

Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* infeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile teşhisi

Seyda CENGİZ¹, Orkun BABACAN², Gökçen DİNÇ³, Mehmet AKAN²

¹Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

³Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

Geliş Tarihi / Received: 20.05.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 07.09.2011

Özet: *Mycoplasma gallisepticum* tavuklarda önemli ekonomik kayıplara neden olarak, vertikal ve horizontal yayılım gösterir. Bu etkenin teşhisi için pek çok metod kullanılmasına rağmen PCR temelli teşhis metodları ile izolasyona gerek kalmadan infeksiyon izlenebilir, yüksek duyarlılıkta hızlı sonuç alınabilir. İncelenen 26 kümesin 14 (%53,8)'ü *M.gallisepticum* yönünden pozitif bulundu. Materyal orijini dikkate alındığında 14 broyler kümeleden alınan trachea örneklerinin 28 adetinden pozitif sonuç alınırken bu kümelere ait tracheal svab örneklerinden sadece 5 (%19,2) küme ait olanlarda *M.gallisepticum* spesifik DNA varlığı saptandı. Bu bulgu özellikle örnekleme aşamasında mikoplazma infeksiyonu şüpheli kümeslerden hem trachea hem de svab örneklerinin alınmasının yararlı olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar PCR metodunun kullanılması ile *M.gallisepticum* infeksiyonlarının daha kısa sürede ve daha spesifik olarak teşhis edilebileceğini ve trachea örneklerinin tracheal svab örneklerine göre daha fazla pozitiflik sağladığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Mycoplasma gallisepticum*, PCR, Tavuk.

Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens by polymerase chain reaction (PCR)

Summary: *Mycoplasma gallisepticum* causes important economic losses and it spreads vertically and horizontally in chickens. Although a lot of methods are used for detection of this bacterium, agents can be obtained and sensitive and rapid result can be achieved by PCR based diagnosis method regardless of isolation. In this study, trachea and tracheal swab samples collected from various broiler flocks were evaluated. 14 of 26 investigated flocks (%53,8) were found to be *M.gallisepticum* positive. 28 of all trachea samples from 14 flocks and tracheal swabs which were taken 5 (%19,2) flocks considered to be positive. This result showed that *M.gallisepticum* infections can be diagnosed rapidly and more specifically and more positive results can be achieved in tracheal organ samples than tracheal swabs.

Key words: Chicken, *Mycoplasma gallisepticum*, PCR.

Giriş

Mycoplasma gallisepticum tavuklarda solunum sistemi infeksiyonu ile seyreden klinik bulguların yanında, broylerde karkas ağırlığının düşmesine, yumurtacı hayvanlarda yumurta veriminin azalmasına neden olan, genç hayvanlarda hareket ve canlılığın kaybolması, artrit, tenosynovitis ile seyreden bir infeksiyondur (6, 11, 12).

Hayvanlarda konjunktivitis, öksürük, sinuslarda şişme, burun akıntısı, gözyaşı akıntısı gibi klinik bulgular ile seyreder. İnfeksiyon yumurta yolu ile vertikal bulaşma göstermesinin yanında, hayvanlar arasında temas yolu ile lateral bulaşma da meydana gelir. Newcastle, İnfeksiyöz Bronşitis gibi viral in-

feksiyonlar ya da *E.coli* gibi bakteriyel infeksiyonlar ile komplike olduğunda klinik bulgular ağırlaşır. Nekropside burun, trachea ve akciğerlerde mukus birikimi, hava keselerinde matlaşma, kalınlaşma görülür. Deneysel infeksiyonlarda 6-21 gün süren bir inkübasyon süresi bulunurken, doğal infeksiyonlarda hayvanın immun sistemi iyi ise hayvanlar herhangi bir stresle karşılaşınca kadar asemptomatik taşıyıcı olarak kalırlar (2, 4-6, 12).

İnfeksiyonun teşhisi için kültür ve seroloji yöntemlerinin yanında PCR temelli metodlar da kullanılmaktadır. Özellikle infeksiyonun vertikal yolla bulaşması bu etkenin erken dönemde teşhisini gerektirir. Bu amaçla kullanılan kültür ve serolojik metodlarda problemler görülebilmektedir. Etke-

nin kültüre edilmesi aşamasında kültür metodunun uzun sürmesi aynı zamanda kontaminasyon riskinin bulunması, serolojik testlerde ise hatalı negatif ya da pozitif sonuçların alınması, kros reaksiyonların olması enfeksiyonun teşhisi aşamasında PCR tabanlı teşhis metodlarını daha kullanışlı hale getirmektedir. (1, 5, 8, 13, 15).

