



Kanatlılarda kronik solunum yolu hastalığının (CRD) serolojik tanısı için in-House Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) geliştirilmesi

Sevil Erdenliğ Gürbilek¹, Ayfer Güllü Yücepete², Ahmet Murat Saytekin³,
Oktay Keskin⁴, Osman Yaşar Tel⁵

¹Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 21.07.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 04.10.2023

Özet: Tavukların üst solunum yollarında *Mycoplasma gallisepticum* (MG)'un oluşturduğu kronik solunum sistemi hastalığı (CRD), dünyanın birçok ülkesinde kanatlı sağlığı ve hayvansal üretim üzerinde büyük etkileri olan, ciddi ekonomik kayıplara sebebiyet veren bulaşıcı bir enfeksiyondur. Hem hastalığın teşhisinde hem de antikor titresinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sensitivite ve spesifitesi yüksek olan bir testtir. Bu çalışmada, CRD enfeksiyonuna karşı gelişen antikorları saptamak için farklı suşların antijen olarak kullanıldığı "in house" bir ELISA prototipi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 1 standart suş (MG S6), 1 aşı suşu (MG 6/85) ve 3 saha suşu (MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120) olmak üzere 5 suş ile hazırlanan ELISA'ların referans serumlar (125 gerçek pozitif ve 44 gerçek negatif) kullanılarak duyarlılığı ve özgüllüğü saptanmıştır. Buna göre MG 6/85, MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120 ve MG S6 suşlarından hazırlanan ELISA'ların duyarlılığı sırası ile % 92, %94, %95, % 96,8 ve % 92 olarak belirlenmiştir. Testlerin özgüllüğü aynı sıra ile % 95,6 %95,6, %95,6, %96,7 ve % 93,6 olarak hesaplanmıştır. Özgüllüğü ve duyarlılığı diğerlerine göre daha yüksek olan MG HMA 120 suşundan hazırlanan ELISA prototipi ticari üretim için seçilmiştir. *M. gallisepticum* ile infekte bir sürüden alınan 35 serumun MG HMA 120 ELISA ile test edilmesi sonucunda serumların 28'i pozitif, 5'i şüpheli ve 2'si negatif olarak saptanmıştır. Optik Dansite (OD) değerlerine bağlı olarak aynı serumların ticari MG ELISA ile test edilmesi ile alınan sonuçlar yerli MG HMA 120 ELISA ile alınan sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. İki kit arasında yüksek bir korelasyon katsayısı bulunmuştur (Pearson's korelasyon katsayısı (r)=0,78, p=0,01). Bu çalışmada yerli bir suştan yeni geliştirilen in house ELISA' nın *M. gallisepticum*'un neden olduğu CRD vakalarında güvenle kullanılabileceği, ticari muadillerine göre benzer özgüllük ve duyarlılık gösterdiği ve saha kullanımı için pratik ve ucuz bir alternatif olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: CRD, ÇLAT, in house ELISA, *Mycoplasma gallisepticum*, Serolojik tanı.

Preparation of in House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for serologic diagnosis of chronic respiratory disease (CRD) in poultry

Abstract: Chronic respiratory disease (CRD) significant, caused by *Mycoplasma gallisepticum* (MG) in the upper respiratory tract of chickens, is a contagious infection that causes severe economic losses in many countries of the world, greatly impacting poultry health and animal production. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) has high sensitivity and specificity which is widely used for both diagnosis of the disease and antibody titer determination. This study aimed to develop an "in-house" ELISA prototype in which different strains are used as antigens to detect antibodies to CRD infection. For this purpose, the sensitivity and specificity of ELISAs prepared with a total of 5 strains, including one standard strain (MG S6), one vaccine strain (MG 6/85 and 3 field strains (MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120), were determined using 125 true positive and 44 true negative reference sera. Sensitivity rates were found as 92%, 94%, 95%, 96.8% and 92%, respectively. Specificities were found as 95.6%, 95.6%, 95.6%, 96.7% and 93.6%, respectively. According to the results, MG HMA 120 local strain based in-house ELISA was chosen for commercial production for a later stage. A total of 35 sera from the *M. gallisepticum* infected flock were tested by commercial ELISA and our in-house MG HMA120 ELISA for comparison based on OD values. 28 out of 35 were found positive, five suspected and two negative by using MG HMA 120 ELISA. A high correlation coefficient (r)=0.78, p=0.01) was determined between commercial and in-house ELISA. It was concluded that newly developed in-house ELISA using local whole cell antigen could be used safely, giving similar sensitivity and specificity to commercial ELISA kit, for serologic diagnosis of *M. gallisepticum* infections. It is a practical and cheap alternative for field use.

Keywords: CRD, in-house ELISA, *Mycoplasma gallisepticum*, RSAT, Serologic diagnosis.

