



## Klinik semptomlu tavuk ve hindilerden patojen *Mikoplazma* türlerinin multipleks PCR ile tanımlanması

Ayfer Güllü Yüce<sup>1\*</sup>, Ahmet Murat Saytekin<sup>2</sup>, Osman Yaşar Tel<sup>3</sup>,  
Sevil Erdenli<sup>4</sup>, İrfan Özgünlük<sup>5</sup>, Oktay Keskin<sup>6</sup>

<sup>1,2,3,4,6</sup>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye  
<sup>5</sup>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 03.03.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 27.05.2022

**Özet:** Bu çalışmada amaç, *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synovia* (MS) ve *Mycoplasma meleagridis* (MM) etkenlerini bir multipleks PCR yöntemiyle tek seferde tanımlamak ve bu yöntemin rutin teşhiste kullanılabilirliğini araştırmaktır. Çalışmada laboratuvara getirilen ve klinik belirtileri mikoplazma infeksiyonları yönünden şüpheli, tavuk ve hindilerden aseptik şartlarda alınan toplam 100 svab örneği kullanıldı. Bu örnekler Frey's besiyerinde inkübe edildi ve buradan DNA ekstraksiyonu yapıldı. Yapılan multipleks PCR testi sonucunda tavuklarda (n=50) MG ve MS için sırasıyla 9 (%18) ve 5 (%10) pozitiflik saptandı. 2 tavukta (%4) hem MG hem de MS beraber pozitif bulundu. Tavuk numunelerinin hiçbirinde MM için spesifik bant oluşumu tespit edilmedi. Hindilerde ise (n=50) MG, MS ve MM için pozitif hayvan sayısı sırasıyla 6 (%12), 4 (%8) ve 3 (%6) olarak tespit edildi. MG ve MS bantlarının beraber tespit edildiği hindi sayısı 12 (%24) iken, 1 hindide (%2) MG ve MM, 3 hindide ise (%6) MM ve MS etkenleri beraber izlendi. Numunelerin hiçbirinde üç etkene ait spesifik bant oluşumu gözlenmedi. Sonuç olarak Şanlıurfa bölgesinde kanatlı türlerine ait önemli patojen mikoplazma etkenlerinin bulunduğu, multipleks PCR testi ile kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta çok sayıda etkenin aynı anda ve daha hızlı tespitinin sağlandığı ayrıca koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasında başarıyla kullanılabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** İdentifikasyon, kanatlı mikoplazmoz, multipleks PCR

### Identification of pathogen *Mycoplasma* species using multiplex PCR from chickens and turkeys having clinical symptoms

**Abstract:** The aim of this study is to establish multiplex PCR method that enables to detect *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synovia* (MS) and *Mycoplasma meleagridis* (MM) species at the same time and to investigate usage of this method in routine diagnosis of these pathogenic mycoplasmas. A total of 100 swabs taken aseptically from chickens and turkeys which shows clinical symptoms similar to mycoplasma infection were used in the study. Samples were inoculated into Frey's medium and DNA extraction was made from these growing cultures. Nine (18%) and 5 (10%) out of 50 chickens were found positive for MG and MS, respectively by Multiplex PCR. Two chickens (4%) were positive for both MG and MS. No specific DNA for MM was detected in chickens. Six (12%), 4 (8%) and 3 (6%) out of 50 turkeys were detected as positive for MG, MS and MM, respectively. While MG and MS were detected together in 12 (24%) turkeys, MG and MM were found in only one (2%) turkey together. On the other hand, MM and MS were detected in 3 (6%) turkeys. None of the samples was found positive for all three species. As conclusion, we demonstrated the presence of pathogenic poultry mycoplasmas in chicken and turkeys in Şanlıurfa. It was also concluded that multiplex PCR is very useful method that detects different mycoplasmas with high sensitivity in a short time. Therefore, we assumed that this method could be used successfully in prevention and control of these pathogenic mycoplasmas of poultry.

**Keywords:** Avian mycoplasmosis, identification, multiplex PCR

### Giriş

*Mollicutes* sınıfı, *Mycoplasmataceae* ailesinde yer alan mikoplazmalar, prokaryotların en küçük üyesidir. Sığırlarda bulaşıcı bir hastalık olan kontajiyöz plöröpnömoninin etkeni olarak ilk defa 1898 yılında izole edilmişlerdir. Solunum sistemine yerleşen etkenler, sonraki yıllarda plöröpnömoni ben-

zeri organizma (PPLo) olarak tanımlanmıştır (Davis ve ark. 1973; Mendonça ve ark. 2000). Kanatlılarda patojenik mikoplazma etkenlerinin meydana getirdiği mikoplazmoz ilk olarak hindilerde 1926 yılında, daha sonra da tavuklarda 1936 yılında tanımlanmıştır (Charlton ve ark. 1996). Günümüzde, kanatlı hayvanlarda hastalığa neden olan farklı mikoplazma etkenlerinin olduğu bilinse de (Çarlı 2019; OIE 2021),

**Yazışma adresi / Correspondence:** Ayfer Güllü Yüce, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa-Türkiye e-posta: [ayfergullu@harran.edu.tr](mailto:ayfergullu@harran.edu.tr)

**ORCID IDs of the authors:** \*0000-0002-9842-3305 • 0000-0001-7486-8054 • 0000-0001-7848-3899  
• 0000-0002-0377-2650 • 0000-0002-6003-8612 • 0000-0002-5977-7872

kanatlılarda baskın olarak bulunan mikoplazma türleri, *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) ve *Mycoplasma iowae* (MI) dir (Songer ve Post 2012). Tavuk ve hindilerde MG ve MS, hindilerde ise MM ve MI, ticari kanatlı işletmelerinde, önemli ekonomik kayıplara yol açan patojenik mikoplazma türleri olarak bildirilmiştir. (Bradbury 2001). Bu etkenlerden de MG ve MS, epidemiyolojik olarak en önemli türlerdendir ve özellikle evcil kanatlılarda meydana getirdikleri hastalıkların tüm dünyada yaygın olması yönüyle, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) listesinde de yer almaktadır (OIE 2021). MG, tavuklarda kronik solunum yolu hastalığı (Chronic Respiratory Disease, CRD), hindilerde ise infeksiyöz sinüzitis (IS) olarak bilinen hastalık tablolarını oluşturur. MS ise tavuk ve hindilerde infeksiyöz synovitis ve kanatlılarda üst solunum yolları problemlerine neden olmaktadır. MS ayrıca, yumurtacı tavuklarda yumurta verimini ve kalitesini de bozar (Çarlı 2019). Bu hastalıklar tavuk ve hindilerde önemli ekonomik kayıplara yol açarlar (Charlton ve ark. 1996). MM ise ilk defa 1965 yılında hindilerin hava kesesi infeksiyonlarından tanımlanmış, hindilerde ve diğer kanatlılarda patolojik lezyonlar oluşturabilen, fakat tavuklarda patolojik lezyonlara sebep olmayan bir mikoplazma türü olarak belirlenmiştir (Yamamoto ve ark. 1965). Etken, genç hindilerde solunum yolları hastalığına neden olurken bunun yanında, gelişmenin durması, zayıf tüylenme ve ayak problemleri ile de ilişkili bulunmuştur (Songer ve Post 2012).

