

Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tavuk Trakealarında *Mycoplasma gallisepticum*'un Tespiti ve Sayımsal Analizi*

Murat ÖZMEN¹ Süleyman ASLAN¹ S.Reyhan KARAKOÇ¹ Atilla YOLDAŞ¹

¹Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü

Geliş tarihi/Received: 17.6.2013, Kabul Tarihi/Accepted: 6.9.2013

Özet

Tüm dünyada ve ülkemizde tavukçuluk endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara yol açan ve tavuklarda yaygın olarak kronik solunum yolu hastalığına (CRD) sebep olan *Mycoplasma gallisepticum*'un tavuk trakealarında gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kesin ve hızlı tanılar gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle saf *Mycoplasma gallisepticum*' un moleküler düzeyde tespit limiti 10 CFU/mL'den daha az ve yapay kontamine edilmiş örneklerde ise tespit limiti 1.0x10³ CFU/mL olarak belirlenmiştir.

Canlı tavuklardan alınan 190 (5'li pasajlar halinde) trakeal svab örneği incelenmiştir. Mikrobiyolojik yöntemlerle 11 (% 5.8) svab örneğinde *Mycoplasma* spp. izolasyonu yapıldı. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile 43 (%22.6) örnekte *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı tespit edilmiştir. Çalışmada *Mycoplasma gallisepticum* DNA düzeyleri 9.5x10⁴ kopya/mL ile 2 kopya/mL arasında değişim gösterdiği saptandı. *Mycoplasma gallisepticum* genomik DNA kopya sayıları ile bu örnekler için ait crossing point değerleri arasında önemli bir ilişki olduğu doğrusal regresyon analizi ile test edilmiştir (R² = %95.1, p<0.01). Bu sonuçlar gerçek zamanlı PZR yöntemiyle *Mycoplasma gallisepticum* enfekte sürülerin belirlenmesinde, enfeksiyonun şiddetinin belirlenmesinde ve rutin çalışmalarda kullanılabilir hızlı (40- 45 dakika) ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Tavuk, *Mycoplasma gallisepticum*, Mgc2 geni, Gerçek zamanlı PZR

Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea

Abstract

All over the world and in Turkey the poultry industry in our country and causing serious economic losses in chickens as a common chronic respiratory disease (CRD) caused by *Mycoplasma gallisepticum*'s chicken trachea Real-time PCR method was accurate by and rapidly diagnosed. Real-time PCR of *Mycoplasma gallisepticum* pure molecular level detection limit of 10 CFU / mL less than the detection limit and the samples were artificially contaminated with 1.0x10³ CFU / mL respectively.

190 units (5 swabs per sample) tracheal swab samples which received live chickens were analyzed. Microbiological methods 11(5.8%) swab samples were extracted *Mycoplasma* spp. Real-time PCR method 43 (22.6%) samples was detected *Mycoplasma gallisepticum* DNA. *Mycoplasma gallisepticum* DNA levels in the study 9.5x10⁴ copies/ml and 2 copies/mL was found to change. *Mycoplasma gallisepticum* genomic DNA copy numbers of these examples are an important relationship between crossing point values were tested with linear regression analysis (R² = 95.1%, p <0.01). These results suggest that the determination of the real-time PCR of *Mycoplasma gallisepticum* infected flocks, and routine studies to determine the severity of infection a rapid (40 to 45 minutes) and that it was concluded that a reliable method.

Key Words: Chicken, *Mycoplasma gallisepticum*, Mgc2 gene, Real-time PCR

Giriş

Mycoplasma gallisepticum en önemli tür olup, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) listesinde yer almaktadır (1). *Mycoplasma gallisepticum* prokaryotik

bir patojen olup tavuklarda kronik solunum yolu hastalığına (CRD) sebep olur. *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan hastalık

Yazışma adresi/Correspondance: Murat Özmen, Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, TR-01170 Adana – TÜRKİYE, E-posta: muratozmen25@gmail.com

*Bu çalışma TAGEM/ HS/11/13/01/188 kodu ile Tarımsal Politikalar ve Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir.

tüm dünyadaki tavukçuluk endüstrisinde ciddi etkilere sahiptir.

