6