Kanatlılardaki mikoplazma infeksiyonlarının, direkt temasla, etkeni içeren dışkı ve akıntılar, toz, damlacıklar, kontamine ekipman, yem, su, infekte kuşlar, rodent ve etkeni içeren gübrelerle horizontal olarak bulaşabileceği çevresel numunelerden yapılan analizler ve deneysel bir kurguyla gösterilmiş, ayrıca damızlık anaçların yumurtalarından civcivlere ise vertikal olarak bulaşabileceği ve sürü içinde çok hızlı bir yayılım gösterebileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Marois ve ark. 2002). Bulaşma gücü yüksek bu etkenlerin tanısı ve infeksiyonun teşhisi bu noktada oldukça önemlidir. Mikoplazmaların tanısında klasik kültür metodu, altın standart yöntem olarak kabul edilmiş olsa da, serolojik metodlar ve moleküler olarak da Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), teşhiste sıklıkla tercih edilmektedir. Kültür yönteminin uzun sürmesi ve kontaminasyon riskinin yüksek olması, serolojik testlerde ise çapraz reaksiyonlar sonucu hatalı pozitif veya negatif sonuçların alınması, etkenlerin teşhisi aşamasında PCR temelli moleküler tanı yöntemlerini, diğerlerine göre daha kullanışlı hale getirmektedir (Marois ve ark.

2002; Buim ve ark. 2009; OIE 2021). İnfeksiyondan şüphe edilen canlı veya yeni ölmüş hayvanlardan ya da öldükten hemen sonra dondurulmuş hayvanlardan, doku, organlar ve solunum yolu eksudatlarından svab alınarak, mikoplazmaların tanısı için inceleme örneği olarak kullanılabilir (Marois ve ark. 2002; Kleven ve ark. 2004; OIE 2021).

Bu çalışmada amaç, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarına getirilen, anamnez ve klinik belirtilerine göre mikoplazmoz şüpheli tavuk ve hindilerde MG, MS ve MM etkenlerini bir multipleks PCR testiyle saptamak ve bu yöntemin patojen kanatlı mikoplazmalarının rutin teşhisinde kullanılabilirliğini araştırmaktır.

## Gereç ve Yöntem

### Klinik örnekler

Bu çalışmada, 2020 yılı Temmuz ayından, 2021 yılı Aralık ayına kadar geçen süre içerisinde, Mikrobiyoloji Ana bilim dalı laboratuvarına canlı veya agoni halinde getirilen evcil kanatlılardan, çok hafiften şiddetliye değişen derecelerde "semptom gösteren" anamnez, klinik semptomlar ve nekropsi bulguları yönünden mikoplazmoz şüpheli (öksürük, nazal ve oküler akıntı, infraorbital sinüste şişme, yumurta veriminde düşüklük, bacak problemleri, iştahsızlık semptomları ile nekropside hava kesesi yangısı, perikardit, perihepatit, sinüzit ve bazen artrit lezyonları, çeşitli yaş (7- 36 haftalık) ve cinsiyetteki 50 tavuk ve 50 hindinin, canlı olanlarından ağız-burun akıntıları ve trakealarının üst bölgelerinden, nekropsi yapılanlarından ise ilave olarak trakealarının derin bölgelelerinden, lezyonlu organlardan ve hava keselerinden, aseptik şartlarda alınan svab örnekleri etken tanısı amacıyla inceleme örneği olarak kullanıldı (OIE 2021).

### Kültür

Frey *Mycoplasma* Broth Base (Himedia), üretici firmanın tavsiyesine uygun olarak 500 ml olarak hazırlandıktan sonra otoklav ile 121°C de 15 dk steril edildi. Besiyeri 50-55°C'ye soğutulduktan sonra besiyerine, steril şartlarda, *Mycoplasma* Supplement G (Oxoid), son konsantrasyonu %20 olacak şekilde at serumu (Himedia) ve %1 oranında Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) (Merck) (Öngör ve ark. 2009) ilave edilerek Frey's besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri, 3 ml olarak steril cam tüplere taksim edildi. Taksim sonrası, olası kontaminasyonların tespiti için gerekli kontroller yapıldı ve hazırlanan tüpler kullanılıncaya kadar 4°C' de muhafaza edildi. Hayvanlardan alınan svablar besiyerine ekildi ve daha sonra

her bir kanatlı için bu besiyerleri 37 °C'de, mikroaerobik şartlarda, 72 saat inkübasyona bırakıldı (Frey ve ark. 1968; OIE 2021).

### DNA ekstraksiyonu

Ekimleri yapılan ve inkübasyona bırakılan besiyerlerinden, inkübasyon sonunda DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla steril ependorf tüplerine 1.5 ml sıvı kültür besiyeri alındı. Süspansiyon, 14.000 x g'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım dikkatlice alınarak atıldı ve pelet 25 µl ultra saf su ile süspansiyon edildi. Tüpler, 10 dk kaynatıldıktan sonra buz üzerinde soğumaya bırakıldı. Daha sonra 14.000 x g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve DNA'nın bulunduğu süpernatant kısım alınarak test edilene kadar -20°C'de saklandı (Liu ve ark. 2001; Tomar ve ark. 2017a).

### Referans DNA' lar

MG, MS ve MM için referans DNA'lar, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Mikoplazma OIE Referans Laboratuvarından temin edilerek çalışmalarda pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

### Multipleks PCR

Tek seferde, 3 farklı etkene spesifik 3 gen bölgesinin araştırılması amacıyla örneklerle multipleks PCR uygulandı. Yöntemde ticari master mix (Qiagen, 206143) kullanıldı.

MG, MS ve MM için tür spesifik primerler (Tablo 1) 100 µM konsantrasyonda (100 pmol/µl) olacak şekilde steril ve DNaz / RNaz free PCR grade su ile sulandırıldı ve stok konsantrasyonlar hazırlandı. Her bir primer için son konsantrasyon 2 µM (2 pmol/µl) olacak şekilde kullanıldı.

Multipleks PCR karışımı, her bir tüp için toplam hacim 25 µl olacak şekilde belirlendi. Bunun için 12,5 µl Qiagen master mix, 2,5 µl primer karışım, 9 µl su ve 1 µl kalıp DNA içerecek şekilde hazırlandı. Karışım içeriği, Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Arktik) cihazında çoğaltıldı. Amplifikasyon için döngüler, ticari master mix içeriğine uygun olarak yapıldı. Bu amaçla 95°C'de 15 dakika başlangıç denatürasyon işleminden sonra toplam 30 döngü olacak şekilde, 94°C'de 30 saniye (denatürasyon), 58°C'de 90 saniye (ilk bağlanma), 72°C'de 3 dakika (ilk sentez) ve döngülerin sonunda, 72°C'de 10 dakika (son sentez) tutularak amplifikasyon tamamlandı. DNA'ların yürütülmesi için amplikonlar elektroforeze tabi tutuldu (Thermo Scientific EC300 XL). Bu amaçla 10 X TAE (Tris Asetat EDTA) solüsyonu (Fermentas, B49), distile su ile sulandırılarak 1X oranında kullanıldı. Agaroz jel (Sigma, A9539), %2 konsantrasyonda hazırlandı. DNA marker olarak 2000 bp'lik ladder (Qiagen Gel Pilot Mid Range) kullanıldı. İşlemlerin sonunda görüntüleme işlemi (Jel görüntüleme Major Science UVCI-1100) ile yapılarak spesifik bantların varlığı araştırıldı.