Mycoplasma gallisepticum, gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüzdür. Hücre duvarından yoksun olan bu mikroorganizma fakültatif anaerobtur (2).

Mikoplazmaların oldukça zor üreyen mikroorganizmalar olmaları ve pasajlarla birlikte yaklaşık 3-4 hafta gibi uzun bir inkübasyon süresine ihtiyaç duymaları, kanatlı sürülerinde geçirilen diğer enfeksiyonlara karşı kullanılan antibiyotiklerin mikoplazma etkenlerinin üremesini baskılaması gibi olumsuzluklar, teşhis konulduğunda sürünün sağaltımını ve etkili ve koruyucu önlemlerin alınmasını engellemektedir (6,7)

Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişimi bu tür potojenlerin teşhisinde önemli yer tutmuştur. *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun teşhisi için çok sayıda konvansiyonel PZR ve gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmakta ve çalışmalarda mikroorganizmanın teşhisi için 16S rRNA genini (8); yüzey yapışma proteinlerini (pvpA, gapA, mgc2, LP) (10,11,15,20), kodlayan çok sayıda primer çiftini kullanmışlardır. Çarlı ve Eyigör (4), tarafından yapılan çalışmada tavuk trakeal svablarında *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunu, mga_0319 lipoprotein primerlerini ve gerçek zamanlı PZR yönteminde kullanılan sybr green 1 boyasını kullanarak tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar çalışmalarında PZR'nin belirleme limitleri saf *Mycoplasma gallisepticum* kültürü ve yapay olarak kontamine edilmiş örnekler için sırasıyla 3 CFU/mL ve 3000 CFU/mL bulduklarını rapor etmişlerdir. Bunun yanında, Mekkes ve Feberwee (20) tavuk trakeal svablarında gerçek zamanlı PZR yöntemiyle 16S rRNA primerlerini ve sybr green 1 boyasını kullanarak konsantrasyonu bilinen *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı baz alarak, yaptıkları çalışmada, etkenin gerçek zamanlı PZR ile saptama limitini 10 CFU/mL olduğunu bununda hem klasik PZR hemde kültür metodundan daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, Grodio ve ark. (11), *Mycoplasma gallisepticum* ile deneysel olarak infekte ettikleri tavuklardan alınan svab örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi ile mgc2 primerleri ve primerlere özgü taqman probu kullanarak yaptıkları çalışmada, mgc2 primerlerinin saptama limitlerini plazmid standartı için reaksiyon başına 14 kopyadan az olduğunu *Mycoplasma gallisepticum* genomik DNA standartı için ise reaksiyon başına 10 kopyadan daha az olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışma ile Adana ve çevresindeki broyler işletmelerindeki tavukların trakeal svab örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi ile *Mycoplasma gallisepticum*'un DNA'nın sayımsal analizi, enfeksiyonunun teşhisinde gerçek zamanlı PZR yönteminin rutin çalışmalarda kullanılabilirliğinin

sağlanması ve elde edilecek verilerle ileride bu konu ile ilgili yapılacak çalışmalara katkı sağlamayı amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Adana ve çevresindeki 9 broyler işletmesindeki tavuklardan toplam 950 trakeal svab örneği alınmış ve örnekler 5'li pasajlar haline getirilerek çalışmada kullanılmıştır.

Pozitif kontrol olarak kullanılan *Mycoplasma gallisepticum* S6 suşu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mikoplazma Referans Laboratuvarında temin edilmiştir.

Broyler işletmelerinden alınan trakeal svab örnekleri soğuk zincir ile laboratuara getirilerek laboratuarda örneklerden 5'li havuzlar yapıldı her 5 örnek 1-2 ml fosfat buffer-tuz tamponu (PBS) içerisine alınarak vortekslandı. Daha sonra svablar tüplerin çeperlerine iyice emdirildikten sonra atıldı. Toplanan eksudat bir bölümümü bakteri izolasyonu için hemen kullanılmıştır. Diğer bölümü ise DNA izolasyonunda kullanılabildi kadar -80°C 'de saklanmıştır.

Trakeal svab örneklerinde *Mycoplasma gallisepticum* izolasyonu Dünya Hayvan Sağlığı Örgütünde tanımlanan mikoplazma izolasyon prosedürüne göre yapıldı (1). Etken İzolasyonu için Frey's broth ve Frey's agar kullanıldı (5,17).

