



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Yumurtacı tavuk işletmelerinde *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun çabuk serum aglütinasyon, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleriyle araştırılması

Kamile Kesler^{1*}, Leyla Güler², Gülşen Orhan³

¹Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, 42080, Meram, Konya,

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Burdur,

³Ceren Veterinerlik ve Laboratuvar Hizmetleri, Konya, Türkiye

Geliş: 14.11.2012, Kabul: 20.12.2012

*kamilekesler@yahoo.com

Özet

Kesler K, Güler L, Orhan G. Yumurtacı tavuk işletmelerinde *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun çabuk serum aglütinasyon, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleriyle araştırılması. *Eurasian J Vet Sci*, 2013, 29, 2, 76-81

Amaç: Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* (MG)'un neden olduğu kronik solunum yolu hastalığı (CRD) et ve yumurta verimi düşüklüğü nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışmada, yumurtacı tavuklarda MG enfeksiyonu çabuk serum aglütinasyon (ÇSA), kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 24 haftalıktan büyük 15 ticari yumurtacı işletmede, her birinden 25 adet olmak üzere 375 kan serumu serolojik teşhis için ÇSA ile 73 tavuğun trakea (nekropsisi öncesi ve sonrası), hava kesesi ve akciğerlerinden alınan toplam 292 svab örneği MG izolasyonu yönünden ve aynı svab örneklerinin inkübasyon sonrası sıvı kültürleri ile tavuklardan canlı iken alınan 73 trakea svab örneği doğrudan PCR ile test edildi.

Bulgular: İşletmelerin 13 (%86.6)'ünde kan serumlarında %12-100 arasında pozitiflik tespit edilirken 2 (%13.3)'sine ait serumlar ÇSA ile negatif bulundu. Svab örneklerinin kültürü sonucu 3 (%20) işletmede 3 tavuktan MG izole edildi. Sıvı kültürlerinden yapılan PCR testinde 7 (%46.6) işletmeye ait 9 (9/73) tavukta, canlı hayvanlardan alınan 73 trakeal svabdan 2 (%13.3) işletmeye ait 2 tavukta MG spesifik DNA'sı tespit edildi. İşletmelerin çoğu serolojik olarak pozitif bulunurken izolasyon ve PCR ile etken tespit oranının düşük olması, klinik bulgularla birlikte değerlendirildiğinde bu işletmelerde kronik bir enfeksiyona işaret etmektedir.

Öneri: Tavuklarda MG enfeksiyonunun teşhisi için serolojik testlerin tek başına yeterli olmadığı, geçirilmiş bir enfeksiyona ait antikorların kan serumunda uzun süre bulunmasından dolayı ticari işletmelerde geçirilmekte olan bir hastalık probleminin tespiti ve tedavi kararı için serolojik bulguların PCR ve/veya kültür ile doğrulanması uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: Tavuk, *Mycoplasma gallisepticum*, izolasyon, ÇSA, PCR

Abstract

Kesler K, Guler L, Orhan G. Investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infection in layer flocks by rapid serum agglutination, culture and polymerase chain reaction methods. *Eurasian J Vet Sci*, 2013, 29, 2, 76-81

Aim: Chronic respiratory disease of chickens caused by *Mycoplasma gallisepticum* (MG) causes significant economic losses to poultry industry due to decreased meat and egg production. In this study MG infection in layer flocks was investigated by rapid serum agglutination (RSA), culture and polymerase chain reaction (PCR) methods.

Materials and Methods: A total of 375 chicken sera from 15 commercial layer flocks older than 24 weeks, 25 sera per flocks, were tested by RSA. Tracheal (before and after necropsy), air sac and lung swabs of 292 samples collected from 73 chickens were tested for MG isolation. Culture broths of 292 samples and 73 tracheal swabs directly from live chickens were tested by PCR.

Results: In 13 (86.6%) of 15 flocks a seropositivity rate between 12 to 100% was detected by RSA while all sera from 2 (13.3%) of flocks were found negative. MG was isolated from 3 of 73 chickens belong to 3 (20%) flocks. In 292 culture broths, 9 of 73 chickens from 7 (46.6%) flocks and in 2 of 73 tracheal swabs of live chickens from 2 (13.3%) flocks were PCR positive. Although serology was positive in majority of flocks, detection rate of microorganism or DNA was low. When evaluated with clinical findings the results indicate a presence of chronic infection in these flocks.

Conclusion: In the diagnosis of MG infection of chickens, serological tests are not sufficient alone because antibodies remain for a long time after infection. Therefore, for the diagnosis of clinical infection and therapy decisions in commercial flocks, serological findings in the flock should be supported by PCR and/or culture.