**Tablo 1.** MS, MM ve MG tanısı için multipleks PCR testinde kullanılan primerler.

Hedef Mikroorganizma	Kullanılan primerler	Gen Bölgesi	Amplikon boyutu (bp)	Referans
Mycoplasma synoviae (MS)	F: 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3' R: 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'	16S rRNA	211 bp	(OIE 2021)
Mycoplasma meleagridis (MM)	90F: 5'-CGAGCGAAGTTTTTCGGAAC-3' 469R: 5'-GGTACCGTCAGGATAAATGC-3'	16S rRNA	424 bp	(Boyle ve ark. 1995)
Mycoplasma gallisepticum (MG)	F: 5'-GGAGTTAGCTTTGTGTCTCCGG-3' R: 5'-AAGTTCATGCGGTTTGGACC-3'	mgc2	750-800 bp	(Rajkumar ve ark.2019)

### Minimum tespit limitinin belirlenmesi

Kullanılan multipleks PCR'nin minimum tespit limitini belirleyebilmek için her 3 etkene ait referans DNA'ların miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü (Thermo, NanoDrop1000) ve DNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde karıştırıldı. Oluşturulan stok karışım, mikrolitresinde 50ng, 25ng, 10ng, 100pg, 10pg DNA içerecek konsantrasyonlarda sulandırılarak multipleks PCR'de tespit limitinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı (Wang ve ark. 1997; Mettifogo ve ark. 2015).

### Bulgular

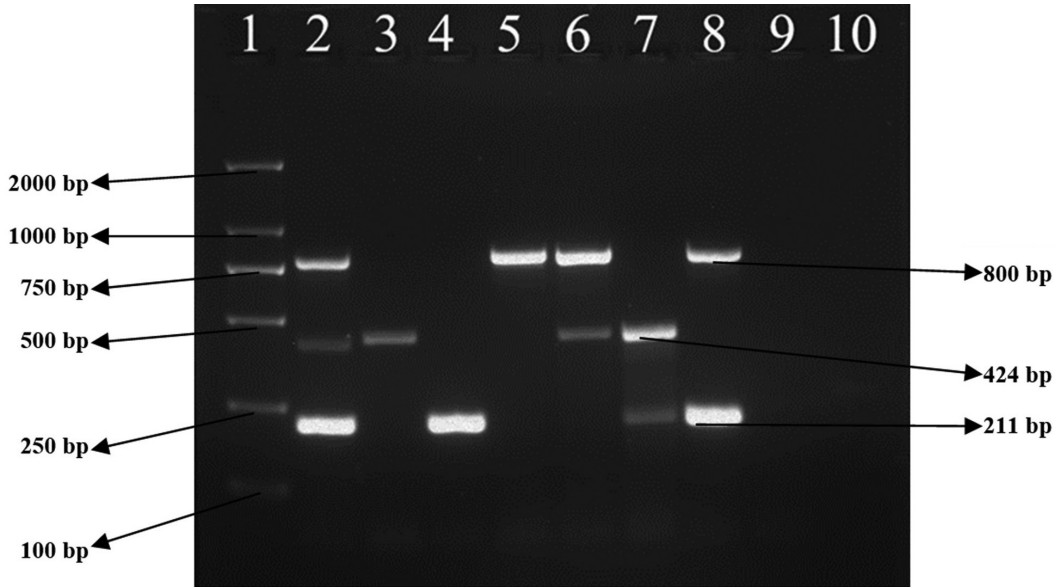
Tavuk numunelerinin multipleks PCR analizi sonucunda, 50 tavuğun 16'sında (%32) incelenen etkenlerden en az birine ait spesifik bant oluşumu tespit edildi. Bu etkenler içinde, 9 tavuk (%18) MG için pozitif bulunurken, MS için 5 tavuk (%10) pozitif bulundu. Hem MG hem de MS'nin beraber bulunduğu 2 pozitif hayvan (%4) tespit edildi. Tavuk numunelerinin hiçbirinde MM için spesifik bant oluşumu tespit edilmedi (Şekil 1, Şekil 2).

Hindi numunelerinin multipleks PCR analizi sonucunda, 50 hindinin 29'unda (%58) araştırılan et-

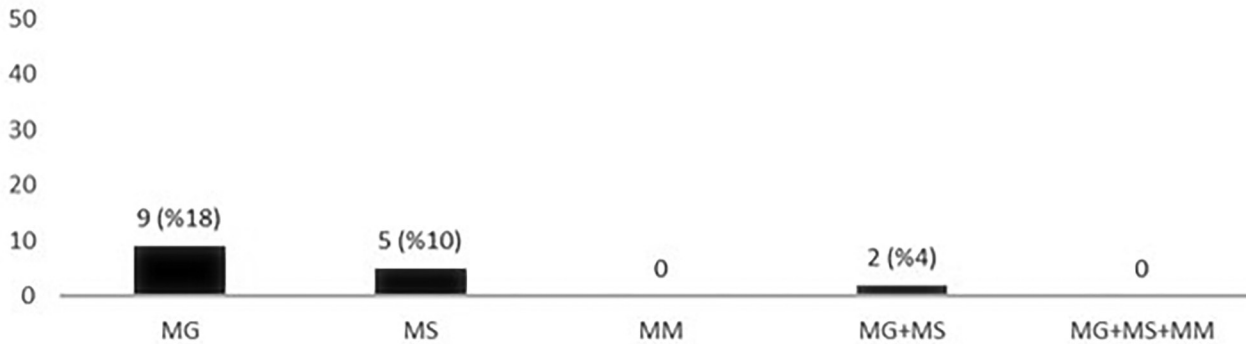
kenlerden en az birisine ait spesifik bant oluşumu izlendi. Test edilen 50 hindi içinde, MG, MS ve MM için pozitif hayvan sayısı sırasıyla 6 (%12), 4 (%8) ve 3 (%6) olarak bulundu. Aynı hayvanda, birden çok etkenin beraber bulunduğu sonuçlar değerlendirildiğinde, MG ve MS etkenlerine ait spesifik bantlar 12 hayvanda (%24) bulunurken, MG ve MM etkenlerine ait spesifik bantlar sadece 1 hindide (%2), MM ve MS etkenlerine ait spesifik bantlar ise 3 hayvanda

(%6) görüldü. Numunelerin hiçbirinde, üç etkene ait spesifik bant oluşumu beraber izlenmedi (Şekil 1, Şekil 3).