Kültür ve Trakeal Svab Örneklerinden DNA İzolasyonu için DNA ekstraksiyonu High Pure PCR template (Roche Katolog no: 11796828001) DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yapılmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (ASP3700) ölçümler yapılarak belirlenmiştir.

Grodio ve ark. (11) yaptıkları yöntem modifiye edilerek yapıldı. Bu amaçla örneklerin analizi için Gerçek zamanlı PZR analizlerinde LightCycler 2,0 (Roche) cihazı, LightCycler (2.0) Taqman Master kiti (Roche Katolog no:04535286001), primerler ve taqman probu kullanıldı. H₂O 9 µl, forward primer (10µM) 0.5 µl, reverse primer (10µM) 0.5 µl FastStart mix 4 µl, Taqman probe (4µM) 1µl ve kalıp DNA'dan 5µl olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı. Amplifikasyonda aşaması için aşağıda verilen mgc2-F ve mgc2-R primerleri ve primerlere özgü taqman probu kullanıldı (11).

Forward 5'ggctcaatccccaacaagaat-3'

Rewerse 5'cttggtggttcattataggcatt-3'

Taqman Prob 5'-6 Fam ccacagcgttgggtggccca-Tamra 3'

Nükleik asitlerin inkübasyon döngüsü 95°C 10 dakika ve 45 döngü 95°C 3 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C 1 saniye olacak şekilde ayarlandı.

Gerçek zamanlı PZR'nin tüm aşamalarında pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mikoplazma Referans laboratuvarından temin edilen *Mycoplasma gallisepticum* S6 suşu ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Bulgular

Saf *Mycoplasma gallisepticum* S6 kültürünün Gerçek zamanlı PZR Yöntemi ile Tespit limitinin Belirlenmesi

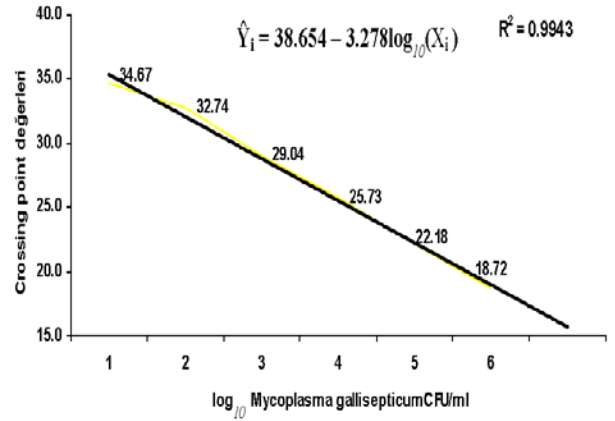
Millilitredeki yoğunluğu 1.0x 10⁶CFU/mL olarak belirlenen ana sulandırmadan 100'dan başlayarak 10 katlı seri sulandırmalar şeklinde 10-6'ya kadar dilasyonlar yapıldı. Bu dilasyonlar hazırlanırken 900 µl PBS içerisine stok kültürden 100 µl eklenerek dilue edildi. 6 seri olarak hazırlanan örnekler ticari kit kullanılarak (Roche: High Pure PCR Template Kit) DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar *Mycoplasma gallisepticum* mgc2 primerleri ve primerlere özgü taqman probu kullanılarak çoğaltıldı. Analiz sonuçlarına göre saf *Mycoplasma gallisepticum* örneklerinde tespit limiti 10 CFU/mL'den daha az olarak belirlenmiştir.

Yapay Kontamine *Mycoplasma gallisepticum* S6 Örneklerinden Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi ile Tespit Limitinin Belirlenmesi

Serum pleyt aglutinasyon testi ve kültür yöntemi ile *Mycoplasma gallisepticum* negatif olduğu belirlenen bir tavuktan trakeal svab örneği alındı. Trakeal svab, *Mycoplasma gallisepticum* S6 kültürünün 10 katlı dilasyonları ile yapay kontamine edilmiştir. Kontamine edilmiş svab 1 ml steril PBS içeren eppendorf tüp içerisine alınıp, vortekslenerek elde edilen sıvıdan ticari kit kullanılarak (Roche: High Pure PCR template Kit) DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar *Mycoplasma gallisepticum* mgc2 primerleri ve primerlere özgü taqman probu kullanılarak çoğaltıldı. Analiz sonuçlarına göre yapay örneklerde tespit limiti 1.0x10³ CFU/mL olarak belirlenmiştir.

