T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KULUÇKAHANE VE DAMIZLIK KANATLI İŞLETMELERİNDE *MYCOPLASMA IOWAE* VARLIĞININ BAKTERİYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Ş. HANDE ERPEK

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. SEYYAL AK

İİ. TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR. KEMAL METİNER

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ş.Hande ERPEK

İTHAF

Tez çalışmamı, yetişmemde sonsuz emek ve özveri sahibi olan aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesinde tüm doktora eğitimim boyunca her türlü bilgi ve tecrübesini esirgemeden beni destekleyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Seyyal AK'a,

Tez çalışmam süresince destek ve katkılarından dolayı değerli hocam Prof.Dr.Serkan İKİZ başta olmak üzere tecrübeli ve saygıdeğer Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. A. Funda BAĞCIGİL'e, Doç. Dr. Kemal METİNER'e, Doç. Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN'a, Doç Dr. Belgi Diren SIĞIRCI'ya, Dr. Baran ÇELİK'e, Araş.Gör.Barış HALAÇ'a, Araş.Gör. A.Ilgın KEKEÇ'e, teknisyenimiz Gülten KARAKUZ'a ve tüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencileri ve çalışanlarına;

Bu süreçte gerek manevi gerekse teknik anlamda her zaman yanımda ve yetişmemde büyük emeği olan Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarı Şefi OIE Uzmanı Dr.Ümit SEVİMLİ'ye, Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma, eski mesai arkadaşım Dr. Mehmet Ali TÜRKYIMAZ'a, örnek temini konusunda yardımcı olan Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü ve Pendik Veteriner Kontrol Enstiüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Labortuvarları çalışanlarına, çalışmaya verdikleri her türlü katkı için Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü ile Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğüne;

Beni bugünlere getiren, emek veren, sevgisini ve güvenini esirgmeyen aileme, tüm bu süreçte manen yanımda olan dostlarıma, manevi desteğini ve gücünü her an yanımda hissettiğim eşim Tevfik ERPEK'e ve hayat kaynağı kızlarım İpek ERPEK ve Duru ERPEK'e sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: TAGEM/HSGYAD/A/20/A5/P2/1965

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Mollicutes Sınıfı 3
2.2. Mycoplasma Cinsi 5
2.3. Mycoplasma iowae *8*
2.3.1. Tanım 8
2.3.2. Etiyoloji 8
2.3.3. Morfoloji 9
2.3.4. Ekonomik Önemi 9
2.3.5. Epidemiyoloji 10
2.3.5.1. Bulaşma 11
Vertikal bulaşma 11
2.3.6. Enfeksiyon belirtileri ve bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri 12
2.3.7. İmmun Yanıt 14
2.3.8. Patolojik bulgular 14
2.3.9. Tanı 15
2.3.9.1. Kültür 15
2.3.9.2. Moleküler Tanı 18
2.3.9.3. Serolojik Tanı 21
2.3.10. Koruma Ve Kontrol 22
3. GEREÇ VE YÖNTEM 25

3.1. Gereç 25
3.1.1. İnceleme Örnekleri 25
3.1.2. Besiyerleri 26
3.1.2.1. Besi Yerlerinde Kullanılan Stok Solüsyonlar 26
3.1.2.2. Kanatlı Mycoplasma Sıvı Besi Yeri 27
3.1.2.3. Kanatlı Mycoplasma Katı Besi Yeri 28
3.1.3. Referans Maddeler 29
3.1.3.1. Referans Suş 29
3.1.3.2. Referans Hiperimmun Serum 29
3.1.4. Moleküler Yöntem Gereçleri 29
3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu Gereçleri 29
3.1.4.2. Real Time PCR DNA Amplifikasyon Gereçleri 30
3.1.4.3. Diğer gereçleri 30
3.2. Yöntem 31
3.2.1. Etken izolasyonu 31
3.2.1.1. Biyokimyasal Yöntemlerle İdentifikasyon 32
Glikoz Fermentasyonu 32
Arginin Hidrolizi 32
Film Spot Formasyonu 32
3.2.1.2. Üreme İnhibisyon Testi ile İdentifikasyon 32
3.2.2. MolekülerYöntemlerle Etken İdentifikasyonu 33
3.2.2.1. Transport medium ve Referans Suşlardan DNA Ekstraksiyonu 33
3.2.2.2. Homojenatlardan DNA Ekstraksiyonu 34
3.2.2.3. İnceleme Örnekleri ve Referans Suşlara Uygulanan Real Time PCR 35
3.2.3. Minimum Tespit Limitinin Belirlenmesi 35
3.2.4. Seçicilik 36
4. BULGULAR 37
4.1. Etken İzolasyonu Sonuçları 37
4.1.1. Biyokimyasal Yöntemlerle İdentifikasyon Sonuçları 37
4.1.2. Üreme İnhibisyon Testi ile İdentifikasyon Sonuçları 39
4.2. Moleküler Yöntemlerle Çalışma Sonuçları 39
4.2.1. Minimum Tespit Limiti Çalışmasının Sonuçları 39
4.2.2. Seçicilik Çalışması Sonuçları 40