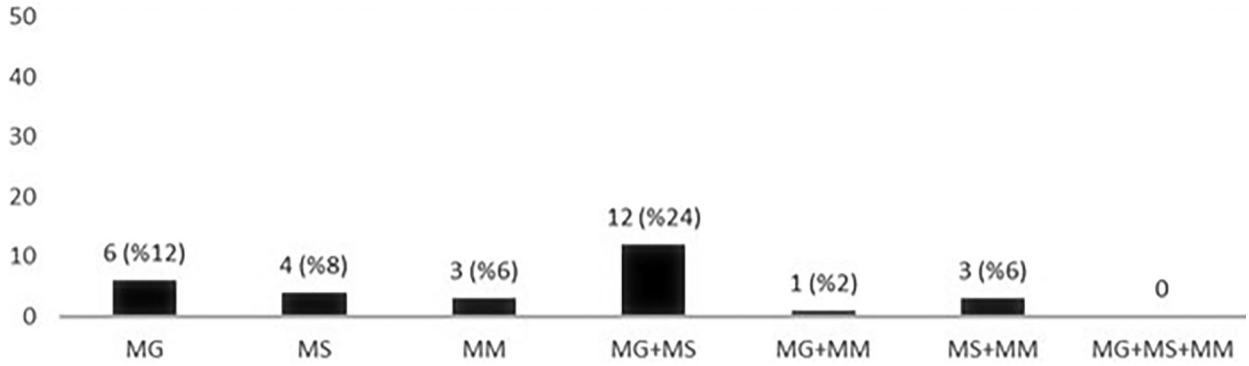
Minimum tespit limitinin belirlenmesi için yapılan çalışmanın sonucunda, mikrolitrede 10ng DNA konsantrasyonu, kullanılan multipleks PCR için her 3 etkenin de beraber tanımlanabileceği en düşük miktar olarak tespit edildi (Şekil 4).



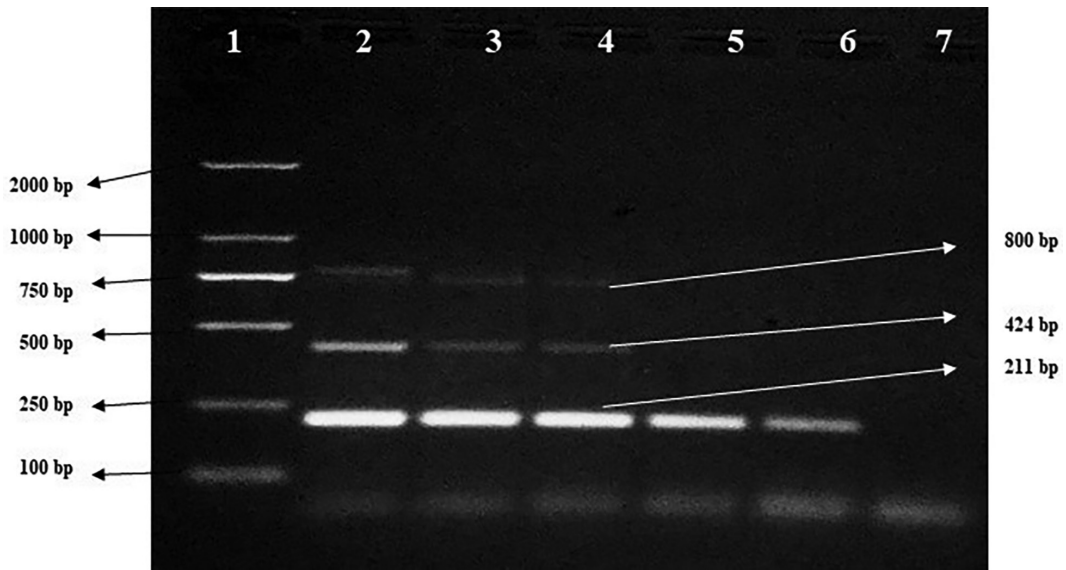
**Şekil 1.** Multipleks PCR testi sonucunda örneklerin jel elektroforez görüntüsü 1- Marker (Mid range ladder 2000bp) 2- Referans DNA'ları içeren Miks Pozitif kontrol, 3- MM pozitif numune 4- MS pozitif numune 5- MG pozitif numune 6- MG+MM pozitif numune 7- MM+MS pozitif numune 8- MG+MS pozitif numune 9- Negatif kontrol



**Şekil 2.** Tavuk numuneleri için (n=50) multipleks PCR bulguları grafiği.



**Şekil 3.** Hindi numuneleri için (n=50) multipleks PCR bulguları grafiği.



**Şekil 4.** Multipleks PCR testi ile minimum tespit limitinin belirlenmesi için elde edilen jel elektroforez görüntüsü 1- Marker (Mid range ladder 2000bp) 2- 50ng DNA konsantrasyonu 3- 25ng DNA konsantrasyonu 4- 10ng DNA konsantrasyonu 5- 100 pg DNA konsantrasyonu 6- 10 pg DNA konsantrasyonu 7- Negatif kontrol

## Tartışma ve Sonuç

Araştırmacılar patojenik mikoplazma türlerinden MG için tavuklarda CRD, hindilerde ise IS ye neden olan ve ayrıca sülün, keklik, tavus kuşu ve bıldırcınlarda da enfeksiyonlara yol açan, subklinik enfeksiyonlarda özellikle de tavuklarda *Avibacterium paragallinarum*, enfeksiyöz bronşitis virusu ve *Escherichia coli* ile ko-enfeksiyonlar oluşturarak sonuçta büyük kayıplara yol açabilen bir mikoplazma türü olduğunu, ayrıca MG'ye bağlı enfeksiyonların, diğer kanatlı mikoplazma enfeksiyonları içinde, kanatlı sektöründeki damızlık, yumurtacı ve broyler işletmelerinin en önemli enfeksiyonları olarak görüldüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar, MS için tavuk ve hindilerde enfeksiyöz sinovitis ve üst solunum yollarında hastalıklara se-

bep olabileceğini, diğer bakteriyel ve viral etkenlerle ve bazen de MI ile miks enfeksiyonlar oluşturarak şiddetli hastalık tablolarına sebep olduğunu bildirmişlerdir. MM için araştırmacılar, etkenin sadece hindilerde hastalık oluşturan bir tür olduğunu, diğer spesifik mikoplazma türlerine benzer şekilde hindilerin hava keseleri, trakea ve sinüslerinden rahatlıkla izole edilebileceğini vurgulamışlardır (Çarlı 2019). Araştırmacıların da bildirdiği gibi kanatlılarda oldukça ciddi enfeksiyonlara sebep olan bu mikoplazma etkenleri, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de kanatlı sektöründe önemli sorunlara yol açmaktadır (Esendal 2002; Akan 2008). Bu nedenlerle de bu çalışmada adı geçen etkenlerin araştırılması düşünülmüştür.