Giriş

Türkiye, kanatlı hayvancılık sektörünün önemli bir üreticisi, tüketicisi ve ihracatçısıdır. Kanatlı yetiştiriciliği, yarattığı istihdam, modern entegre tesis yatırımları,

uzman üretim, işleme ve pazarlama mekanizması, dış ticarete sahip olduğu yüksek pay, sağlıklı ürün arzı ile Türkiye için önemli bir sektördür. Türkiye'de hem sektörde hem de yan dallarda yaklaşık 600 bin

Yazışma adresi / Correspondence: Oktay Keskin, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Eyyübiye Yerleşkesi Eyyübiye, Şanlıurfa, Türkiye e-posta: okeskin@harran.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-0377-2650 • ²0000-0002-9842-3305 • ³0000-0001-7486-8054 • ⁴0000-0002-5977-7872 • ⁵0000-0001-7848-3899

kişi istihdam edilmektedir. Üretici çiftçi, sektörle ilgili esnaf, yem, ilaç, yan sanayi, nakliye, pazarlama dahil sektörden elde edilen gelirle hayatını sürdüren kişi sayısı yaklaşık 2,4 milyondur (Koca 2017).

Kronik solunum sistemi hastalığı (CRD), tavukların üst solunum yollarında *Mycoplasma gallisepticum* (MG)'un neden olduğu bir hastalıktır. MG, *Mollicutes* sınıfı, *Mycoplasmatales* takımı ve *Mycoplasmataceae* ailesi, *Mycoplasma* cinsinde yer alır. Kanatlı hayvanlarda hastalığa neden olan en önemli mikoplazma türleri MG ve *M. synovia* (MS)'dir. *M. meleagridis* ve *M. iowae* etkenleri de kanatlılarda hastalık yapsa da MG patojenik mikoplazmalar içinde en önemlisi olarak kabul edilmekte ve dünyanın birçok ülkesinde görülen kanatlı sağlığını yakından ilgilendiren ve hayvansal üretim üzerine başta yemin ete dönüşümünü, karkas kalitesini ve yumurta verimini düşürerek önemli ekonomik kayıplara neden olan bulaşıcı bir enfeksiyondur (WOAH 2021).

Kanatlı hayvanlarda enfeksiyondan dolayı komplike vakalarda ölüm oranında ciddi artışlar, ilaç ve tedavi masrafları, broilerlerde karkas ağırlığının düşmesi, yüksek iskarta oranı, damızlık ve yumurtacı sürülerde yumurta veriminde ve yem tüketiminde düşme, yumurta kabuk kalitesinde bozulma, yumurta üretiminde azalma, kuluçka verimliliğinde azalma, artırılmış biyogüvenlik önlemleri ve aşılama masraflarında artış gözlenir (Esendal 2002). Ayrıca, diğer enfeksiyonlar, yerleşim yeri, kalabalık ortam, zayıf hijyen ve enfeksiyöz bursal hastalık (IBD), enfeksiyöz bronşitis (IB), enfeksiyöz laringotraheitis (ILT) aşılama programları kayıpları arttırabilir. Broilerlerde ekonomik kayıplar canlı ağırlık artışında azalma (%20-30), yemden yararlanmada düşüş (%10-20), mortalite (%10-20) ve karkas kaybı (%10-20) olduğu bildirilmiştir (Özdemir 2013).

MG hindilerde enfeksiyöz sinuzitis nedenidir. MS enfeksiyonları genellikle tavuklarda subklinik üst solunum yolu enfeksiyonları şeklinde gözükür (Swayne 2013). CRD, Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (WOAH)'de yer alan bir enfeksiyondur. Klinik olarak CRD enfeksiyonlarında, konjunktivitis, nazal akıntı, solunum güçlüğü öksürük, hapşırma, tracheal sesler, göz ve burun akıntısı görülmektedir (WOAH 2021). Nekropside, sinus, trachea, bronşlar, akciğer ve hava keselerinde kataral eksudat, hava keselerinde opaklaşma, hava keseleri ve ovidukta kazeöz eksudat, perikarditis, perihepatitis, salpingitis bulunur.

Enfeksiyonun yaygınlığı ülkelere göre farklılık göstermektedir. ABD'de yumurtacı sürülerin %50'den fazlasının infekte olduğu ve MG'nin yumurtacılar da endemik olduğu bildirilmiştir (Evans ve ark. 2005). Asya'da yapılan çalışmalarda MG preva-

lansı %17,2-%79,0 (Sato 1996), İran'da %10 (Haghghi-Khoshkhoo ve ark. 2011), Mısır'da %33,3 (Osman ve ark. 2009) olarak bildirilmiştir. Kapetanov ve ark. (2010), Sırbistan'daki 77 sürünün MG seroprevalansının 2000 yılında %9,01 ve 2009 yılında %11,59 olduğunu ve MG prevalansının arttığını bildirmişlerdir.

Türkiye'de tavuklarda mikoplazma yaygınlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda Akan ve ark. (2008), serolojik ve moleküler inceleme sonucunda 43 broyler damızlık işletmesinin % 16,3'ünü MG pozitif, %20,9 MS pozitif olarak saptamışlardır. Özdemir (2013), Konya ve çevresindeki yumurtacı tavuk işletmelerinde solunum sistemi problemi olan ya da enfeksiyonu geçirmiş 33 sürüden 192 tavuğa ait solunum sistemi organlarını immunoperoksidaz ile incelemiş ve 20 (%60,6) kümeşte MG tespit etmiştir. Türkiye'nin batısında bulunan 3 ildeki 60 kümeşte toplanan 1060 kan örneğinin ELISA ile taranmasında %39,5 MG ve %67,9 MS seropozitifliği bulunmuştur (Özgül ve Türkyılmaz 2016).