Keywords: Chicken, *Mycoplasma gallisepticum*, isolation, RSA, PCR





Giriş

Tavuklarda et ve yumurta verimi düşüklüğüne neden olan kronik solunum sistemi hastalığı (CRD) ülkemizde kanatlıların önemli hastalıklarından biridir. Büyük kapasiteli işletmelerin ve parent stok yetiştiren modern damızlık işletmelerin sayısının giderek artması nedeniyle hastalığın kanatlı yetiştiriciliğinde neden olduğu ekonomik kayıplar daha da artmaktadır. Ülkemizde endemik olarak görülen bu enfeksiyondan damızlık işletmelerin ari olması gerekmekte olup Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından bir kontrol programı uygulanmaktadır (Anonim 2007).

Hastalık etkeni *Mycoplasma gallicepticum* (MG) Mollicutes sınıfında Mycoplasmataceae familyasında yer almaktadır ve kanatlılarda hastalık yapan en önemli patojenik mikoplazma olarak kabul edilmektedir (OIE 2008). Tavuklarda enfeksiyon yakın temas sonucunda horizontal veya enfekte yumurtalarla vertikal olarak bulaşmaktadır, ancak insanlar ve ekipmanlar vasıtasıyla dolaylı bulaşma da olabilmektedir (İzgür 1983, Kleven 1998). MG enfeksiyonunda klinik belirtiler diğer faktörlere de bağlı olarak akut solunum sistemi hastalığı belirtilerinin görüldüğü klinik formdan subklinik forma kadar değişiklik gösterebilir. Gençler daha fazla etkilenmekte olup trakeal sesler, burun akıntısı ve öksürük gibi karakteristik bulgular özellikle genç hayvanlarda görülmektedir (Esendal 2002, OIE 2008). Kronik ve asemptomatik enfeksiyonlar daha yaygındır ve üretim kayıpları nedeniyle daha büyük önem taşır (Nascimento 2005). Yumurtacı kümeslerde yumurta verimi düşer ve genellikle düşük düzeyde devam eder. Ancak hayvanlar genç yaşta enfeksiyonu geçirmişlerse kümeslerde açık klinik belirtiler görülmeksizin enfeksiyona ilişkin sadece serolojik pozitiflik bulunur. Broyler kümeslerde vakalar daha çok 4-8 haftalık iken görülür. Birlikte görülen diğer enfeksiyonlar ve çevresel faktörlere bağlı olarak yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden ağır vakalar görülebilir (Ley 2003).

MG enfeksiyonunun doğal şartlarda çoğunlukla diğer enfeksiyonlarla komplike olduğu bildirilmektedir. Newcastle, enfeksiyöz bronşitis, kolibasilozis gibi sekonder viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, ayrıca kümes şartlarının kötülüğü, ani hava değişiklikleri, aşılama ve diğer stres oluşturan durumlar hastalığın şiddetini artırmaktadır (Güler 1995, Ley 2003, OIE 2008)

MG enfeksiyonunun teşhisinde bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon, serolojik testler ve moleküler teşhis yöntemleri kullanılmaktadır. Her bir yöntemin bazı avantaj ve dezavantajları vardır. MG'ü üretmek için kompleks, zenginleştirilmiş besiyerlerine gerek vardır (Jordan 1983). Tüm besiyerleri temel

olarak bir protein infüzyon besiyerine %10-15 at veya domuz serumu, maya faktörleri, glukoz, arginin ve bakteriyel inhibitörlerin ilavesiyle hazırlanmaktadır (İzgür 1983, Erdağ ve Türkaslan 1988, Türkaslan ve Salıhoğlu 1989).

Serolojik testlerden genel olarak sürü taramalarında yararlanılmakta olup aynı zamanda klinik örneklerin laboratuvar teşhisi amacıyla da kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan testler çabuk serum aglütinasyon testi (ÇSA), hemaglutinasyon inhibisyon (HI) ve ELISA testleridir (OIE 2008). Enfekte hayvanlar ÇSA ile enfeksiyondan en erken 7-10 gün sonra pozitif olabilir. ÇSA kolay, ucuz, sensitif ve kısa sürede çok sayıda örneğin test edilebilmesine olanak tanınması nedeniyle tarama testi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Ley 2003). Ancak ÇSA pozitif reaktörlerin diğer serolojik testler ve kültür ile doğrulanması gerekmektedir. ÇSA testinin en önemli dezavantajı spesifitesinin düşük olmasıdır (yanlış pozitif reaksiyonlar). Bunların bir kısmı antijenin üretildiği besiyerlerinden kaynaklanmaktadır. Hayvanlara diğer enfeksiyonlara karşı uygulanan inaktif aşılar ve MG'un diğer mikoplazma etkenleri ve bakterilerle kros reaksiyonlara neden olabilecek ortak antijenik epitoplara sahip olması da bu test ile yanlış pozitif reaksiyonlara neden olmaktadır (Yoder 1989, Kleven ve Levisohn 1996). HI testi ÇSA ve ELISA'dan daha spesifik fakat daha az duyarlıdır. Enfekte hayvanlar bu test ile ancak 3 hafta ve daha sonra pozitif reaksiyon verebilir. Ayrıca MG suşları arasında HI ile tespit edilen antijenik varyasyonlar mevcuttur. ELISA ile pozitiflik ÇSA test aktivitesinden hemen sonra (enfeksiyondan yaklaşık 2 hafta sonra) gelişmekte olup ticari test kiti bulunmamaktadır. ELISA ile de nonspesifik pozitif reaksiyonlar görülebilmektedir (Kleven ve Levisohn 1996). Aynı veya farklı serolojik testler arasındaki uyumsuzluğun bir diğer nedeni de MG suşları arasında görülebilen genotipik veya fenotipik farklardır (Khan ve ark 1987, Fan ve ark 1995, Kleven ve Levisohn 1996, Nascimento ve ark 2005).