Standart Eğrinin Oluşturulması ve mgc2 Geninin Üretkenliği

Millilitredeki konsantrasyonu 1.0x 10⁶ CFU/mL olan saf *Mycoplasma gallisepticum* S6 kültüründen elde edilen genomik DNA'nın 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000 sulandırmaları hazırlanarak PZR'e yapıldı. Bunlardan elde edilen kopya sayıları standart eğrinin oluşturulmasında kullanıldı.



Şekil 1. *Mycoplasma gallisepticum* mgc2 genomik DNA standart eğrisi

Yapılan sulandırım çalışmalarında bakteri konsantrasyonundaki azalmanın doğrusallık gösterdiği ve regresyon değeri R² = %99,43 ve testin verimliliği E = (10^{-1/slope} - 1) x 100 eşitliğinden E = (10^{-1/-3.278} - 1) x 100 = %100 olarak hesaplandı buda analizin tekrarlanabilir olduğu ve sensitivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil:1).

Saf *Mycoplasma gallisepticum* genomik DNA standart eğrisinin çalışmalar arası üretkenliği standart eğri döngüsünün 3 kez tekrarlanması sonucu oluşan crossing point değerlerinin ortalamaları alınarak bulunmuştur.

Gerçek Zamanlı PZR ve Kültür Yöntemi Sonuçları

Çalışmada örnek alınan 1. işletmede gerçek zamanlı PZR yöntemiyle (30/15) % 50'sinde *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı tespit edilirken kültür yöntemi ile (30/6) %20'sinde bakteri izolasyonu yapıldı. 2. işletmede gerçek zamanlı PZR yöntemiyle (20/8) % 40'ında *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı tespit edilirken kültür yöntemi ile (20/2) %10'unda bakteri izolasyonu yapıldı. 3. işletmede gerçek zamanlı PZR yöntemiyle (20/9) % 45'inde *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı tespit edilirken kültür yöntemi ile bakteri izolasyonu yapılamadı. 4. işletmede gerçek zamanlı PZR yöntemiyle (20/11) % 55'inde *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı tespit edilirken kültür yöntemi ile (20/3) %15'inde bakteri izolasyonu yapıldı. 5,6,7,8 ve 9. işletmelerden alınan örneklerde hem gerçek zamanlı PZR yöntemi ile hemde kültür yöntemi ile *Mycoplasma gallisepticum* tespit edilememiştir.

Çalışmada sayısal gerçek zamanlı PZR ile *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı tespit edilen örneklerin düzeyleri genomik DNA standartları kullanılarak yapıldı (Tablo:1)

Tablo 1. Gerçek Zamanlı PZR Yöntemiyle Tavuk Trakeal Svablarında *Mycoplasma gallisepticum* DNA Düzeyleri