Kanatlılarda CRD kontrolü ve önlenmesi etkili, spesifik, duyarlı ve ucuz tanı yöntemlerine bağlıdır. MG enfeksiyonunda görülen solunum sistemine ait klinik belirtiler diğer solunum sistemi hastalıklarıyla karışabildiğinden dolayı, günümüzde teşhiste, kültür, serolojik testler ve moleküler metodlar (polimeraz zincir reaksiyonu-PCR, Real-Time PZR ve nested PZR, loop-mediated isothermal amplification-LAMP) kullanılmaktadır. Kültürün sensitivitesi besiyerine ve numunenin alım zamanına göre değişmektedir. Kültür ile sonuç alınması ard arda pasajlar gerektirdiğinden 3-4 hafta gibi uzun süre almaktadır. Ayrıca uzmanlık gerektirmesi ve kullanılan antibiyotiklerin mikoplazmaların üremesini baskılaması da kültürün bir diğer dezavantajıdır. Etkenin varlığını tespit etmek için kullanılan PZR temelli moleküler metodlar daha fazla sarf malzeme gerektirmekte ve özel ekipmanlara ihtiyaç duymakta, dolayısıyla daha yüksek maliyet gerektirmektedir. Serolojik test olarak çabuk lam aglütinasyon testi (ÇLAT), hemaglütinasyon inhibisyon (HI) ve ELISA en çok kullanılan testlerdir (Kleven 2008; WOAH 2021). ÇLAT sürü bazında kullanılan çabuk bir tarama testidir ve MG enfeksiyonunu diğer ELISA ve HI testlerine göre daha erken saptasa da yanlış pozitif reaksiyonlara eğilimli bir testtir. Farklı kaynaklardan ve farklı serilerdeki antijenlerin sensitivite ve spesifitede farklı sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Kleven 1998). MG majör membran proteinlerindeki farklılığın suş varyasyonuna neden olduğu ve bunun da heterolog suşlara karşı gelişen antikor yanıtının zayıf olmasına yol açtığı bildirilmiştir (Noormohammadi ve ark. 2002). ELISA yüksek özgünlük ve duyarlılığa sahip, hızlı,

ekonomik ve çok sayıda serumun test edilmesine olanak sağlayan, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın kullanım alanı bulan bir testtir (Miao ve ark. 2000; Peng ve ark. 2022). Serolojik testlerde otolog antijenlerin kullanımı, anti-*Mycoplasma* antikorlarını test eden serolojik testlerin duyarlılığını artıracaktır (Noormohammadive ark. 2002; Hosseini ve ark. 2018). Bu nedenle de MG ve MS teşhisi için ticari ELISA kitleri mevcut olsa da ELISA'da antijen olarak yerel suş kullanımının testin duyarlılığını artıracacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, CRD infeksiyonuna karşı gelişen antikorları saptamak için farklı suşların antijen olarak kullanıldığı "in house" bir ELISA prototipi geliştirilmesi ve sonuçların mevcut ticari kitle karşılaştırılarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Standart suş

ELISA pleytlerini kaplamak için antijen hazırlanmasında kullanılan *M. gallisepticum* S6 suşu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, WOAH Mycoplasma Referans Laboratuvarı, Pendik, İstanbul'dan temin edildi.

Aşı suşu

Antijen olarak kullanılan *M. gallisepticum* 6/85 aşı suşu ise MSD Hayvan Sağlığı (ABD)'nden temin edildi.

Saha suşları

Çalışmada Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan ve HMA olarak kodlanan 3 adet saha suşu (MG HMA 9, MG HMA 79 ve MG HMA 120) ELISA pleytlerini kaplamak için antijen hazırlanmasında kullanıldı.

Kontrol ve saha serum örnekleri: Testin duyarlılık ve özgüllüğünün saptanmasında, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı serum koleksiyonunda bulunan CRD yönünden pozitif oldukları PZR ve kültür ile doğrulanmış 125 gerçek pozitif serum ve bu hastalık yönünden gerçek negatif olan 44 kontrol serumu kullanıldı. Ayrıca hazırlanan ELISA prototipinin ticari kitle karşılaştırılması için infekte olduğu teyit edilen bir sürüden teşhis amacıyla gönderilen 35 adet saha serum örneği kullanıldı.

İmmünolojik test prosedürleri

Çabuk lam aglütinasyon testi: Ticari olarak Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsünden temin edildi. Testin uygulanışında oda ısısına getirilen antijen ve serum

örneklerinden birer damla temiz bir pleyt üzerinde karıştırıldı. İki dakika içerisinde oluşan aglütinasyon test sonucu açısından pozitif olarak değerlendirildi.

in house ELISA için antijen hazırlamada kullanılacak suşların kültürü

Etken izolasyonu, Uluslararası Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH) Manuel'de belirtilen yöntemlere göre yapıldı. Frey Mycoplasma Broth Base (Himedia, Hindistan) üretici firmanın protokolü doğrultusunda hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildi. Besiyeri, 50-55°C soğutulduktan sonra steril şartlar altında besiyerine Mycoplasma Supplement G (Oxoid, Amerika Birleşik Devletleri) ve son konsantrasyonu %20 olacak şekilde at serumu (Himedia, Hindistan) ilave edilerek hazırlandı. Steril cam tüplere (her biri 5 ml) aktarılan Frey's sıvı besiyerlerine, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı suş bankasında bulunan *M. gallisepticum* saha izolatları (MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120), standart *M. gallisepticum* S6 suşu ve *M. gallisepticum* 6/85 aşı suşu ekildikten sonra 37°C'de mikroaerobik şartlarda (%5 CO₂) 72 saat inkübasyona bırakıldı.