Mikoplazma infeksiyonlarını önceden tespit etmek, önlem almak, sürüleri ari duruma getirmek veya hasta sürülerde erken tedavi ve karantina uygulamaları yaparak kayıpları en aza indirebilmek için söz konusu patojen mikoplazma türlerinin tanısına yönelik çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Bunların içinde, klasik izolasyon ve identifikasyon yöntemi uluslararası yetkili otoriteler tarafından mikoplazmaların tanısında altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (Çarlı 2019; OIE 2021). Ancak bazı araştırmacılar, bu klasik yöntemle ilgili bazı dezavantajları bildirmişlerdir. Kleven (1998), mikoplazma etkenlerinin besiyerlerinde üretilmeleri sırasında, çok hassas olduklarını belirterek sıvı besiyerlerinde glukoz fermentasyonundan dolayı renk değişiminin tespiti yapılır yapılmaz kültürlerin bekletilmeden pasajlanması gerektiğini vurgulamıştır. Aksi durumda etkenlerin pH değişiminden dolayı ölebileceğini belirtmiştir.

Günümüzde kültür yöntemi yerine hızlı tanı için moleküler yöntemlerin kullanımı, oldukça yaygın ve avantajları sebebiyle çoğu araştırmacı ve tanı laboratuvarı tarafından tercih edilen, güvenilir teşhis yöntemleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Zakeri 2016; Çarlı 2019; OIE 2021). Öngör ve ark. (2009), besiyerinden yapılan PCR testinde, bakteriyel kontaminasyon olsa bile oldukça spesifik olarak mikoplazma etkenlerinin saptanabileceğini, bu şekliyle de klasik kültür yöntemine kıyasla çok daha iyi sonuçlar alındığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar, patojen etkenlerin tespitinde, asemptomatik belirti gösteren hayvanlardan veya antibiyotik tedavisi uygulanmış canlı hayvanlardan alınan klinik örneklerde ya da vücutta fagosite edilmiş halde bulunabilen mikoplazma etkenlerinin tespiti için alınan örneklerde, PCR testi ile etkenlerin araştırılmasının tanı açısından daha verimli olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca, PCR yöntemi ile patojen etkenin, konakçının immünolojik yanıtından önce saptanmasının mümkün olabileceği, böylece PCR yönteminin serolojik testlere göre daha avantajlı olduğu bildirilmiştir (Garcia ve ark. 1995; Kempf 1998; Gondal ve ark. 2015). Mikoplazmaların tanısı için yaptıkları çalışmalarda PCR testini başarılı olarak rapor eden geçmişten günümüze çok sayıda araştırmacı vardır (Zhao ve Yamamoto 1993; Boyle ve ark. 1995; Garcia ve ark. 1995; Marouf ve ark. 2020). Kesler ve ark. (2013), yumurtacı tavuklardan aldıkları örneklerin sıvı kültürlerinden yaptıkları PCR testinde, canlı hayvanlardan alınan 73 trakeal svabtan, 2 işletmeye ait 2 tavukta MG spesifik DNA'ların tespit edildiğini bildirmişlerdir. Tomar ve ark. (2017a), solunum yolu enfeksiyonlarının bulunduğu 92 farklı kanatlı sürüsünden, trakea, akciğer ve hava keselerini içeren doksan iki havuzlanmış doku örne-

ğinin toplandığını ve dubleks PCR ile mikoplazmalar için incelemeye tabi tutulduğunu bildirmişlerdir. Dubleks PCR sonucunda, %27 (25/92) oranında MG, %2,1 (2/92) oranında MS ve %1,08 (1/92) oranında hem MG hem de MS için pozitif sonuçlar aldıklarını, sonuç olarak, kullandıkları PCR testinin sürülerin taranması ve sürveyans için kullanılmasını tavsiye etmişler, böylece kanatlılarda patojenik mikoplazma etkenlerinin yaygınlığının belirlenerek hastalığın azaltılması ve vertikal bulaşmayı en aza indirmek için de gerekli kontrol önlemlerinin alınması gerekliliğini bildirmişlerdir. Tüm bu belirtilenler dikkate alınarak bu çalışmada da moleküler test yöntemlerinin söz konusu üstünlükleri değerlendirilmiş ve mikoplazma etkenlerinin tanısı için PCR testi tercih edilmiştir.

Araştırmacılar çok sayıda mikoplazma etkeninin tek seferde analiz edilebileceği multipleks PCR testleri dizayn ederek tanı açısından iş yükü, maliyet ve zaman konusunda avantaj elde etmeye çalışmışlardır. Garcia ve ark. (1995), MG, MS ve MI için tür spesifik multipleks PCR dizaynını, etkenlerin bilinen 16S ribosomal RNA (rRNA) bölümlerine özgü primerler kullanarak yaptıklarını bildirmişlerdir. Wang ve ark. (1997), spesifik dört mikoplazma etkeni için multipleks PCR geliştirmişler ve optimize ettiklerini bildirmişlerdir. Mettifofo ve ark. (2015), multipleks PCR tekniği ile patojen kanatlı mikoplazma etkenlerinin tespit edilmesinde düşük reaktif hacimlerde, yüksek duyarlılık, özgüllük ve doğruluk gibi avantajları ile rutin teşhiste kullanılabileceğini, kanatlı çiftliklerinin izleme programlarında kullanılmak üzere kanatlı türlerinde multipleks PCR ile MG ve MS enfeksiyonuna neden olan mikoplazma türleri ve MG-F aşısı suşunun eşzamanlı olarak tespit edilebileceğini ve multipleks PCR testinin ayırıcı, hızlı, hassas ve spesifik bir tanı yöntemi olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir. Abd-El-Tawab ve ark. (2020), klinik örneklerle uyguladıkları multipleks PCR testinin MS ve MG'nin tek bir reaksiyonda eşzamanlı tespitinde duyarlı ve spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Avantajları sebebiyle bu çalışmada da spesifik patojen mikoplazma etkenlerinin en kısa sürede ve doğru olarak tespit edilebilmesi için bir multipleks PCR testi kurgulanmış ve kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla tanı için daha önceden çalışılmış ve başarısı kanıtlanmış primerler arasından bant yükseklikleri birbirinden oldukça farklı olan primerler tercih edilerek muhtemel etyolojik miks durumlarında, bant karışıklığının önüne geçilmiş, PCR için reaksiyon bileşenlerinin standart olduğu ticari bir multipleks PCR master miks kullanılarak da optimizasyon konusunda zaman kazanılmış ve büyük avantaj elde edilmiştir.

Bazı araştırmacılar, kurguladıkları multipleks PCR testlerinde, testlerin minimum tespit limitlerini de belirlemişlerdir (Wang ve ark. 1997; Stagenborg ve ark. 2006; Mettifofo ve ark. 2015). Bulunan değerler genel olarak 1pg ile 1ng DNA miktarı arasında bildirilmiştir. Kurgulanan bu çalışmada ise kullanılan multipleks PCR için 10ng DNA miktarı, her üç etkenin de beraber tespit edilebileceği en düşük DNA miktarı olarak belirlenmiştir. Bulunan bu rakam daha önceki benzer çalışmalara göre biraz yüksektir. Bunun sebebi, multipleks PCR reçetesinde kullanılan döngü sayısının, oluşabilecek non spesifik bantların önlenmesi için düşük tutulmasına bağlı olabilir.