4.2.3. İnceleme Örneklerine Uygulanan Real Time PCR Bulguları 40
5. TARTIŞMA 50
KAYNAKLAR 56
ETİK KURUL KARARI 69
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 70
ÖZGEÇMİŞ 71

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Tenericutes Bölümünün Taksonomisi.....5
Tablo 2-2: Kanatlılarda görülen Mycoplasma türleri 11
Tablo 2-3: Patojen Kanatlı Mycoplasmaların Biyokimyasal Özellikleri.....18
Tablo 3-1: Örnek alınan kanatlıların kaynakları, yetiştirilme amaçları, detaylı örnek sayıları ve örnek türleri 26
Tablo 3-2: Real Time PCR Programı.....35
Tablo 4-1: *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suş DNA'sı Minimum Tespit Limiti Çalışma Sonuçları 39
Tablo 4-2: Seçicilik Çalışma Sonuçları 40
Tablo 4-3: 21 Adet Trakeal Svap Havuzuna ait Real Time PCR Amplifikasyon Sonuçları 42
Tablo 4-4: 21 adet Kloakal Svap Havuzuna ait Real Time PCR Amplifikasyon Sonuçları 44
Tablo 4-5: Kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu hindi yumurtalarına ait Real Time PCR Amplifikasyon Sonuçları.....46
Tablo 4-6: Kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu tavuk yumurtalarına ait Real Time PCR Amplifikasyon Sonuçları.....48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1: Katı kültürde *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 Referans Suşu Kolonisi 37
Şekil 4-2: *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 Referans Suşu Glikoz Fermantasyonu.....38
Şekil 4-3: *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 Referans Suşu Arginin Hidrolizi 38
Şekil 4-4: *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 Referans Suşu Üreme İnhibisyon Zonu. .. 39
Şekil 4-5: Trakeal Svap Havuzuna ait Real Time PCR Amplifikasyon Eğrileri.....3941

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
bp	Baz çifti
CARDS	Community-acquired Respiratory Distress Syndrome
Cq	Quantitation cycle
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
G+C	Guanin + sitozin
GKGM	Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü
HA	Hemaglütinasyon
HI	Hemaglütinasyon İnhibisyon
MAM	*Mycoplasma arthritidis* Mitogen
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCTC	National Collection of Type Cultures
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
v/v	Hacim / hacim

ÖZET

ERPEK, Ş.H. (2021). Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmelerinde *Mycoplasma iowae* Varlığının Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarına kontrol amaçlı gönderilen Türkiye genelindeki damızlık hindi işletmelerinden 100 trakeal svap havuzu (500 trakeal örnek) ve 100 kloakal svap havuzu (500 kloakal örnek), türkiye genelindeki hindi kuluçkahanelerinden 96 kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurta ve Marmara bölgesindeki tavuk kuluçkahanelerinden 96 kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurtada *Mycoplasma iowae* etkeninin varlığı, konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle izolasyon ve materyalden direkt Real Time PCR ile araştırıldı. Her bir svap havuzu 5'er adet (5x100) svap içermekteydi. Bu çalışmada toplam 392 (1192) inceleme örneği kullanıldı. Yapılan tüm izolasyon ve Real Time PCR çalışmaları sonucunda hiçbir örnekten etken izolasyonu ve *Mycoplasma iowae* DNA'sı saptanmadı. Sonuç olarak *Mycoplasma iowae* infeksiyonunun ülkemizdeki tüm Hindi Kuluçkahaneleri ve Damızlık İşletmeleri ile Marmara Bölgesindeki Tavuk kuluçkahanelerinde mevcut olmadığı saptandı. Ancak bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda ticari hindi işletmelerdeki varlığının da araştırılmasının yararlı olacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: *Mycoplasma iowae*, Real Time PCR, hindi, kabukaltı ölüm

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: TAGEM/HSGYAD/A/20/A5/P2/1965

ABSTRACT

Erpek, Ş.H. (2021). Investigation on presence of *Mycoplasma iowae at* Hatchery and Poultry Breeding Farms by Bacteriological and Molecular Techniques. İstanbul University-Cerrahpaşa Institute of Graduate Education, Department of Microbiology. PhD Thesis. İstanbul.