Enfeksiyonun kesin teşhisi için kültür yöntemi kullanılmaktadır. Kültür ile pozitif sonuçlar genelde 4-7 gün arasında alınmasına rağmen kesin negatif sonuçlar için daha uzun süre beklenmesi gerekmektedir (Kleven ve Levisohn 1996). Mikoplazmaların kültürünün zaman alıcı olmasının yanı sıra, özel besiyerlerine ihtiyaç olması, sıklıkla çabuk üreyen ve patojen olmayan mikoplazmalar ve diğer bakterilerle kontaminasyonların etkenin üremesini baskılaması, antibiyotik kullanımı ve örneklerin laboratuvara uygun şartlarda ve süre içinde getirilmemesi gibi nedenlerle mikroorganizmaların canlılığını yitirmesi gibi problemler bu yöntemin dezavantajları olarak belirtilebilir (Türkaslan ve Salıhoğlu 1989, Ülgen 1991, Kleven ve Levisohn 1996, Pang ve ark 2002).

Tablo 1. Kültür ve PCR yöntemleri ile incelenen örnekler ve *M. gallisepticum*'un tespit edilme oranları.

Örnek alınan Organlar	Kültür		PCR direkt svabdan		PCR sıvı kültür besiyerinden	
	Örnek sayısı	Pozitif sayısı	Örnek sayısı	Pozitif sayısı	Örnek sayısı	Pozitif sayısı
Trakeal svab (Canlı tavuklardan)	73	1	73	2	73	2
Trakeal svab (Nekropsi sonrası)	73	1	-	-	73	5
Akciğer	73	-	-	-	73	1
Hava kesesi	73	1	-	-	73	1
Toplam	292	3 (%1)	73	2 (%2.73)	292	9 (%3)



Tablo 2. Kümes bazında test edilen tavukların serolojik, kültür ve PCR bulguları.

İşletme No	Kan serumu RSA testi			Kültür (292 svab)	PCR (73 direkt svab)	PCR (292 kültür buyyonu)
	Örnek sayısı	Pozitif	Negatif	Test edilen tavuk sayısı	İzole edilen	Tespit edilen
1	25	8	17	5		
2	25	7	18	5		
3	25	3	22	3	1	1 (Tr)
4	25	4	21	5		1 (Hk)
5	25	-	25	5		
6	25	-	25	5		
7	25	5	20	5		1 (Tr)
8	25	7	18	5		
9	25	4	21	5		
10	25	10	15	5		1 (Akc)
11	25	25	-	5	1	2 (Tr)
12	25	25	-	5	1	1 (Tr)
13	25	15	10	5		1 (Tr)
14	25	7	18	5		
15	25	20	5	5		1 (Tr)
Toplam	375	153 (%40.8)	222 (%59.2)	73	3 (%4.1)	2 (%2.7)
						9 (12.3)

Tr: Trake, Hk: Hava kesesi, Akc: Akciğer.

Serolojik testler ve kültür yöntemlerinin belirtilen dezavantajları nedeniyle daha çabuk, güvenilir ve ekonomik teşhis yöntemlerine duyulan ihtiyaç sonucu DNA tespitine dayanan PCR yöntemleri kullanılmaya başlamıştır. (Slavik ve ark 1993, Salisch ve ark 1998, Moalic 2002). Aynı zamanda birden fazla türün aynı anda tespit edildiği multipleks PCR (Garcia ve ark 1995, Wang ve ark 1997) yöntemleri ve son yıllarda daha duyarlı ve kısa sürede sonuç veren real time PCR (Callison ve ark 2006, Raviv ve ark 2008) yöntemleri uygulanmaktadır. Ülkemizde de son yıllarda MG'un teşhisinde PCR (Bağcıgil 2002, Cengiz ve ark 2011, Yılmaz ve ark 2011) ve real time PCR (Çarlı ve Eyigör 2003, Kahya ve ark 2010, Tuzcu ve ark 2012) yöntemlerinin uygulandığı çalışmalar yapılmıştır.