in house ELISA antijeninin hazırlanması

Antijen hazırlamak için, ilk olarak her suş için 1 ml *M. gallisepticum* kültürü, 10 ml Frey's besi yerine eklenerek (1:10 oranında) 37°C'de (%5 CO₂) 72 saat inkübasyona bırakıldı. Aynı prosedür 100 ml sıvı besi yeri (1:10 oran) ve daha sonra 1000 ml Frey's sıvı besi yeri (1:10 oranı) elde etmek için uygulanarak alt kültürü sağlandı. Üreyen kültür (1000 ml) daha sonra 4°C'de 12.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi Süpernatant atıldıktan sonra pelet, 3 kez 150 ml steril phosphate-buffered saline-PBS (Bioshop, Kanada) ile yıkandıktan sonra 4°C'de 18.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet PBS içinde süspanse edildi ve oluşan bakteriyel süspanسیون ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere -20°C ye kaldırıldı. (Frey ve ark. 1968; WOAH 2021).

in house ELISA

Kaplama antijenlerinin ve kontrol serumlarının farklı dilüsyonları ile yapılan checkerboard analizi sonrasında, pozitif ve negatif kontrol serumları arasındaki en büyük farkın olduğu antijen dilüsyonu pleytlerin kaplanmasında kullanıldı. Kaplama solüsyonu olarak karbonat-bikarbonat buffer (pH 9,6) kullanıldı. Antijen kaplama dilüsyonu, 96 gözlü pleytin (NUNC, 269620, Denmark) her kuyucuğuna 100µl olarak konuldu. Pleytler +4°C de bir gece bekletildikten sonra, 3 kez yıkandı ve ardından bağlanmanın olmadığı

yerleri bloklamak için %5 sütozu (Merck, Almanya), %0,05 Tween (Merck, Almanya) içeren PBS (BLOTTO) solüsyonu pleytleri bloklamak üzere kullanıldı. Oda ısısında 2 saat bloklamadan sonra pleytler bir kez yıkandı ve pozitif ve negatif kontrol ve test serumlarının BLOTTO içinde 1/100'lük dilüsyonu farklı gözlemlere 100 µl olarak konuldu. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler üç kez yıkandı ve yıkama işleminin ardından HRPO ile işaretli Anti-Chicken IgY yine BLOTTO içinde daha önceden checkerboard ile saptanan uygun dilüsyonda hazırlanarak her kuyucuğa 100 µl eklenip karanlık ortamda etüvde (37°C) yarım saat inkübe edildi ve 4 kez yıkamanın ardından pleytlerin her gözüne 100 µl substrat (0.1 M sitrat tamponu (Merck, Almanya) (pH 5,5) içinde 2 µg ortho-phenylenediamine (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) ve %0,03 H₂O₂ ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H₂SO₄ (Tekkim, Türkiye) ilave edilerek pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573, Amerika Birleşik Devletleri) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Negatif serum OD'lerinin ortalamasına 3 standart deviasyon (SD) eklenerek ELISA eşik değeri olarak belirlendi. Bu eşik değerinin üstünde bulunan serumlar hastalık antikorlarını taşıyan pozitif serumlar olarak belirlendi.

in house ELISA tekniğinde sensitivite ve spesifitenin belirlenmesi

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı serum koleksiyonunda bulunan CRD yönünden pozitif oldukları PCR ve kültür ile doğrulanmış 125 gerçek pozitif serum ve bu hastalık yönünden negatif olan 44 kontrol serumu farklı antijenlerle hazırlanmış ELISA'ların duyarlılık ve

özgüllüğünün saptanmasında kullanıldı. Duyarlılık ve özgüllüğün hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanıldı.

Duyarlılık; (Gerçek Pozitif Sayısı) / (Gerçek Pozitif Sayısı+Yanlış Negatif Sayısı) X 100

Özgüllük; (Gerçek Negatif Sayısı) / (Gerçek Negatif Sayısı+Yanlış Pozitif Sayısı) X 100

Ticari ELISA: Geliştirilen test kitinin sensitivite ve spesifitesini karşılaştırmak için ticari olarak satın alınan ELISA kiti (BioChek MG ELISA kit, İngiltere), kitin prospektüsünde belirtilen talimatlara göre uygulandı.

İstatiksel Analiz

Ticari ve homemade ELISA'nın OD değerlerinin karşılaştırılması Pearson's correlation katsayısı (coefficient) (*r*) ile hesaplandı. Hesaplamalarda IBM SPSS istatistik programı (versiyon 16) istatiksel hesaplamalar için kullanıldı (IBM Corp. 2020).

Bulgular

Çabuk Lam aglütinasyon testi ile 125 gerçek pozitif referans serumun 107'si (%85,6) pozitif, 18'i (%14,4) negatif olarak değerlendirildi. Gerçek negatif olarak kullanılan 44 serumun tümü negatif olarak saptandı.