In this study, 100 tracheal swab pools (500 tracheal samples) and 100 cloacal swab pools (500 cloacal samples) from turkey breeding farms throughout the country, 96 dead-in-shell embriyos from turkey hatcheries throughout the country and 96 dead-in-shell embriyos from chicken hatcheries in the Marmara Region, submitted to Pendik Veterinary Control Institute Mycoplasma Reference Diagnostic Laboratory for control purposes, were used. Each swab pool contained 5 (5x100) swabs. A total of 392 (1192) specimens were examined in this study. *Mycoplasma iowae* was not isolated and specific DNA was not detected by real-time PCR. Therefore it was determined that *Mycoplasma iowae* infection is not present in all Turkey Hatcheries and Turkey Breeding Farms in our country and Chicken Hatcheries in Marmara Region. However, it would be useful to investigate the precence of the agent in commercial farms in future studies.

Key Words: *Mycoplasma iowae*, Real Time PCR, turkey, dead in shell.

The present work was supported by the Research Fund of Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agriculture Research And Policies. Project No: TAGEM/HSGYAD/A/20/A5/P2/1965

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye'de özellikle tavuk ve hindi yetiştiriciliği son 20 yıl içerisinde çok büyük gelişme kaydetmiştir. Bir taraftan yeni modern işletmeler açılırken diğer taraftan da işletme kapasiteleri ve entegrasyon kabiliyetleri artmaktadır. Ülkemizde ticari amaçla kurulmuş, damızlık ve ticari kanatlı hayvan ve kuluçkalık yumurta üreten işletmeler damızlık kanatlı işletmeler olarak, damızlık ve ticari amaçla civcivleri çıkaran işletmeler ise kuluçkahane olarak nitelendirilmektedir. Kuluçkahane ve damızlık kanatlı işletmelerinde ortaya çıkan infeksiyöz hastalıklar sadece o işletmeyi etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda yumurta ve civcivlere de bulaşarak, ticari işletmelerde de infeksiyonlara neden olmaktadır. Bundan dolayı kuluçkahane ve damızlık kanatlı işletmelerin infeksiyöz hastalıklar yönünden kontrolü büyük önem arz etmektedir.

Mycoplasma iowae'nin yumurta kanalının infeksiyonu nedeniyle vertikal, sindirim kanalına olan afinitesi dolayısıyla mekonyum ile saçılması nedeniyle kuluçkahanelerde horizontal ve infekte erkeklerin spermasını ticari sürülerde suni tohumlamada kullanarak venereal olarak da bulaştığını bilinmektedir. Bu nedenle söz konusu bulaşma yolları kuluçkahane ve damızlık kanatlı işletmeleri için büyük risk teşkil etmektedir.

Mycoplasma iowae Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatının (OIE) 2019 yılı bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde yer almamakla ancak etkenin kümes hayvanlarında hastalığa neden olabileceğine dikkat çekilmektedir.

Yine *Mycoplasma iowae*'nın ABD Ulusal Kümes Hayvanları İyileştirme Planına dahil edilmediği (Ley ve ark. 2009), ancak Amerika Birleşik Devletleri Hayvan Sağlığı Derneği Komitesinin Kümes Hayvanları ve Diğer Kuş Türlerinin Bulaşıcı Hastalıkları ile ilgili yayınladıkları 2012 ve 2013 yılları raporlarında, *Mycoplasma iowae*'yi ticari hindi popülasyonunu etkileyen hastalıklardan biri olarak derecelendirerek listeye eklendiği bildirilmiştir (Committee on Poultry and Other Avian Species. 2012,2013).

Ülkemizde ise Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmelerinde *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma meleagridis*'in rutin kontrolleri yapılmaktadır. Ancak *Mycoplama iowae*'nın kontrolü yapılmamaktadır. Bundan dolayı etkenin kuluçkahane ve damızlık kanatlı işletmelerindeki durumu ve yayılımı ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu projede, ülke genelinde Kuluçkahane ve Damızlık Hindi İşletmelerinde ve Marmara Bölgesi'ndeki Tavuk Kuluçkahane İşletmelerinde *Mycoplasma iowae* varlığının bakteriyolojik ve moleküler yöntemler (Real Time PCR) ile karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlandı. Bu sayede etkenin Ülkemiz Hindi Kuluçkahaneleri ve Damzılık İşletmeleri ile Tavuk kuluçkahnelerinde varlığı ve bu işletmeleri için potansiyel risk kaynağı olup olmadığının ortaya konması da amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mollicutes Sınıfı

Sert bir hücre duvarı eksikliğinin göstergesi olan yumuşak, esnek bir yapıya sahip Tenericutes prokaryotları olarak tanımlanan ve taksonomik olarak Mollicutes sınıfında yer alan Mycoplasma türleri, peptidoglikan sentezi yapamamaları nedeniyle hücre duvarndan yoksun en küçük prokaryot hücre olarak tanımlanmaktadır. Bir çok genotipik ve fenotipik özellikleri bakımından hücre duvarına sahip bakterilerden büyük ölçüde farklılık göstermeleri sebebiyle Tenericutes bölümünün Mollicutes sınıfında yer almaktadırlar (Miles ve Nicholas 1998; Brown 2018; Brown ve ark. 2018b).