MG enfeksiyonu kanatlı endüstrisinde ekonomik etkileri bakımından önemli olup enfeksiyondan korunma ve kontrol programları biyogüvenlik ve sürveyansa (seroloji, kültür, moleküler yöntemlerle) dayanmakta, damızlık işletmelerde eradikasyon uygulanmaktadır. Ticari işletmelerde enfeksiyonun kesin teşhisi yapılmadan gereksiz ilaç kullanımı hem ekonomik kayıplara hem de kalıntı sorunlarına neden olmaktadır. Kontrol ve eradikasyon programlarının başarısı enfeksiyonun doğru ve zamanında teşhisine dayanır.

Bu çalışmada belirgin klinik belirtiler görülmeyen yumurtacı kümeslerde MG enfeksiyonunun klasik seroloji ve kültür yöntemlerinin yanı sıra PCR yöntemi ile tespiti ve yöntemin rutin teşhiste kullanılabilirliği araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Organ ve svab örnekleri

Örnekler solunum sistemi problemleri nedeniyle daha önce Konya Veteriner Kontrol Enstitüsüne getirilen kan serumlarında serolojik olarak pozitiflik tespit edilmiş, 24-75 haftalık yaşlarda olan, 15 ticari yumurtacı işletmeden alındı. İzolasyon ve PCR amacıyla 73 adet canlı tavuğun trakesinden canlı iken ve hayvanların nekropsisi yapıldıktan sonra trakea, hava kesesi ve akciğerlerinden 292 adet svab örneği alındı (Tablo 1). Canlı hayvanlarda steril svablarla larinksten girilerek trakeadan svab alınımı müteakip nekropsi sonrası tüm trake boyunca kuvvetle sürülerek tekrar bir trakeal svab ve daha sonra sırasıyla hava kesesi ve akciğerlerden svab örnekleri alındı.

Kan serumu

Her bir işletmede rastgele seçilen 25 tavuktan olmak üzere 15 işletmeden toplam 375 kan serumu örneği alındı. Kan örnekleri tavukların *vena ulnaris*'lerinden alınarak serumları ayrıldıktan sonra aynı gün veya buzdolabında bekletildi ve en geç 72 saat içinde ile test edildi.

İzolasyon çalışmaları

Hayvanların trake, hava kesesi, akciğerlerinden steril svablarla alınan örneklerden Modified Hayflick sıvı ve katı besiyerlerine ekimler yapıldı. Katı besiyerleri nemli ve %5 CO₂'li ortamda 37 °C'de inkübe edildi. Katı besiyerleri mikoplazma kolonilerinin





Tablo 3. M. gallisepticum enfeksiyonunun kümes bazında tespitinde uygulanan testlerin karşılaştırılması.

	Seroloji (ÇSA test)		Toplam	Sensitivite (%)	Spesifite (%)
	Pozitif	Negatif			
Kültür				23	100
Pozitif	3	0	3		
Negatif	10	2	12		
PCR				46	50
Pozitif	6	1	7		
Negatif	7	1	8		

görünümü, sıvı besiyerleri de renk değişimi bakımından her gün kontrol edilerek renk değişimi görülen sıvı besiyerinden katı besiyerine pasajlar yapıldı. Bu şekilde 3 kez pasaj yapıldıktan sonra üreme görülmeyen materyaller negatif olarak değerlendirildi (Jordan 1983).

İdentifikasyon çalışmaları

Üreyen mikoplazma koloniler digitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu, arginin hidrolizi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu, üreme inhibisyon testleri ile identifiye edildiler (Türktaş ve Salihoğlu 1989). Agar besiyerinde üreyen mycoplasma kolonileri PCR ile de doğrulandı.

Çabuk serum aglutinasyon (ÇSA) testi

Beyaz renkli temiz bir seramik üzerinde 20 µL şüpheli serum ile eşit miktarda MG ÇSA test antijeni (Nobilis, Intervet International B.V., Hollanda) karıştırılarak yaklaşık 1.5 cm çapında dairesel bir alana yayılıp rotasyon hareketi yaptırılarak 2 dk içerisinde oluşan reaksiyon değerlendirildi (OIE 2008).

DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu amacıyla svab örnekleri içerisinde 1 mL PBS bulunan tüplere alındı, çalkalayıcıda iyice karıştırıldıktan sonra svablar atıldı. Svab sıvıları ve renk değişimi görülen sıvı kültür besiyerleri 1.5 mL steril tüpler içerisine alındı. Süspansiyon 14.000 g de 4 °C'de 30 dk santrifüj edildi. Üst sıvı dikkatlice alınarak atıldı ve pelet 25 µL ultra saf su ile süspansiyon edildi. Tüpler 10 dk kaynatıldıktan sonra 10 dk buz üzerinde bekletildi. Daha sonra 14.000 g de 5 dk santrifüj edilerek, DNA'nın bulunduğu üst sıvı alındı (Lauerman 1998).

PCR testi

Test 50 µL hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 10xBuffer (Promega), 2 mM MgCl₂, her bir deoxynucleoside triphosphate'dan 200 µM, her bir primerden 0.2 µM, 1.25 U Taq polymerase (Promega) ve 5 µL template içermektedir. MJ Research Thermal Cycler da 94 °C'de 30 sn, 55 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 60 sn den oluşan 25 devir uygulandı. Örneklerin analizi için PCR ürünleri %1.5 agarose jelde elektroforeze tabi tutularak ethidium bromide (Sigma) ile boyandı, UV transilluminatörde görüntülendi. Oluşan bantların büyüklükleri standart 100 bp DNA marker (Promega) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden sağlanan M. gallisepticum S6 suşu kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılan S6 suşu 185 bp bant oluşturdu. Çalışılan örnekler buna göre değerlendirildi.

Primerler (Lauerman 1998):

MG-14F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

MG-13R: 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

Bulgular

Serolojik olarak 15 işletmenin 13 (%86.6)'ünde pozitiflik tespit edilirken 2 (%13.3)'sinde serumların tümü negatif bulundu. Seropozitif bulunan işletmelerin 2'sinde serumların tümü pozitif, 11'inde ise %12-80 oranlarında pozitiflik tespit edildi. Toplam 375 serumun

153 (%40.8)'ü pozitif ve 222 (%59.2)'si ise negatif olarak belirlendi (Tablo 2). Onbeş işletmenin 3 (%20)'ünde birer tavuktan 3 MG izole edilirken 12 (%80) işletmede izolasyon yapılmadı (Tablo 1). Canlı hayvanlardan alınan 73 trakeal svab örneğinden doğrudan yapılan PCR ile 2 işletmeye ait 2 (%2.73) tavukta MG DNA'sı tespit edildi. Sıvı besiyerinde inkübasyon sonrasında PCR ile 7 (%46.6) işletmeye ait 9 (%12.3) tavukta MG DNA'sı tespit edildi. Bu işletmelerin birinde (No:6) seroloji ve bakteri izolasyonu negatif olmasına rağmen PCR pozitif bulundu (Tablo 2). Sıvı kültürlerinden yapılan PCR sonucunda tespit edilen pozitif örneklerin 1 (%11.1)'i akciğer svabı, 1 (%11.1)'i hava kesesi svabı ve diğer 7 (%77.7)'si nekropsiden sonra alınan trakea örnekleridir. Kümes bazında ÇSA ile yapılan seroloji sonuçlarına göre kültür ve PCR sonuçları değerlendirildiğinde kültürün sensitivite ve spesifitesi %23 ve %100, PCR'in sensitivite ve spesifitesi, %46 ve %50 olarak hesaplandı (Tablo 3).

Tartışma

Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarının geriye dönük olarak yıllık serolojik teşhis rakamları incelendiğinde CRD şüphesiyle test edilen serum örneklerinin en yüksek sayıyla ilk sırada yer aldığı belirtilmektedir. Enstitü'de Güler (1995) tarafından yapılan çalışmada, 40 işletmenin 12 (%30)'sinde 126 tavuğun 19 (%15.07)'ünde MG izolasyonu ve MG'dan daha yüksek oranda, %19.4 M. gallinarum izolasyonu yapılmış ve çalışmada, daha çabuk üreyen solumun sistemi florasında bulunan veya örnek alımı sırasındaki olası kontaminant bakterilerin ve patojenik olmayan bir mikoplazma türü olan M. gallinarum'un MG'un izolasyonu ve identifikasyonu güçleştirdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da besiyerlerine katılan antimikrobiyal etkenlere rağmen çoğu durumda çabuk üreyen diğer bakterilerin üremesinin engellenmediği görülmüştür.