Bu çalışmada, 1 referans, 1 aşı ve 3 yerel saha suş olmak üzere toplam 5 ayrı MG suşundan hazırlanan tüm hücre antijeni ile kaplanan 5 ayrı in-house ELISA prototipinin duyarlılık ve özgüllüğü, 125 gerçek pozitif ve 44 gerçek negatif serum ile test edildi.

Alınan sonuçlara göre MG 6/85, MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120 ve MG S6 suşlarından hazırlanan ELISA prototiplerinin duyarlılığı sırası ile %92, %94, %95, %96,8 ve %92 olarak hesaplandı (Tablo-1).

Tablo 1. Gerçek pozitif serumların farklı MG suşları ile ELISA ve duyarlılık sonuçları

Toplam gerçek pozitif serum sayısı	Farklı suşlarla uygulanan ELISA sonuçlarına göre pozitif çıkan serum sayıları				
	MG 6/85	MG HMA 9	MG HMA 79	MG HMA 120	MG S6
125	114	117	119	121	114
% Sensitivite	92	94	95	96,8	92

Elde edilen verilere göre MG 6/85, MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120 ve MG S6 suşlarından

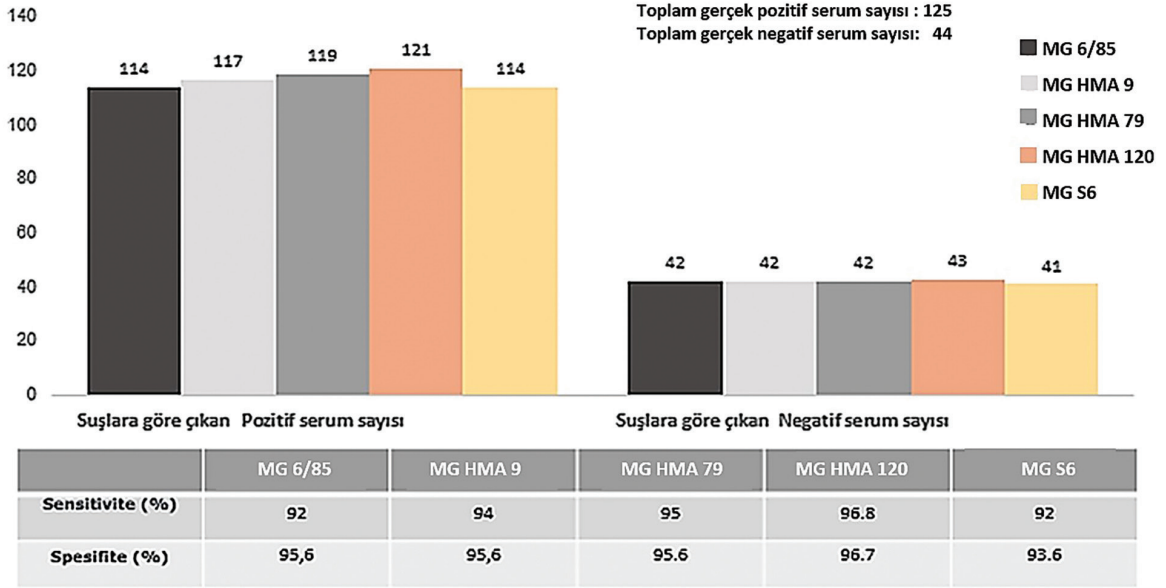
hazırlanan ELISA prototiplerinin özgüllüğü %95,6, %95,6, %95,6, %96,7 ve %93,6 olarak belirlendi (Tablo-2).

Tablo 2. Gerçek negatif serumların farklı MG suşları ile ELISA ve özgüllük sonuçları

Toplam gerçek negatif sayısı	Farklı suşlarla uygulanan ELISA sonuçlarına göre negatif çıkan serum sayıları				
	MG 6/85	MG HMA 9	MG HMA 79	MG HMA 120	MG S6
44	42	42	42	43	41
% Spesifite	95,6	95,6	95,6	96,7	93,6

ELISA için kullanılan 5 farklı suştan hazırlanmış antijenlerle pozitif ve negatif referans serumlardan elde edilmiş pozitiflik ve negatiflik sayıları ile sensitivite ve spesifite oranları grafik olarak Şekil-1'de verilmiştir.

Bu sonuçlara göre in-house ELISA için MG HMA 120 yerel saha suşu ile ELISA denemelerine devam edilmesine karar verildi.



Şekil 1. Farklı MG suşlarından hazırlanan ELISA ile kontrol serumlarının sonuçları ve sensitivite ve spesifite yüzdeleri.