	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> DNA düzeyleri kop/mL	log ₁₀ <i>Mycoplasma gallisepticum</i> DNA düzeyleri	Crossing point Değerleri
1. İşletme			
1	2.71x 10 ⁵	3.43	28.37
2	1.67x 10 ⁵	3.22	29.80
3	1.54x 10 ⁴	4.18	29.14
4	6.39x 10 ⁴	4.80	23.91
5	3.01x 10 ⁴	4.48	25.04
6	1.02x 10 ⁵	2.05	30.98
7	1.09x 10 ⁵	2.03	33.78
8	8.14x 10 ⁵	2.92	30.94
9	4.37x 10 ¹	1.64	34.19
10	4.78x 10 ¹	1.68	35.26
11	1.22x 10 ⁴	4.09	26.89
12	1.29x 10 ⁵	2.11	32.57
13	2.17x 10 ⁵	2.33	32.21
14	4.41x 10 ⁴	2.64	31.99
15	1.65x 10 ¹	1.21	36.20
2. İşletme			
1	2.83x 10 ¹	1.45	36.23
2	4.87x 10 ²	3.69	28.26
3	3.16x 10 ⁴	2.50	32.54
4	2.29x 10 ¹	1.36	36.63
5	8.81x 10 ⁴	3.94	27.84
6	1.60x 10 ⁵	3.20	29.72
7	5.92x 10 ¹	1.77	35.47
8	3.12x 10 ¹	1.50	35.61
3. İşletme			
1	1.06x 10 ¹	1.02	37.68
2	2.01x 10 ²	0.30	39.76
3	9.06x 10 ⁴	0.96	37.25
4	6.29x 10 ²	0.80	38.08
5	3.78x 10 ¹	0.58	39.13
6	6.06x 10 ²	0.78	38.16
7	8.59x 10 ⁴	0.93	37.46
8	5.31x 10 ²	0.73	38.43
9	2.29x 10 ¹	1.36	36.63
4. İşletme			
1	9.5x 10 ⁴	4.98	23.12
2	5.5x 10 ²	3.74	26.89
3	6.0x 10 ²	2.80	29.88
4	8.0x 10 ²	1.90	32.54
5	2.6x 10 ²	2.41	30.94
6	9.0x 10 ²	0.95	35.47
7	1.0x 10 ²	1.00	35.77
8	8.6x 10 ²	3.94	26.30
9	1.7x 10 ²	2.23	31.56
10	1.2x 10 ²	2.08	31.99
11	2.9x 10 ²	1.46	33.89

Tartışma ve Sonuç

Mycoplasma gallisepticum'un neden olduğu kanatlıların Kronik Solunum Sistemi Hastalığı (CRD) genel olarak solunum sistemi bozuklukları ile seyredir. Ülkemizde büyük kapasiteli işletmelerin ve damızlık işletmelerinin sayısının giderek artması nedeni ile işletmelerde ekonomik kayıplar daha da önem kazanmıştır. Hastalıktan ölümler nadir olmasına rağmen broylerlerde karkas ağırlığında düşme, yumurtacılar da yumurta verim düşüklüğü ile ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır (2,24). Kronik solunum yolu hastalığı indikatör bir hastalıktır. Tek başına önemli bir klinik ve patolojik belirti oluşturmazken, sters faktörleri, Newcastle Hastalığı ve Enfeksiyöz Bronşitis virüsleriyle doğal enfeksiyon veya bunların canlı aşılı, E. Coli kompleks olaylarda klinik belirtilerin ortaya çıkışı ve hastalığın şiddeti artmaktadır (24).

Mycoplasma gallisepticum'u üretmek için zenginleştirilmiş besiyerlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Besiyerleri hazırlanırken genel olarak at veya domuz serumu, maya ekstraktı, glikoz ve bakteri inhibitörleri katılır (1,23). Kimi araştırmacılar (12,23) ve OIE (1) tarafından PPLO broth ve agar kullanılırken bu çalışmada bazı araştırmacılar (5, 17), tarafından *Mycoplasma gallisepticum* izolasyonu için uygun olduğu belirtilen Frey's broth ve Frey's agar kullanıldı. Mikoplazma kolonilerinin identifikasyonunda PZR'nin kullanıldığı bildirilmektedir (19). Yapılan bu çalışmada

türe özgü spesifik primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile mikoplazma kolonilerinin identifikasyonu yapıldı.

Callison ve ark. (3), tavuk trakeal svab örneklerinde *Mycoplasma gallisepticum*'u tesbit etmek için yaptığı çalışmada gerçek zamanlı PZR yöntemiyle (171/265) % 64.91 'inde pozitif bulurken, kültür metodu ile de (53/265) % 24'ünde bakteriyi izole etmişlerdir. Bakteriyoloji ile düşük pozitifitenin tespit edilmesini *Mycoplasma gallisepticum*'un tespit limitinin yüksek olmasına, yavaş üreyen mikroorganizma olmasına ve diğer çabuk üreyen saprofit mikoplazmalara dayandırmışlardır. Ayrıca kanatlı sürülerinde geçirilen diğer enfeksiyonlara karşı kullanılan antibiyotiklerin mikoplazma etkenlerinin üremesini baskılaması, etken izolasyonunu engelleyen faktörlerden biridir (7). Kahya ve ark. (14), 31 seropozitif tavukta yaptıkları çalışmada *Mycoplasma gallisepticum*'u kültür yöntemi ile % 16.1 (5/31) ve gerçek zamanlı PZR yöntemiyle % 29'unda (9/31) tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada örnek alınan 9 işletmede gerçek zamanlı PZR yöntemiyle (43/100) % 43 'inde *Mycoplasma gallisepticum* pozitif bulunurken, kültür yöntemiyle (11/100) % 11'inde *Mycoplasma* spp. izole edildi. Kültür yöntemiyle düşük pozitifitenin tespit edilmesini *Mycoplasma gallisepticum*'un tespit limitinin yüksek olmasına veya antibiyotik kullanılmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar gerçek zamanlı PZR yönteminin duyarlılığının daha yüksek olduğu göstermektedir.