MG'un izolasyonunda en önemli problem etkenin identifikasyonu olup, bu amaçla genellikle digitonine duyarlılık, glikoz fermentasyonu, arginin hidrolizi, tetrazolium redüksiyonu, film ve spot oluşumu gibi biyokimyasal testler ve MG spesifik antiserum ile üreme inhibisyon, direkt veya indirekt floresan antikor ve immunoperoksidaz gibi immünojenik yöntemler uygulanmaktadır (Jordan 1983, Kleven ve Levisohn 2003). Biyokimyasal yöntemler ve üreme inhibisyon testi için saf kulture ihtiyaç duyulmasına rağmen floresan antikor testi ile mik kültürlerden etkenin spesifik olarak tespit edilmesi mümkündür. Ancak immünojenik yöntemler için gerekli spesifik antiserumların temini ve uzun süre muhafazası sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle bu yöntemlerin rutin teşhislerde her laboratuvarında uygulanmaları güçtür. Klasik kültür ve identifikasyon yöntemlerine alternatif olarak PCR yöntemleri geliştirilmiştir.



Bu çalışmada yumurtacı işletmelerde MG enfeksiyonunun teşhisi amacıyla kan serumlarından MG'ye karşı oluşan antikorların tespiti için ÇSA testi ve kültür gibi klasik yöntemlere ilave olarak 16S rRNA genine dayanan bir PCR yöntemi uygulandı. Çalışmada örnek alınan 15 işletmenin 13 (%86.6)'ünde ÇSA testiyle, 7 işletmede (%46.6) PCR metoduyla, 3 (%20)'ünde de kültür metodu ile MG pozitifliği tespit edildi. Örnekler bireysel bazda değerlendirildiğinde 73 tavuğun 3 (%4.1)'ünden izolasyon yapılırken, sıvı kültür besiyerlerinden yapılan PCR ile 9 (%12.3)'undan, canlı tavuklardan alınan trakeal svab örneklerinden doğrudan yapılan PCR ile 2 (%2.73) tavuktan MG DNA'sı tespit edildi. Çalışmada serolojik olarak işletmelerin çoğunda pozitiflik tespit edilmesine rağmen hem izolasyon hem de PCR ile etken tespiti düşük oranda olmuştur. Bu durum örnekler toplandığında işletmelerin çoğunda klinik belirti görülmemesi nedeniyle enfeksiyonun geçirilmiş olmasından ve dokularda tespit edilebilir düzeyde mikroorganizma bulunmamasından kaynaklanabilir.

Doğrudan PCR ile 2 tavukta pozitiflik tespit edilirken, sıvı kültür besiyerlerinden 9 tavukta pozitiflik tespit edilmiştir. Bu durum hastalığın akut döneminin geçirildiği etken miktarının azaldığı durumlarda sıvı besiyerinde inkübasyon (zenginleştirme) sonrası mikroorganizma sayısının artmasına bağlı olabileceği gibi bu örnekler nekropsisi sonrası alındığı için svabların trakea boyunca iyice sürülerek alınmasına da bağlı olabilir. Çarlı ve Eyigör (2003) serolojik olarak pozitif canlı tavuklardan aldıkları trakeal svab örneklerinin tümünü real time PCR ile negatif bulmalarına karşın otopsi sonrası trake'ye iyice sürülerek alınan 28 örneğin 18 (%64.2)'ini pozitif bulmuşlardır. Cengiz ve ark (2011) da canlı hayvanlardan alınan svab örneklerine göre nekropsisi sonrası alınan trakea örneklerinde PCR ile daha fazla pozitif sonuç elde etmişlerdir. Seroloji ile kültür ve PCR arasındaki uyumsuz sonuçların bir diğer nedeni de antibiyotik kullanımınıdır. Antibiyotik kullanımının oluşturduğu baskı ile ekstraselüler ortamdaki mikoplazmaların inhibe olduğu, buna karşın bir kısmının intraselüler ortamda kalarak immun sistemden kaçtığı ve aynı zamanda kültür ve PCR ile teşhis edilebilecek düzeyin altına düştüğü bildirilmektedir (Nascimento ve ark 2005).

Çalışmada etken tespiti en fazla trakeden olmuştur; 3 hayvandan izole edilen MG suşlarının 2'si trakeden, 1'i hava kesesinden; PCR ile ise örneklerin 7'si trake, 1'i hava kesesi ve 1'i akciğerden tespit edilmiştir. Ülgen (1991) MG'un trakeden %8.3, hava keselerinden %3, akciğerden %0.7 oranlarında izole edildiğini bildirmişlerdir. Tuzcu ve ark (2012) real time PCR ile en fazla miktarda mikroorganizmanın trakede bulunduğunu göstermişlerdir.