Tablo 3. Çabuk lam aglütinasyon ile MG HMA 120 ELISA'nın karşılaştırılması

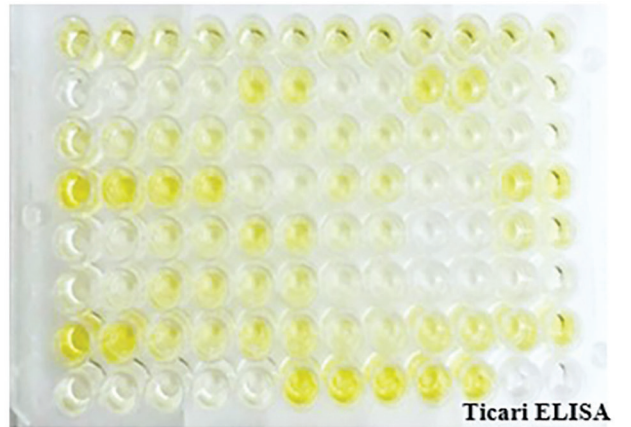
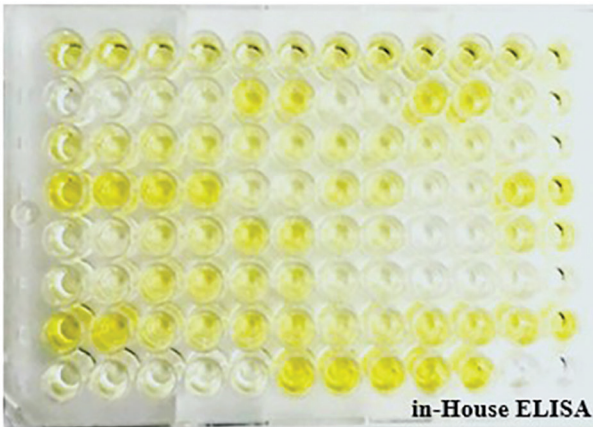
Serolojik test (n=125)	Pozitif (%)	Negatif (%)
Çabuk Lam aglütinasyon testi	107 (85,6)	18 (14,4)
ELISA MG HMA120	121 (96,8)	4 (3,2)

Gerçek pozitif serumların ÇLAT ile %85,6 MG HMA 120 ELISA ile %96,8 oranında pozitif sonuç verdiği belirlendi (Tablo-3). Bu suşla hazırlanan ELI-

SA prototipini test etmek için *M. gallisepticum* ile infekte olduğu belirlenen bir sürüden alınan 35 serum kullanıldı ve %80 pozitif, %14,7 şüpheli, %5,7 negatif olarak değerlendirildi (Tablo-4).

Tablo 4. in-House MG HMA 120 ELISA ile pozitif sürü serumlarına ait sonuçlar

Serolojik test (n=35)	Pozitif (%)	Şüpheli (%)	Negatif (%)
ELISA MG HMA120	28 (80)	5 (14,3)	2 (5,7)



Şekil 2. in-House ELISA ile ve Ticari ELISA ile test serumlarının sonuçları

İnfekte sürüden elde edilen bu 35 serum aynı zamanda ticari ELISA kiti ile de test edildi ve sonuçları karşılaştırıldı (Şekil-2).

Pearson's korelasyon katsayısı $r=0,78$ ($p=0,01$) olarak hesaplandı ve iki ELISA sonuçları arasında doğru yönlü yüksek bir uyum olduğu belirlendi (Tablo-5).

Tablo 5. Pearson Korelasyon katsayısı (Pearson correlation coefficient kullanarak in-House ELISA ve ticari ELISA arasındaki karşılaştırma

		Ticari ELISA	in-House ELISA
Ticari ELISA	Pearson korelasyon	1	0,78
	Significance (2 tailed)		0,010
	N	35	35
in-House ELISA	Pearson korelasyon	0,78	1
	Significance (2 tailed)	0,010	
	N	35	35

Tartışma ve Sonuç

MG özellikle tavuk ve hindilerde kronik solunum yolu hastalığına et ve yumurta üretiminde kayıplara neden olan önemli bir ajandır. Bu hastalıkta klinik semptomların gözlemlendiği vakaları tespit etmek kolay olmasına rağmen, subklinik vakalarda, bu vakaların görüldüğü kümeslerin izlenmesinde serolojik tekniklerden sıklıkla faydalanılmaktadır (Esendal 2002). Mikoplazmosis gibi vertikal bulaşan hastalıklarda, damızlıkların ve bunların civcivlerinin periyodik olarak izlenmesi, ülkede infeksiyonun durumu hakkında fikir vermesi açısından çok önemlidir ve böylece sektör de hastalık hakkında bilgi sahibi olur.

Hastalığın serolojik teşhisinde çabuk lam aglütinasyon, hemaglütinasyon inhibisyon ve ELISA en sıklıkla kullanılan serolojik testlerdir (WOAH 2021).

Ali ve ark. (2017), farklı yaşlarda ve farklı popülasyon hacmine sahip 12 farklı işletmeden toplanan 563 tavuk serum örneğinde ÇLAT ile %56,13, ELISA ile %64,47 seroprevalans saptadıklarını bildirmiştir. Malik ve ark. (2019) Pakistan'da aşılammış broyler sürülerinde MG seroprevalansını araştırdıkları çalışmada IgM antikorlarını saptayan ÇLAT tekniğinin enfeksiyonun sadece başlangıç aşamasıyla sınırlıyken, ELISA daha spesifik bulunmuş ve IgG antikorlarını saptayarak yanlış pozitif sonuçları ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Osman ve ark. (2009) 4 haftalık tavuk serumlarında ÇLAT ile %48,7, ELISA ile %60 pozitiflik saptarlarken 14 haftalık yumurtacılar da ÇLAT ile %69,9 ve ELISA ile %58,9 oranında

pozitiflik belirlemişlerdir. Bu çalışmada da ÇLAT ile 125 gerçek pozitif serumun 107'si (%85,6) pozitif bulunurken, MG HMA 120 ELISA 121'ini (%96,8) pozitif bulmuştur. ELISA ile ÇLAT'a göre daha yüksek oranlarda pozitiflik saptanması araştırmacının bildirimleri ile uyumludur. Osman ve ark. (2009)'nın 14 haftalık grupta seropozitifliğin ÇLAT'da ELISA'ya göre yüksek olmasının nedeni kanatlıların yaşı ile yalancı pozitifliğin daha fazla görülebilmesi ve dolayısı ile araştırmacıların çalışmalarında belirttiği üzere ÇLAT'ın düşük spesifitesine bağlı olabilir.