Grodio ve ark. (11), gerçek zamanlı PZR tekniğinin özgünlüğünü taqman problemlerinin artırdığını ve *mgc2* genine spesifik bir taqman probu kullanılarak yapılan çalışmada *Mycoplasma gallisepticum*'un tespitinde ve 10 kopyadan daha az hassasiyetle tespit edildiğini ve % 100 spesifite sağlandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da *Mycoplasma gallisepticum* tespitinde *mgc2* genine özgü taqman probu kullanılmış literatürlere benzer şekilde deteksiyon limiti 10 CFU/mL'den daha az düzeyde tespit edilebildiği ve % 100 spesifite sağlandığını görülmüştür.

Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisi amacıyla geliştirilen nükleik asit problemleri (22), ve daha spesifik olduğu düşünülen rekombinant DNA problemleri (9) ile kültür ve klinik örneklerden 800 pg *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı (10⁶ hücre) teşhis edebilmektedir. Bu kadar çok *Mycoplasma gallisepticum* hücre sayısı ancak enfeksiyonun akut safhasında mevcut olmakla beraber, subklinik seyreden enfeksiyonlar gibi etkenin çok düşük sayıda saçılım gösterdiği durumlarda teşhis yapabilmek neredeyse imkansızdır (13,18). Bu çalışmada geliştirilen gerçek zamanlı PZR tekniği ile hassasiyet trakeal svab örneklerinde *Mycoplasma gallisepticum* için 2 kopya/mL düzeyde olduğu bulunmuştur. Bu da patojenin daha erken dönemde

teşhisi ve buna bağlı olarak da daha erken mücadele yöntemlerinin uygulanması bakımından oldukça fazla önem içermektedir.

Sonuç olarak gerçek zamanlı PZR tekniği ile yaptığımız çalışmayla canlı tavuklardan alınan trakeal svab örneklerinden bakteri tanısı hem kısa sürede hemde duyarlı bir şekilde yapılmıştır. Mikrobiyolojik testlerle kıyasla tespit limitinin düşüklüğü, uygulama kolaylığı, yüksek spesifite ve kısa sürede kantitatif sonuç vermesi avantajları olarak görülmüştür. Bu araştırmanın ülkemizde bu konudaki çalışmalara bilgi ve deneyim kaynağı oluşturacağını umarız.