PCR temelli teşhis metodlarının kullanımı ile etken izolasyonuna gerek kalmadan etkenin izlenmesi, yüksek duyarlılık ve hızlı teşhis ile sonucun alınması sağlanır. Kanatlı endüstrisinde avian patojenik mikoplazmaların birden fazla türde olmaları ve bazı durumlarda miks enfeksiyon oluşturmaları PCR amplifikasyonu gibi yöntemlerin uygulanmasını önemli hale getirir (9, 11, 16).

Hastalığın teşhisi için enfeksiyonun görüldüğü hayvanlardan doku ve organlar alınırken, solunum yolu eksudatlarından da svab örnekleme yapılmaktadır. Örnekler canlı hayvanlardan alınabileceği gibi yeni ölmüş hayvanlardan ya da öldükten sonra hemen dondurulmuş hayvanlardan alınmaktadır. Farinks, kloaka, trachea, sinus ve özefagusdan svab örnekleme yapılabilir (5, 12, 15, 18).

PCR için en sık kullanılan örnekleme metodu ise tracheal svab örneklemesidir. Bunun için örnekler alındıktan sonra buzdolabında saklanarak DNA lizisi engellenmelidir (16).

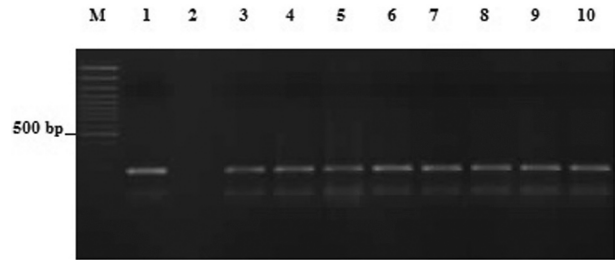
Bu çalışmada broyler kümeslerden alınan trachea ve tracheal svab örneklerinde PCR metodu ile *M.gallisepticum* varlığı araştırıldı.

Materyal ve Metot

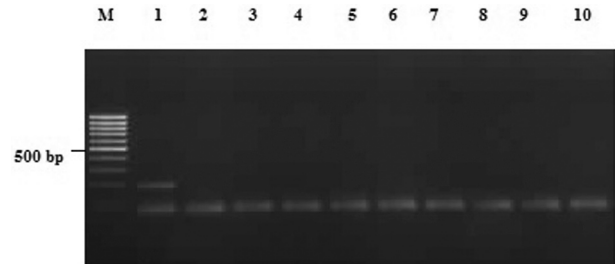
Bu çalışmada Bolu-Adapazarı illerindeki kesim aşamasına (40-45 günlük) gelmiş solunum sistemi problemi olan 26 adet broyler kümesinden 52 trachea örneği ve 141 adet transport mediumsuz tracheal svab örneği alındı. Kümeden alınan iki adet tracheal örneği bir materyal olarak değerlendirildi. Aynı şekilde her kümeden alınan tracheal svab örnekleri de birleştirilerek incelendi. Materyaller, OIE'nin *M.gallisepticum* için hazırladığı DNA ekstraksiyon metodu ve PCR protokolüne göre incelendi (14). Kontrol suşu olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan sağlanan *M.gallisepticum* suşu kullanıldı. PCR işlemi sonucunda 185 bp büyüklüğünde bandların görülmesi, materyalde *M.gallisepticum* varlığını gösterdi.

Bulgular

Çalışma kapsamında alınan 26 kümesin trachea örneklerinden 14 (%53.8) küme ait olan materyallerde spesifik bandlar saptanırken (Şekil 1), tracheal svab örneklerinde ise yalnızca 5 (%19.2) küme ait materyallerde *M.gallisepticum* yönünden pozitiflik bulundu (Şekil 2). Bu bulgu, tavuklarda *M.gallisepticum* enfeksiyonlarının saptanmasında tracheal örneklerin svab örneklerine göre daha uygun olduğunu gösterdi.



Şekil.1. Tracheal örneklerde *M.gallisepticum* araştırılmasında PCR işlemi sonucunda jel elektroforezde örnek görüntü M: Marker (100 bp Fermentase), 1: Pozitif Kontrol, 2: Negatif Kontrol, 3-10: Trachea Örnekleri.



Şekil.2. Tracheal svab örneklerinde *M.gallisepticum* araştırılmasında PCR işlemi sonucunda jel elektroforezde örnek görüntü M: Marker (100 bp Fermentase) 1: Pozitif Kontrol, 2: Negatif Kontrol, 3-10: Tracheal Svab Örnekleri.