Çok sayıda araştırmacı, klinik semptomlu kanatlılarda mikoplazmaların PCR testi ile tanısı için çalışmalar yapmıştır. (Tomar ve ark. 2017a; Abd-El-Tawab ve ark. 2020; Shingade ve ark. 2020). Bu çalışmada da klinik olarak semptom gösteren kanatlılardan patojen mikoplazma etkenlerinin muhtemel identifikasyonu için tespit oranı artırılmış, uygulanan multipleks PCR testinin tanı performansı incelenmiştir. Ayrıca klinik semptomlu kanatlıların seçilmesi, uyguladığımız multipleks PCR testi açısından "çeşitli mikroorganizmaların bulunduğu ve daha karmaşık bir mikrobiyal ortamdan" spesifik mikoplazma etkenlerinin tanısı için doğal çalışma olanağı sunmuştur. Elde edilen sonuçlar, uyguladığımız multipleks PCR testinin, benzer çalışmalar için de tanı amacıyla kullanılabilirliğini göstermiştir. Bu çalışmayı farklı bir açıdan değerlendirecek olursak, benzer klinik semptomlara rağmen, negatif sonuçlanan multipleks PCR testleri de, semptomların farklı enfeksiyöz nedenlerle oluşabileceğini ve bunların da aslında azımsanmayacak çoğunlukta olabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple benzer klinik tabloları oluşturan diğer hastalıklar yönüyle de çalışmaların yapılması, önlemlerin belirlenmesi açısından yararlı olacaktır. Ayrıca bu çalışmada, sadece mikoplazma etkenleri araştırılmış, mikoplazmalarla ko-enfeksiyon yapan diğer etkenlerin tespiti için çalışılmamıştır. Ancak fakültemize getirilen kanatlılarda görülen çok hafiften ağıra olacak şekilde klinik tablo farklılıkları, mikoplazmaların içinde olduğu enfeksiyonların aslında farklı etkenlerle de miks olabileceğini, klinik tablonun da bu sebeple değişken olabileceğini (Arda 1984; Kleven ve ark. 2004; Çarlı 2019) düşündürmektedir. Bu konuda da ayrı bir çalışma yapılması, bölgede mikoplazmalara eşlik eden etkenlerin de tanımlanması, koruma ve kontrol tedbirleri için faydalı olabilir.

Araştırmacıların çalışmaları sonucunda, işletmelerde ve/veya aynı hayvanda, birden çok patojen mikoplazma etkeninin olabileceği bildirilmiştir. Tavuk ve hindilerde patojen mikoplazmaların miks enfeksiyonlarının nadir görülemeyecek seviyede olduğu, özellikle hem MG hem de MS ile aynı anda enfekte olan ticari damızlık tavuk sürülerinin kültür, seroloji ve PCR testleri ile ayırt edilmesi ve teşhis edilmesi gerektiği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Bradbury ve McClenaghan, 1982, USDA, 1985). Buim ve ark. (2009) multipleks PCR tekniği ile yaptıkları epidemiyolojik çalışmada, solunum problemleri kanatlıların bulunduğu yumurtacı tavuk çiftlikleri, ticari tavuk işletmeleri ve ticari kanatlı kümeslerinden aldıkları 1046 svab örneğinden MG, MG-F ve MS etkenlerini aynı anda tespit etmişler, bu oranları yumurtacı tavuk çiftliklerinde %27.27, ticari tavuk işletmelerinde %1.05, ticari kanatlı kümeslerinde ise %37.14 olarak belirlemişlerdir. Tomar ve ark. (2017a), yaptıkları çalışmada PCR testi ile aynı hayvana ait numunede 2 farklı mikoplazma etkenini miks olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Abd-El-Tawab ve ark. (2020), solunum belirtilerinin olduğu kanatlı hayvan işletmelerinde, MS ve MG tespiti için yaptıkları çalışmada, etkenlerin aynı işletmede beraber bulunabileceklerini belirterek, böylece işletmelerde her iki etkeninde olduğu miks enfeksiyonların hakim olduğunu göstermişlerdir. Marouf ve ark. (2020), çalışmalarında bir yumurta kesesi örneğinden elde ettikleri izolatların PCR analizini yapmışlar, aynı anda MS ve MG etkenlerinin her ikisi için pozitif sonuç aldıklarını, böylece her iki enfeksiyonun aynı anda bulunabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da, uyguladığımız multipleks PCR testiyle çok sayıda ve aynı hayvanda bulunmak üzere miks mikoplazma türlerinin (2'li miksler) varlığı belirlenmiştir. Bu durum, çok çeşitli patojen mikoplazma etkenlerinin aynı işletmede olmasını akla getirmektedir. Miks oranının yüksek olması, örneklerimizin rastgele değil, klinik semptomlu hasta hayvanlardan temin edilmiş olmasıyla birlikte test edilen bu kanatlıların geldiği, bölgemizde faaliyet gösteren profesyonel olmayan işletmelerin, başka bir ifadeyle halk elindeki kanatlı işletmelerinin yönetim eksikliklerine bağlı olabilir.

MG ve MS etkenlerinin tespiti için yapılan araştırmalarda, kanatlı hayvanlarda bulunma oranları açısından etkenler için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Abd-El-Tawab ve ark. (2020), yapmış oldukları çalışmanın sonunda, MS'yi, tavuklarda en sık görülen mikoplazma etkeni olarak tespit etmişlerdir. Paralel olarak Rajkumar ve ark. (2018), farklı bölgelerden toplam 26 kanatlı sürüsünde (n=309) MG ve MS enfeksiyonunun hala önemli bir sorun olduğunu ve PCR ile tespit edilen prevalansın MS için %33, MG için %11.65 bulunduğunu ve MS prevalansının daha yüksek seyrettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaların aksine Tomar ve ark. (2017a), uyguladıkları dubleks

PCR sonucunda, %27 oranında MG, %2.1 oranında MS için pozitif sonuç aldıklarını belirterek MG için yaygınlığı göstermişlerdir. Marouf ve ark. (2020), çoğunluğunu tavukların oluşturduğu değişik türden kanatlılardan aldıkları numunelerde, PCR testi ile yürüttükleri çalışmalarında, MG için %53.7, MS için %24.3 oranında pozitif sonuç elde etmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada ise, MG varlığı tavuklarda küçük bir farkla daha yüksek oranda tespit edilirken, hindilerde ise MG ve MS etkenlerinin varlıkları eşit miktarda tespit edilmiştir. Araştırmacıların sonuçları arasında farkların oluşmasında örnekleme yapılan hayvan sayılarının da etkili olduğu düşünülmektedir. Tomar ve ark. (2017b), bu hususla ilgili yaptıkları değerlendirmede, MG ve MS için mikoplazmoz prevalansının düşük veya yüksek olmasını numune tipine, numune toplama mevsimine, numune alma yöntemine, sürveyans programındaki farklılığa, hastalığın vertikal bulaşmasına ve kanatlı çiftliklerinde sürveyans programının olmamasına bağlamaktadır. Türkiye'deki kanatlılarda, mikoplazma etkenlerine yönelik yapılan benzer çalışmalarda, etkenlerin bulunma sıklığının %8.3 ile %16.3 oranları arasında seyrettiği belirtilmiştir (Ülgen 1991, Akan 2008). Bu çalışmada bulunan sonuçlar, tavuklarda %32, hindilerde ise %58 dir. Bu oranlar, daha önce belirtilen oranların üzerindedir. Bunun sebebi, yukarıda anlatılan ve etkenlerin tespit edilebilirliklerindeki oransal farklılıklara sebep olan faktörler olabileceği gibi, ilave olarak, bu çalışmada klinik semptomlu ve profesyonel olmayan halk elindeki kanatlıların tanı için seçilmiş olmasından ve ayrıca bu çalışmanın bölgesel bir nitelik taşıyor olmasından da kaynaklanabilir.