Wanasawaeng ve ark. (2015), Tayland'dan izole edilmiş yerel bir suş ile MG'a karşı oluşan antikorları saptamak amacıyla ELISA ve ÇLAT geliştirmek için yaptıkları çalışmada in-house ELISA ve ticari ELISA sonuçlarını karşılaştırmışlar sensitivitesini %67, spesifitesini %95 olarak saptamışlardır. Çalışmada solunum problemi bulunan ve ÇLAT pozitif bulunan 10 kümeden alınan 15'er serum test edilerek yerel suşla hazırlanan in-house ELISA'nın uluslararası pazarda bulunan benzeri ticari kitlelere göre uygulanabilir olduğunu bildirmişler ve bunun nedeninin saha suşu ile hazırlanan ELISA'nın ticari muadillerine yakın bir spesifite göstermesi olduğunu belirtmişlerdir. Rasool ve ark. (2017), 47 serum ile test ettikleri lokal bir suşdan hazırlanmış olan antijenle kaplı ELISA ile %89,13, ticari ELISA ile %80,43 oranında pozitiflik bulmuşlar ve aradaki farkın anlamlı olduğunu ($p<0,05$) bildirmişlerdir. Elyazeed ve ark. (2020), tam hücre ve sonike hücre antijenleri ile hazırladıkları iki farklı in-house ELISA sonuçlarını ticari bir ELISA kiti sonuçları ile karşılaştırmışlar Pearson's korelasyon katsayılarını sırasıyla ($r=0,80$, $p=0,009$ ve ($r=0,79$, $p=0,011$) olarak hesaplamışlardır. Elde ettikleri bu yüksek korelasyonu gösteren değerler sonucunda her iki in-house ELISA tekniğinin de kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, yapılan testlerle seçilen yerel MG HMA 120 olarak kodlanmış MG suşundan elde edilen tüm hücre antijeni ile hazırlanan in-house ELISA prototipi ile test edilen infekte bir sürüye ait 35 serum örneği aynı zamanda ticari bir kitle de test edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuçlar iki kit arasındaki korelasyon katsayısının yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Pearson's korelasyon katsayısı ($r=0,78$, $p=0,01$)). Bu durum, yerli bir suştan geliştirilen in house ELISA'nın MG'un neden olduğu CRD vakalarında güvenle kullanılabilir, ticari muadillerine göre benzer özgüllük ve duyarlılık gösteren, ucuz ve ekonomik bir test olduğunu düşündürdü. Noormohammadi ve ark. (2002), serolojik testlerde yerel suşlardan hazırlanan antijenlerin kullanımının mycoplasma antikorlarını tespit etmeyi hedef alan testlerin duyarlılığını artıracaklarını bildir-

mektedir. Çalışmada elde edilen bulgular da araştırıcıların (Noormohammadi ve ark. 2002; Rasool ve ark. 2017; Elyazeed ve ark. 2020) bulguları ile uyum göstermektedir.

Sonuç olarak, kanatlı sektöründe önemli kayıplar oluşturan ve sıkı kontrol altında tutulması gereken CRD varlığının belirlenmesi için, yerel bir izolat ile hazırlanan in-house ELISA tekniğinin daha yüksek sensitivite ve spesifite ile ticari ithal kitlerden çok daha ucuz olacak şekilde kullanılabileceği, böylece enfeksiyonun yayılmasını önlemek için enfekte sürülerin doğru ve zamanında teşhis edilerek kontrol programlarında başarıyı artıracadığı kanısına varıldı.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Bu araştırma için etik kurulu izni alınmasına gerek yoktur. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

Teşekkürler: Makale XV. Ulusal (uluslararası katılımlı) Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi'inde (22-26 Ekim 2022 şanlıurfa-Türkiye) sözlü olarak sunulmuştur. Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, WOAH Mycoplasma Referens Laboratuvarı ve MSD Hayvan Sağlığı'na teşekkür ederiz.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Kurulu Başkanlığı tarafından 21304 proje numarası ile desteklenmiştir. Yazarların beyan edecek çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

Akan M. (2008) Tavuklarda Mikoplazma İnfeksiyonları: Koruma ve Kontrol. *Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara*. 6, 21-24.