Tartışma ve Sonuç

Mikoplazma enfeksiyonları kanatlı hayvanlarda verim düşüklüğünün yanında vertikal yolla bulaşma göstermesi nedeniyle eradikasyon gerektiren bir problemdir. Bu enfeksiyonun en kısa sürede tespit edilmesi sürü bazında yetiştiriciliğin yapıldığı tavukçuluk sektöründe oldukça önemlidir. Bu amaçla kültür ve serolojik taramaların uzun süre alması, serolojik taramalarda hatalı sonuçların alınması gibi problemleri ortadan kaldırmak ve kısa sürede daha spesifik sonuçların alınmasını sağlamak amacıyla PCR tabanlı teşhis metodları kullanılmaktadır.

M.gallisepticum infeksiyonunun teşhisinde PCR metodunu kullanarak yapılan çalışmalarda farklı bulgular elde edilmiştir.

Ürdün'de Gharabeh ve Roussan tarafından yapılan çalışmada, araştırmacılar, 76 ticari broyler kümesinden yapılan örneklemede 24 adet *M.gallisepticum* izolatu elde etmişlerdir (9).

Roussan ve ark. (17), 115 kümes de yaptıkları MG taramasında PCR ile 25 kümesde infeksiyon belirlemişlerdir. Benbahan ve ark. (4), ise PCR tekniğinin kullanarak 100 trachea örneğini MG yönünden değerlendirmişler ve 55 adet örnekte pozitiflik saptamışlardır. Buim ve ark. (5), 33 ticari kanatlı çiftliğinden topladıkları 1046 örnekte Multiplex PCR metodu ile 21 adet hayvanda *M.gallisepticum* için pozitiflik belirlerken, 36 adet hayvanda *M.gallisepticum* F suşu bulmuşlar, 33 çiftlikten 4 adedinde sürü pozitifliğine rastlamışlardır. Evans ve ark. (7), Mikoplazma infeksiyonunun teşhisi için yaptıkları kültür ve PCR teşhis yönteminde kültür ile 30 örnekte 14 adet pozitiflik bulurken, PCR ile 11 adet pozitiflik belirlemişlerdir. Bağcıgil (3), 96 adet tavukta *M.gallisepticum* için yaptığı PCR teşhisinde 47 adet hayvana ait trachea örneğinde etken spesifik DNA bildirmiş, etkenin kültüre edilmesinin uzun zaman alması nedeniyle PCR metodunun kısa sürede ve spesifik sonuç vermesi bakımından güvenilir olduğunu belirtmiştir. Bu sonuç da PCR temelli moleküler tekniklerin MG şüpheli kümeslerde hızlı ve kullanışlı bir teşhis metodu olduğunu göstermektedir.

Levisohn ve Kleven (14), özellikle antibiyotik kullanım durumlarında kültür ile tespit edilemeyen etkenlerin moleküler teşhis metodları ile kolaylıkla saptanabileceğini belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar moleküler metodların özellikle kontaminasyon ya da sekonder bakteriyel infeksiyonların varlığında değerinin daha fazla arttığını da bildirmişlerdir. Kâhya ve ark. (10), yaptıkları realtime PCR işleminde ise 646 tracheal svab örneğinde 73 adet pozitiflik saptamışlar ve bu metodun tavuk kümeslerindeki MG infeksiyonlarının teşhisinde kullanılabilirliğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da 26 kümeden alınan toplam 52 trachea örneğinde 14 (%53,8) kümes ait pozitiflik bulunurken, 141 tracheal svab örneğinde 5 (%19,2) kümes ait örneklerde pozitiflik bulundu. Bu bulgular araştırmacıların moleküler bulguları ile paralellik göstermektedir.

Svap örnekleme için Zain ve ark. (18), tarafından yapılan çalışmada kuru ve ıslak svablar ile tracheal örnekleme yapılarak, *M.gallisepticum*'a PCR ile bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ıslak svablarla yapılan örneklemede pozitif bulunan örnek sayısı, kuru svablarla yapılan örneklemedeki pozitiflikten daha fazla bulunmuştur. *M.gallisepticum*'un kuru svablarda hayatta kalma süresinin oda ısısında veya +4°C'de 24 saatten daha kısa olduğu, ıslak svablarda ise bu sürenin en az 24 saat olduğu belirlenmiştir.

Levisohn ve Kleven (14), ise trachea örnekleme için *M.gallisepticum*'un teşhisinde diğer organlara göre daha sık tercih edilen örnekleme olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar özellikle infeksiyonun akut fazında *M.gallisepticum*'un en yüksek seviyede olduğunu, humoral veya lokal bağışıklık durumlarında da infeksiyonun persiste halde tracheada belirlenebildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada yapılan örneklemede ise trachea ile tracheal svab örnekleme karşılaştırılmış ve trachea örneklerindeki pozitifliğin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu bulgu trachea örneklerinin *M.gallisepticum*'un teşhisinde uygun bir materyal olduğu bulguları ile uyumludur.