Teşekkür

Katkılarından dolayı Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Anonim, (2008). *Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae)* Chapter 2.3.5. in OIE Terrestrial Manuel online p. 482-492 http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.05_%20AVIANMYCO.pdf. (Erişim tarihi: 25 Ocak 2010).
2. Arda M, Mimbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür, M, (1990). Kanatlı Hayvan Hastalıkları Ankara Üniversitesi Basınevi, Ankara.
3. Callison S.A, Riblet S.M, Sun S, Ikuta N, Hilt D, Leitng V, Kleven S.H, Suarez D.L, Garcia M, (2006). Development and validation of a real-time Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of Mycoplasma gallisepticum in naturally infected birds. *Avian Diseases*, 50: 537-544.
4. Çarlı K.T, Eyigör A, (2003). Real time polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma gallisepticum in chicken trachea. *Avian Diseases*, 47: 712-717.
5. Dakman A, Günaydın E, Türkyılmaz M.A, Güleç M, Coşar M, Özdemir Ü, (2009). Damızlık Tavuk İşletmelerinde Tespit Edilen Mikoplazma enfeksiyonları. *Etlik Vet Mikrobiyoloji Derg.* 20: 27-34.
6. Esendal Ö.M, Türkyılmaz S, (2002). Poimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi 8(1):71- 75.
7. Frey M. L, Hanson R.P, Anderson D.P, (1968). A Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas. *Am J Vet Res.* 29: 2163-2171.
8. Garcia M, Ikuta, N, Levisohn S, Kleven S.H, (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens. *Avian Diseases*, 49: 125-132.
9. Geary S.J, Intress R, Gabrige M.G, (1988). Species Specific Bioninylated Probe for the Detection of Mycoplasma gallisepticum. *Mol. Cell. Probes.* 2:237-234.
10. Goh M.S, Gorton T.S, Forsyth M.H, Troy K.E, Geary S.J, (1998). Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa Mycoplasma gallisepticum cytheadhesin (GapA). *Microbiology*, 144: 2971-2978.
11. Grodio J.L, Keilla V, Dhonht P.H, Karel O, Schat A, (2008). Detection and quantification of Mycoplasma gallisepticum genome load experimentally infected house finches (*Copradacus mexicanus*) using real-time polymerase chain reaction *Avian Pathology*, 37(4): 385-391.
12. Güler L, (1995). Konya Bölgesinde Kanatlıların Kronik Solunum Sistemi Hastalığı'nın Serolojik ve Etken İzolasyonu ile Karşılaştırmalı Teşhisi Üzeine Çalışmalar Konya Vet. Kont.ve Arş. Enst. Dergisi 6(1-2): 7-15.
13. Hyman H.C, Levisohn S, Yogev D, Razın S, (1989). DNA Probes for Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae: application in Experimentally infected chickens. *Vet. Microbiol.* 20: 323-337.
14. Kayha S, Temelli S, Eyigör A, Carlı T, (2010). Real-time PCR culture and Serology for the diagnosis of Mycoplasma gallisepticum in chicken breeder Flocks Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Uludağ University, Gorukle Campus, 16059 Bursa, Turkey.
15. Keeler C.L, Hnatow L.L, Whetzell P.L, Dohmns J.E, (1996). Cloning and characterization of a putative cytheadhesin gene (mgc1) from Mycoplasma gallisepticum Infection and Immunity, 64: 1541-1547.
16. Kleven S.H, (1998). Mycoplasmosis In: A laboratory manual fort the isolation and identification of avian pathogens. Fourth Ed. , Ed:Swayne, D:E: American Association of Avian Pathologists Pennsylvanian, USA, 74-80.
17. Kleven S.H, (2003). Mycoplasmosis In: Diseases of Poultry. Editor: Saif, Y.M. 11th edit., Iowa State Pres, USA.
18. Liu T, Garcia M, Levisohn S, Yogev D, Kleven S.H, (2001). Molecular Variability of the Adhesin-encoding Gene pvpA Among Mycoplasma

- gallisepticum Strains and Its Application in Diagnosis. J. Clin. Microbiol. 39: 1882-1888.
19. Marois C, Dufour-Gesert F, Kempf I, (2002). Polymerase chain reaction for detection Mycoplasma gallisepticum in environmental samples. Avian Pathol., 31:163-168.
 20. Mekkes D.R, Feberwee A, (2005). Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of Mycoplasma gallisepticum. Avian Pathology, 34: 348- 354.
 21. Papazısı L, Frasca, S.J, Gladd M, Liao X, Yogev D, Geary S.J, (2002). GapA and CrmA coexpression is essential for Mycoplasma gallisepticum cytoadherence and virulence. Infection and Immunity, 70: 6839-6845.
 22. Razin S, (1985). Molecular Epidemiology and Genetics of Mycoplasma (Mollicutes). Microbiol. Rev. 49: 419-455.
 23. Türkaslan J, Salihoğlu H, (1989). Çeşitli besiyerleri kullanılarak Mycoplasma gallisepticum'un bakteriyolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu. Pendik Hay. Hast.Mer. Araşt. Enst. Derg. 20(2): 53-59.
 24. Yoder H.W.JR, (1979). Serologic response of chickens vaccinated with inactivated Preparations of Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis.23(2): 493-506.