Ülkemizde MG'un PCR ile teşhisi konusunda yapılan diğer çalışmalarda farklı hayvan popülasyonlarında ve/veya farklı PCR yöntemleri uygulanarak elde edilen bulguların da değişiklik gösterdiği görülmektedir. Bağcıgil (2002) ticari bir PCR test kitini (Idexx) kullanarak 96 adet 2-7 haftalık tavuğa ait trake örneklerinin 46 (%49)'sında MG DNA'sını tespit ederken, kültür ile 3 (%3.1)'ünde, ÇSA ile de hayvanların %10'unda pozitiflik bulmuştur. Kahya ve ark (2010) 31 damızlık kümesin 15 (%48.4)'inde serolojik olarak, 5 (%16.1)'inde kültür ile 9 (%29)'unda real time PCR ile pozitiflik tespit etmişlerdir. Cengiz ve ark (2011) bu çalışmada uygulanan DNA ekstraksiyonu ve PCR yöntemi ile 40-45 günlük broylerlerde, nekropsisi sonrası alınan trakea örneklerinde 26 kümesin 14 (%53.8)'ünde, canlı hayvanlardan alınan trakeal svab örneklerinde ise 5 (%19.2) kümeste pozitiflik tespit etmişlerdir. Yılmaz ve ark (2011) ÇSA pozitif 27 broylerin 4'ünde immunohistokimyasal yöntem ile MG antijenlerini tespit etmişler ve bu pozitif örneklerin kültür buyyonlarından yapılan PCR ile 4 örnekte MG'u pozitif bulmuşlardır. Tuzcu ve ark (2011) broyler civcivlerde real time PCR ile 30 hayvanın 22'sinde MG tespit etmişlerdir.

Genel olarak broylerlerde ve genç hayvanlarda yapılmış olan çalışmalardan farklı olarak bu çalışma belirgin klinik belirtilerin görülmediği, 24 haftalığın üzerindeki yumurtlayan tavuklarda yapılmıştır. Hastalığın klinik belirtilerinin genç hayvanlarda görüldüğü dikkate alınrsa, genç hayvanlardan alınan örneklerde etken tespit oranı daha yüksek olacaktır. PCR yönteminin başlıca problemleri çeşitli kaynaklardan özellikle daha önce amplifiye edilen nükleik asitlerden kaynaklanan kontaminasyonlar nedeniyle oluşan yanlış pozitif sonuçlar ve farklı laboratuvarlarda elde edilen sonuçların tekrar üretilebilirliği ve karşılaştırılabilirliği ile ilgilidir (Kemp 1998). Farklı laboratuvarlarda uygulanan değişik ekstraksiyon yöntemleri, amplifikasyon şartları, kullanılan primerler, reaksiyon komponentleri, reagent ve kitlerdeki farklılıklar uyumsuz sonuçların alınmasına neden olabilir.

Sonuç olarak işletmelerin çoğu serolojik olarak pozitif bulunurken izolasyon ve PCR ile etken tespit oranının düşük olması, klinik bulgularla birlikte değerlendirildiğinde bu işletmelerde kronik bir enfeksiyona işaret etmektedir. Çalışmada bir işletmede serolojik olarak MG antikorları ve kültür negatif olmasına rağmen bir trakeal svab örneğinden PCR ile MG spesifik DNA tespit edilmesi yanlış pozitif bir sonucu göstermektedir. Böyle bir durumda, kümesteki enfeksiyon durumu hakkında karar verirken, tek bir test ile kesin yargıya ulaşılamayacağı ve yeteri sayıda örneğin belli aralıklarla yapılacak diğer test sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi gereği unutulmamalıdır.

Öneriler

Kanatlı endüstrisinde ekonomik önemi bakımından MG enfeksiyonunun doğru ve çabuk teşhisinin endüstriye katkısı büyük olacaktır. Ticari yumurtacı işletmelerde MG enfeksiyonunun teşhisinde tek başına ÇSA testinin yeterli olmadığı, tedavi kararı ve gereksiz ilaç kullanımının önlenmesi için serolojik olarak pozitif bulunan işletmelerde enfeksiyon kültür ve/veya PCR ile doğrulanmalıdır. PCR yöntemi kültürlerin çabuk ve doğru identifikasyonunda büyük kolaylık sağlamaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, TAGEM (Proje No: TAGEM/HS/12/03/05/109) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anonim, 2007. Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı (20.03.2007 tarihli ve 26468 sayılı Resmî Gazete), Ankara.
- Bağcıgil FA, 2002. Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun tanısında bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerin polymerase chain reaction (PCR) ile karşılaştırılması. Doktora Tezi, İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Callison SA, Riblet SM, Sun S, Ikuta N, Hilt D, Leiting V, Kleven SH, Suarez D, Garcia M, 2006. Development and validation of a real-time taqman PCR assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected birds. Avian Dis, 50, 537-544.
- Cengiz S, Babacan O, Dinç G, Akan M, 2011. Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile teşhisi. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 22, 45-