Ali Z, Sultana S, Karim R, Hassan Z, Yousuf A, Hossen A, Samad MA, Giasuddin M, Rahman M. (2017) Compared the effect of indirect ELISA and serum plate agglutination (SPA) test for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken. *Int J Health Animal Sci Food Saf*, 4, 59-66. <https://doi.org/10.13130/2283-3927/8975>

Elyazeed HA, Al-Atfeehy NM, Abotaleb R, Sayed R, Marouf S. (2020) Preparation of ELISA and Lateral Flow Kits for rapid Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in Poultry. *Sci Rep*, 10, 9056. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65848-7>

Esendal ÖM. (2002) Mikoplazma Enfeksiyonları "Kanatlı Hayvan Hastalıkları". Ed; Müjgan İzgür ve Mehmet Akan, 1. baskı, 79-94. Medisan, Ankara, Türkiye.

Evans JD, Leigh SA, Branton SL, Collier SD, Pharr GT, Bearson SMD. (2005) *Mycoplasma gallisepticum*: current and developing means to control the avian pathogen. *Poult Sci*. 14, 757-763. <https://doi.org/10.1093/japr/14.4.757>

Frey ML, Hanson RP, Anderson DP. (1968) A Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas. *Am J Vet Res*. 29, 2163-2171.

Haghighi-Khoshkhou P, Akbariazad G, Roohi M, Inanlo J, Masoumi M, Sami-Yousefi P. (2011) Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in the commercial layer flocks of the centernorth of Iran. *Afr J Microbiol Res*, 5(18), 2834-2837. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.647>

Hosseini S, Rito-Palomares M, Vazquez-Villegas P, Martinez-Chapa SO. (2018) Enzyme-linked Immunosorbent Assay From A to Z. Springer, India. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6766-2>

IBM Corp. (2020) IBM SPSS Statistics for Windows (Version 16.0) [Computer software]. IBM Corp.

Kapetanov M, Orlić D, Potkonjak D, Velhner M, Stojanov I, Milanov D, Stojanovic D. (2010) *Mycoplasma* in poultry flocks in the year 2009 compared to the year 2000 and significance of the control measures. *Lucr. řtiinđ. - Univ. Agron. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, Ser. zooteh.-med. vet.*, 43(1), 249-253.

Kleven SH. (1998) *Mycoplasmosis*. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 4th ed. DE Swayne, JR Glisson, MW Jackwood, JE Pearson and WM Reed (eds). American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kennett Square, PA. 74-80.

Kleven SH. (2008) Control of Avian *Mycoplasma* Infections in Commercial Poultry. *Avian Dis*. 52, 367-374. <https://doi.org/10.1637/8323-041808-Review.1>

Koca S. (2017) Türkiye'de Broiler Et Üretimi: Hedefler ve Potansiyel Problemler. *Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara*. 15(1), 4-10.

Malik M, Sohail M, Sajid M, Hammidullah, Bibi F, Shoaib M. (2019) Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in non Vaccinated broiler flocks in Abbottabad Khyberpakhtunkhwa, Pakistan. *Research in: Agricultural & Veterinary Sciences*, 3(1), 36-42.

Miao D, Zhang P, Gong Y, Yamaguchi T, Iritani Y, Blackall PJ (2000) The development and application of a blocking ELISA kit for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathol*. 29: 219-225. <https://doi.org/10.1080/03079450050045477>

Noormohammadi AH, Browning GF, Cowling PJ, O'Rourke D, Whitehear WG, Markham PF (2002) Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 by an autologous pMGA enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis*. 46, 405-411. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0405:DOATM-G\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0405:DOATM-G]2.0.CO;2)

Osman KM, Aly MM, Amin ZMS, Hasan BS. (2009): *Mycoplasma gallisepticum*: an emerging challenge to the poultry industry in Egypt. *Rev Sci tech Off int Epiz*. 28 (3), 1015-1023. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.28.3.1940>

Özdemir Ö. (2013) Tavukçuluk Sektöründe Devam Eden Sorun: *Mycoplasma gallisepticum* (MG) İnfeksiyonuna Genel Bir Bakış. *Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara*. 11(2), 5-10.

Özgün MR, Türkyılmaz S. (2016) The Determination of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antibodies in poultry blood sera with ELISA. *Kocatepe Vet J*. 9(1), 19-23. DOI: 10.5578/kvj.10870

Peng P, Liu C, Li Z, Xue X, Mao P, Hu J, Xu F, Yao C, You M. (2022) Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics. *Trens Anal Chem*, 152, 116605. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116605>

Rasool A, Anjum AA, Rabbani M, Lateef M, Nawaz M, Akhtar F, Kanwal A, Sattar S. (2017) Preparation of *Mycoplasma synoviae* antigens and evaluation by rapid slide agglutination and enzyme linked immunosorbent assay. *The J Anim Plant Sci*. 27(3), 841-847.

Sato S. (1996) Avian mycoplasmosis in Asia. *Rev Sci tech Off int Epiz*. 15(4), 1555-1567. <https://doi.org/10.20506/rst.15.4.984>

Swayne DE. (2013) Diseases of Poultry, 13th Edt. John Wiley & Sons, Inc. UK.

Wanasawaeng W, Chaichote S, Chansiripornchai N. (2015) Development of ELISA and Serum Plate Agglutination for Detecting Antibodies of *Mycoplasma gallisepticum* using Strain of Thai Isolate. *Thai. J Vet Med*, 45(4), 499-507.

WOAH Terrestrial Manual. (2021) Avian mycoplasmosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 3.3.5.