Genel olarak MM, hindilere özgü bir patojen olarak kabul edilmiş (Yamamoto 1965; Kleven 2003; Öngör ve ark. 2009; Çarlı 2019), MM ve MI etkenlerinin hindilerdeki varlığı çok sayıda çalışmada araştırılmış, bu amaçla PCR testi yoğun olarak kullanılmıştır. Zhao ve Yamamoto (1993), yaklaşık 850 bp büyüklükte bant veren MM spesifik primerler kullanarak, 17 MM ve diğer kanatlı mikoplazma türlerinden 16'sı ile PCR testi yapmışlar, sonuç olarak testin oldukça hassas olduğuna vurgu yaparak tanı da kullanılabileceğini çalışmalarında bildirmişlerdir. Boyle ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada, hindilerde spesifik etkenler olarak kabul edilen MM ve MI için sırasıyla 424 bp ve 427 bp büyüklüğünde bant oluşturan, söz konusu etkenlerin 16S rRNA bölgesinden primerler geliştirdiklerini ve bu primerlerle birlikte saha izolatları ve referans suşların tanısı için çalışmalar yaptıklarını, sonuçta uyguladıkları PCR analizi ile kültür metodunun aynı sonuçları verdiğini, bu şekilde PCR kullanımının kültür yöntemine göre

çok kısa zamanda ve avantajlı olarak tanıyı sağlayacağını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da MM için 424 bp büyüklüğünde bant veren primerler seçilmiş ve diğer araştırmalarda tavsiye edildiği gibi tanı için kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Ayrıca kullandığımız multipleks PCR testi, kurguladığımız şekli değiştirilmeden, MM için spesifik primer çiftini de içerecek şekilde, sadece hindilerden alınan inceleme örneklerine değil, tavuklardan alınan inceleme örneklerine de uygulanmış, ancak MM sadece hindilerde tespit edilmiştir. Tavuk numunelerinde bu etkene rastlanılamamıştır. Bu sonuç daha önce yapılan ve çoğu araştırmacının belirttiği şekilde genel kabule uygun olarak etkenin hindilere özgü olduğu sonucunu desteklemektedir. Ancak tüm bu bilinenlerin aksine Khiari ve ark. (2011), bir hindi yetiştirme ünitesinin yakınında bulunan ve klinik mikoplazmoz belirtileri gösteren (solunum sistemi semptomları ve performans düşüklüğü) tavuklarda yaptıkları çalışmada, aldıkları trakeal sürüntülerden ilk defa olmak üzere 10 adet MM saha suşunu klasik kültür yöntemi kullanarak izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu durum araştırmalarda tavukların da MM infeksiyonları açısından değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır. Çalışmamızda, MM spesifik primer içeren PCR test kurgusunun tavuklar için değiştirilmemiş olmasının ve etkenin tavuklarda da araştırılmasının bir sebebi de bu durumdur.

Bazı araştırmacılar, MM ve MI etkenlerinin kümeslerde vertikal olarak bulaşması ve hindi konakçılarına özgü olmalarına rağmen, diğer patojenik mikoplazma etkenlerine oranla daha az rastlanıldığını ve hatta bazı batı Avrupa ülkelerinde endemik seviyede kaldığını belirtmişlerdir (Miller 1994; Stipkovits ve Kempf 1996) Bu çalışmadaki bulgular da önceki çalışmalara uygun olarak diğer etkenlere oranla az sayıda MM tespitiyle sonuçlanmıştır.

Bu çalışma sonucunda, Şanlıurfa bölgesindeki kanatlı hayvanlarda patojenik mikoplazma etkenlerinin mevcudiyeti, kanatlı türlerindeki dağılımı ve bölgedeki semptom gösteren kanatlılarda mikoplazma infeksiyonunun yaygınlığı hakkında ön bilgiler edinilmiştir. Tanı yöntemi olarak dizayn ettiğimiz multipleks PCR testi için, daha önce çalışılmış ve güvenilir primerler seçilerek ve ticari bir multipleks master miks kullanılarak optimizasyon ve standardizasyon problemleri büyük oranda ortadan kaldırılmıştır. Ancak alınan sonuçlar her ne kadar sorunsuz olarak karşımıza çıksa da, bu testin rutin tanı testi olarak güvenle kullanılması için diğer testlerde olduğu gibi, sensitivite ve spesifitesinin belirlenmesinin yanında, validasyonu için de çalışmaların kurgulanması oldukça önemlidir.



Sonuç olarak, kurgulanan multipleks PCR ile MM, MS ve MI etkenlerinin moleküler tanısı, direkt sıvı besiyerlerinden ve aynı anda olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Tavuk numunelerinin %32'sinde, hindi numunelerinin ise %58'inde en az bir mikoplazma etkeni tanımlanabilmiştir. Üç farklı mikoplazma türünün çalışıldığı evcil kanatlılarda, bu 3 etkenin miks olduğu herhangi bir duruma rastlanılamamıştır. Miks enfeksiyonlar açısından en fazla MG+MS birlikteliğine rastlanılmış, etkenler tek olarak ele alındığında ise her iki kanatlı türünde de ilk sırada MG, daha sonra da MS etkeni baskın mikoplazma türleri olarak tespit edilmiştir. MM etkeninin varlığına sadece hindilerde rastlanılmıştır. Bu çalışma ile Şanlıurfa bölgesindeki işletmelerde mikoplazma enfeksiyonlarının mevcudiyeti belirlenerek hastalık için bir farkındalık oluşturulmuş, tehlikenin boyutları hakkında öngörü sahibi olunmuştur. Enfeksiyonların engellenmesi, bulaşmanın önüne geçilmesi ve hastalıkla mücadele edilmesi için ivedilikle önlemlerin alınması gerektiği düşünülmektedir.

**Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler:** Bu çalışmada etik kurul iznine gerek yoktur.

**Teşekkür:** Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü OIE Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarı Şefi Dr. Ümit Özdemir'e katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Abd-El-Tawab AA, Hassan WMM, El-ordy MS. (2020). Detection of virulence factors of Mycoplasma species isolated from chicken by multiplex PCR. *BVMJ*. 38, 61-65.
- Akan M, İzgür M, Sareyyüpoğlu B, Çiftçi A, İça T. (2008). Tavuklarda Solunum Sistemi Hastalıklarının Epidemiyolojisi. Ankara Üniv. BAP Projesi-Ankara.
- Arda M, İzgür M. (1984). Kanatlılarda Mikoplazma enfeksiyonları. *Etik Vet Mikrobiyol Derg.* 5, 124-137.
- Boyle JS, Good RT, Morrow CJ. (1995). Detection of the turkey pathogens *Mycoplasma meleagridis* and *M. iowae* by amplification of genes coding for rRNA. *J Clin Microbiol.* 33, 1335-1338.
- Bradbury JM, McClenaghan M. (1982). Detection of mixed mycoplasma species. *J Clin Microbiol.* 16, 314-318.
- Bradbury JM. (2001). Avian mycoplasmosis. Jordan F, Pattison M, Alexander D, Faragher T, eds. *In Poultry diseases*. Fifth edition. WB Saunders, New York, p. 178-193.
- Buim MR, Mettifofo E, Timenetsky J, Kleven S, Ferreira AJP. (2009). Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesqui Vet Bras.* 29, 552-556.
- Carlı KT. (2019). Bakteri Enfeksiyonları. Kanatlı Hayvanların Enfeksiyon Hastalıkları. Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, p. 215-352.
- Charlton BR, Bermudez AJ, Boulianne M, Eckroade RJ, Jeffrey JS, Newmann LJ, Sander JE, Wakenell PS. (1996). Avian Disease Manual American Association of Avian Pathologists

- Poultry Pathology Laboratory University of Pennsylvania, Pennsylvania.
- Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB. (1973). *Infecções bacterianas e micóticas*. São Paulo (SP). *Edart.* 1-9.
- Esendal Ö. (2002). Mikoplazma enfeksiyonları. İzgür M, Akan M. eds. *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*. Medisan, Ankara, p.79-85.
- Frey ML, Hanson RP, Anderson DP. (1968). A ~Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas. *Am J Vet Res.* 29, 2163-2171.
- 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, 606-16.
- Gondal MA, Rabbani M, Muhammad K, Yağub T, Babar ME, Sheikh AA, Ahmad A, Shabbir MZ, Khan MI. (2015). Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* Isolated From Commercial Poultry Flocks. *JAPS.* 25, 108-113.
- Kempf I. (1998). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol.* 27, 7-14.
- Kesler K, Güler L, Orhan G. (2013). Yumurtacı tavuk işletmelerinde *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun çabuk serum aglütinasyon, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleriyle araştırılması. *Eurasian J Vet Sci.* 29, 76-81.
- Khiari AB, Landoulsi A, Aissa H, Mlik B, Amouna F, Ejlasi A, Mardassi BBA. (2011). Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from chickens. *Avian Dis.* 55, 8-12.
- Kleven SH. (1998). Mycoplasmosis: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, JE Pearson, Reed WM, eds. *American Association of Avian Pathologists*. Fourth edition. Kennett Square, Pennsylvania, p. 74-80.
- Kleven SH. (2003). Mycoplasmosis. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, eds. *Diseases of poultry*. Eleventh edition. Iowa State University Press, Ames, IA, p. 719-721.
- Kleven SH, Jordan FTW, Bradbury JM eds. (2004). Avian Mycoplasmosis: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Fifth edition. Paris: Office International des Epizooties, p.1-24.
- Liu T, Garcia M, Levisohn S, Yogev D, Kleven S. (2001). Molecular variability of the adhesion-encoding Gene pvp Among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 39, 1882-1888.
- Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I (2002). Polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.* 31, 163-168.
- Marouf S, Moussa IM, Heba Salem H, Sedeik M, Elbestawy A, Hemeg HA, Dawoud TM, Mubarak AS, Mahmoud H, Alsubki RA, Bahkali AH. (2020). A picture of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry in Egypt: Phenotypic and genotypic characterization. *Journal of King Saud University - Science.* 32, 2263-2268.
- Mendonça GA, Nascimento ER, Lignon GB, Nascimento MGF, Polo PA. (2000). PCR na detecção de *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) em galinhas poedeiras vacinadas com MG-F e com doença respiratória. *Braz J Poult Sci.* 2, 83.
- Mettifofo E, Buziniani M, Buim MR, Timenetsky J, Ferreira AJP. (2015). Evaluation of a PCR multiplex for detection and differentiation of *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, and *M. gallisepticum* strain F-vaccine. *Pesqui Vet Bras.* 35, 13-18.
- Miller O. (1994). Mycoplasmosis: national survey of commercial poultry flocks. In Proc. 43rd Western Poultry Diseases Conference, March 27-February 1, Sacramento, California.

- OIE. (2021). Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, p. 482-496.
- Öngör H, Kalın R, Karahan M, Çetinkaya B, Akan M. (2009). Detection of mycoplasma species in turkeys by culture and polymerase chain reaction, *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 28, 1103-1109.
- Rajkumar S, Reddy MR, Somvanshi R. (2018). Molecular prevalence and seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in Indian poultry flocks. *J Anim Res.* 8, 15-19.
- Rajkumar S, Reddy MR, Somvanshi R (2019). Molecular typing of Indian *Mycoplasma gallisepticum* isolates. *Indian J Anim Res.* 53, 1645-1650.
- Shingade AA, Gandge RS, Majee SB, Zende RJ, Pharande RR, Ingle SA. (2020). Detection of *Mycoplasma* spp. from Choanal and Tracheal Samples using Genus Specific Polymerase Chain Reaction. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 9, 1099-1108.
- Songer JG, Post KW. (2012). Hücre Duvarı Olmayan Bakteriler. Anđ Ö, Yakut Özgür N, eds. *Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, p. 39, 305-317.
- Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Imberechts H, Peeters J, De Kruif, A, Haesebrouck F, Maes D. (2006). A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. *Vet Res Commun*, 30, 239-247.
- Stipkovits L, Kempf I. (1996). Mycoplasmoses in poultry: an overview. In *Animal mycoplasmoses and control. Rev sci tech Off int Epiz.* 15, 1495-1525.
- Tomar P, Singh Y, Mahajan NK, Jindal N, Singh M. (2017a). Duplex PCR for direct detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* from tissues of poultry affected with respiratory infections. *Int J Livest Res.* 7, 280-286.
- Tomar P, Singh Y, Mahajan NK, Jindal N, Sing M. (2017b). Molecular Detection of Avian Mycoplasmas in Poultry Affected with Respiratory Infections in Haryana (India). *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 6, 2155-2162.
- US. Dept. of Agriculture. (1985). National poultry improvement plan and auxiliary provisions. USDA, *Bulletin*, p. 91-40.
- Ülgen M. (1991). Kanatlıların Kronik Solunum yolu enfeksiyonu üzerinde karşılaştırılmalı bakteriyolojik ve serolojik araştırmalar. Doktora Tezi. UÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Wang H, Fadl AA, Khan MI. (1997). Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *MCP.* 11, 211-216.
- Yamamoto R, Bigland CH, Ortmyer HB. (1965). Characteristics of *Mycoplasma meleagridis* sp. isolated from turkeys. *JB.* 47-49.
- Zakeri A. (2016). Polymerase Chain Reaction of *mgc2* and 16S rRNA Genes for Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *IJAS.* 6, 59-65.
- Zhao S, Yamamoto R. (1993). Detection of *Mycoplasma meleagridis* by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 36, 91-97.