Sonuç olarak yapılan değerlendirmelerde, PCR metodunun kullanılması ile *M.gallisepticum* infeksiyonlarının daha kısa sürede ve daha spesifik olarak teşhis edilebileceğini, tavuklarda *M.gallisepticum* infeksiyonlarının PCR ile teşhisinde tracheal örneklerin tracheal svab örneklerine göre daha uygun bir materyal olduğu belirlendi.

Kaynaklar

1. Anonim, (2008). *Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum, M. Synoviae) in OIE Terrestrial Manual Online*. Chapter. 2.3.5. p. 482-496. Erişim adresi: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf, Erişim tarihi: 25.04.2011.
2. Anonim, (2007). *Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum), Pleuropneumonia-like Organism (PPLo) Infection, Chronic Respiratory Disease, Infectious Sinusitis, House Finch Conjunctivitis*. Erişim adresi: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/avian_mycoplasmosis_mycoplasma_gallisepticum.pdf, Erişim tarihi: 20.04.2011.
3. Bağcıgil F, (2002). *Tavuklarda mycoplasma gallisepticum infeksiyonunun tanısında bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerin polymerase chain reaction (PCR) ile karşılaştırılması*. Doktora Tezi. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. İstanbul.

4. **Behbahan GG, Asasi K, Afsharifar AR, Poubakhsh SA,** (2005). *Isolation and detection of Mycoplasma gallisepticum by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.* Iranian J Vet Res Uni Shiraz. 6, 35-41.
5. **Buim MR, Mettifogo E, Timenetsky J, Kleven S, Ferreira AJP,** (2009). *Epidemiological survey on Mycoplasma gallisepticum and M.synoviae by Multiplex PCR in commercial poultry.* Pesq Vet Bras. 29, 552-556.
6. **Esendal Ö,** (2002). *Mikoplazma İnfeksiyonları. Kanatlı Hayvan Hastalıkları.* Edt: İzgür M, Akan M. Medisan, Ankara.p.79-85.
7. **Evans JD, Thornton DL, Branton SL,** (2009). *Diagnosis of Mycoplasma gallisepticum from broiler Breeder Flock: Comparison of Three Diagnostic Methods.* Int J Poult Sci. 8, 104-107.
8. **Feberwee A, Mekkes DR, Wit JJ, Hartman EG, Pijpers A,** (2005). *Comparison of Culture, PCR and Different Serologic Tests for Detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae Infections.* Avian Dis. 49, 260-268.
9. **Gharaibeh S, Roussan D,** (2008). *The Use of Molecular Techniques in Isolation and Characterization of Mycoplasma gallisepticum from Commercial Chickens in Jordan.* Int Poult Sci. 7, 28-35.
10. **Kahya S, Temelli S, Eyigör A, Çarlı KT,** (2010). *Real-Time PCR culture and serology for diagnosis of Mycoplasma gallisepticum in chicken breeder flocks.* Vet Microbiol. 144, 319-324.
11. **Khan MI,** (2003). *Multiplex PCR of Avian Pathogenic Mycoplasmas. Methods in Molecular Biology.* Edt: Sachse K, Frey J. 216, 223-229.
12. **Kleven SH, Jordan FTW, Bradbury JM,** (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Avian Mycoplasmosis.* Fifth edition. Paris: Office International des Epizooties, Chapter 2.7.3. p.1-24.
13. **Levisohn S,** (2000). *Avian Mycoplasmosis Biotechnology Applied in Peru.* Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan Israel.
14. **Levisohn S, Kleven SH,** (2000). *Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum).* Rev Sci Tech Off Epiz. 19, 425-442.
15. **Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I,** (2002). *Polymerase Chain Reaction for Detection of Mycoplasma gallisepticum in enviromental samples.* Avian Pathol. 31, 163-168.
16. **Moalic P,** (2002). *Improving mycoplasmosis control using PCR technology.* World Poult. 18, 38-39.
17. **Roussan D.A, Haddad R, Khawaldeh G,** (2008). *Molecular Survey of Avian Respiratory Pathogens in Commercial Broiler Chicken Flocks with Respiratory Disease in Jordan.* Poult Sci. 87, 444-448.
18. **Zain ZM, Bradbury JM,** (1996). *Optimising the conditions for isolation of Mycolasma gallisepticum collected on applicator swabs.* Vet Microbiol. 49, 45-57.