- 48.
- Çarlı KT, Eyigor A, 2003. Real Time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis, 47, 712-717.
- Erdağ O, Türkaslan J, 1988. Kanatlı mycoplasmalarının laboratuvar teşhis yöntemleri. Pendik Hay Hast Mer Arş Ens Derg, 19, 85-97.
- Esendal Ö, 2002. Mikoplazma enfeksiyonları, Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Ed; İzgür M, Akan M, Medisan, Ankara, pp; 79-85.
- Fan HH, Kleven SH, Jackwood NW, 1995. Application of polimerase chain reaction with arbitrary primers to strains identification of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis, 39, 729-735.
- Garcia M, Jackwood MW, Levisohn S, Kleven SH, 1995. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Avian Dis, 39, 606-616.
- Güler L, 1995. Konya Bölgesinde kanatlıların kronik solunum yolu hastalığı (chronic respiratory disease-CRD)'nin serolojik ve etken izolasyonu ile karşılaştırmalı teşhisi üzerine çalışmalar. Veterinarium, 6, 7-15.
- İzgür M, 1983. Kanatlılarda mycoplasma enfeksiyonları. Kanatlı hayvanların enfeksiyon hastalıkları ve laboratuvar teşhis yöntemleri. Pendik Vet Kont Arş Enst Yayın No:7, pp:65-71.
- Jordan FTW, 1983. Recovery and identification of avian mycoplasmas, In: Methods in Mycoplasmaology, Ed; Tully JG, Razin S, Vol II, Diagnostic Mycoplasmaology, Academic Press, USA, pp; 69-79.
- Kahya S, Temelli S, Eyigör A, Çarlı KA, 2010. Real-time PCR, culture and serology for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken breeder flocks. Vet Microbiol, 144, 319-324.
- Kemp I, 1998. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. Avian Pathol, 27, 7-14
- Khan MI, Kirkpatrick BC, Yamamoto R, 1987. *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by sodyum dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Avian Dis, 31, 315-320.
- Kleven SH, 1998. Mycoplasmosis, In: A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, fourth edition, Ed; Swayne DE, American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA, pp; 74-80.
- Kleven SH, Levisohn S, 1996. Mycoplasma infections of poultry, In: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology, Vol II Diagnostic procedures, Eds; Tully JG, Razin S, Academic Press, London, UK, pp; 283-292.
- Lauerman LH, 1998. Mycoplasma PCR assays. In: Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Ed; Lauerman LH, Auburn, AL, USA, pp; 39-66.
- Ley DH, 2003. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Disease of Poultry, Ed; Saif YM, 11th edition, Iowa State Press, USA, pp; 719-743.
- Moalic PY, 2002. Improving mycoplasmosis control using PCR technology. World Poultry, 7, 38-39.
- Nascimento ER, Pereira VLA, Nascimento MGF, Barreto ML, 2005. Avian Mycoplasmosis update. Brazilian J Poutry Sci, 7, 1-9.
- OIE, 2008. Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.3.5. www.oie.int, pp; 482-496.
- Pang Y, Wang H, Girshick TH, Xie Z, Khan MI, 2002. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. Avian Dis, 46, 691-699.
- Raviv Z, Callison SA, Ferguson-Noel N, Kleven SH, 2008. Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. Vet Microbiol, 129, 179-187.
- Salisch H, Hinz KH, Graack HD, Ryll M, 1998. A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in concurrently infected chickens. Avian Pathol, 27, 142-14.
- Slavik MF, Wang RF, Cao WW, 1993. Development and evaluation of the polymerase chain reaction method for diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Mol Cell Probes, 7, 459-463.
- Tuzcu M, Özmen M, Karakoç SR, Tuzcu N, Yoldaş A, 2012. Diagnosis of mycoplasmosis in chicks by pathological and real time PCR methods. Eurasian J Vet Sci, 28, 82-86.
- Türkaslan J, Salihoğlu H, 1989. Çeşitli besiyerleri kullanılarak *Mycoplasma gallisepticum*'un bakteriyolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu. Pendik Hay Hast Mer Araşt Enst Derg, 20, 53-59.
- Ülgen M, 1991. Kanatlıların Kronik Solunum Yolu enfeksiyonu üzerinde karşılaştırılmalı bakteriyolojik ve serolojik araştırmalar. Doktora Tezi, U.Ü. Sağlık Bilimleri Enst, Bursa.
- Wang H, Fadl AA, Khan MI, 1997. Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. Mol Cell Probes, 11, 211-216.
- Yılmaz F, Timurkan N, Kılıç A, Kalender H, Kılınç Ü, 2011. Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in chickens by immunohistochemical, PCR and culture methods. Revue Med Vet, 162, 79-86.
- Yoder HW, 1989. Nonspecific reactions to mycoplasma serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. Avian Dis, 33, 60-68.