Mollicutes sınıfının kökeni ve diğer prokaryotlarla ilişkileri, özellikle küçük genomları ve göreceli fenotipik basitlikleri, ilkel bir organizmadan türemiş olabileceklerini öne sürdüğü için, yıllarca tartışma konusu olmuştur. Mollicutes sınıfının kökeninin ilk karşılaştırmalı filogenetik analizi, Woese ve ark. (1980) tarafından 16S rRNA gen dizilerinin oligonükleotid haritalamasıyla gerçekleştirilmiştir. Neimark (1979) tarafından; düşük G+C oranına sahip Mollicutes, Streptokoklar ve laktik asit bakterilerinin karakteristik enzimleri paylaştığı bildirilmiştir. Özellikle Acholeplasma ve Streptokok aldolazları amino asit sekanslarında yüksek benzerlik göstermektedir (Brown ve ark. 2018b).

Bu sınıfında bulunan türler, çok küçük genomlara sahip, hücre duvarı bileşenlerinden yoksun, membran fonksiyonu ve büyümesi için kolesterol gerektiren, triptofan için UGA kodonu kullanan, bakteri tutucu filtrelerden geçen ve kendi kendini kopyalayan en sıra dışı bakterilerdir (Baseman ve Tully 1997). Hücre duvarının yerine hücreyi saran üç katlı plazma membran bulunmaktadır. Küçük boyutları ve hücre duvarı bileşenlerinin olmaması organizmalara önemli ölçüde esneklik sağlar, böylece türlerin çoğu 450 nm gözeneklerden kolaylıkla filtrelenebilir. Bunun yanısıra bazı türler 220 nm ve hatta 100 nm filtrelerden geçebilirler (Tully 1983).

Ayrıca Mollicutes sınıfı türlerin hücre duvarından yoksun olması nedeniyle pleomorfik morfolojiye sahiptirler. Kokoid, branşlı flamentöz ve sarmal filamentöz olmak üzere birçok farklı görünümde olabildiği gibi zincirde oluşturabilmektedirler (Hirsh ve ark. 2004; Brown ve ark. 2018b). Kokoid şekle sahip olanlar genellikle 200-500 nm çapında olmasına karşın 2000 nm boyutunda türlere de rastlanabilmektedir.

Hücre duvarından yoksun olmaları nedeniyle gram negatif olarak kabul edilmelerinin yanı sıra genetik olarak gram pozitif olarak değerlendirilmektedirler. Filogenetik olarak Gram pozitif bakteriler içinde ancak ayrı bir bölüm olarak yer alırlar (Brown ve ark. 2018b).

Mollicutes sınıfına ait türler, 580-2200 kbp arasındaki genom boyutları ile prokaryotlar arasındaki en küçük genoma sahip mikroorganizma özelliğine sahiptirler. Bu türler düşük G+C oranına sahiptir ve G+C içerikleri 25–30 mol%arasındadır (Brown ve ark. 2018b).

Mollicutes sınıfı türleri ikiye bölünme ile üreme özelliği gösterirler. Bazı türleri kapsüllüdür. Bir çok türü üremek için fakültatif anaerob ortama ihtiyaç duyarken, aerob ve obligat anaerob olan türlerde mevcuttur. Morfolojik özelliklerine göre kayma, dönme ve kıvrılma hareketi yapabilmelerine karşın çoğu türü hareketsizdir. Ancak dinlenme aşamaları bilinmemektedir. Katı besiyerinde 1mm çaptan küçük koloni oluştururlar. Üreme agarın içine doğu kama tarzındadır ve bu özellik nedeniyle koloniler karakteristik olarak sahanda yumurta görünümündedir (Brown ve ark. 2018b).

Dezenfektan, deterjan, sıcaklık ve kuruluğa duyarlıdırlar (Hirs ve ark. 2004; Quinn ve ark. 2011).

Mollicutes sınıfının insan, artropod, omurgalı ve bitkiler gibi geniş bir konakçı yelpazesine sahiptirler ve konakçısında paraziter veya kommensalbir yaşam sürerler. Ayrıca birçok hayvan, böcek, bitki ve insanlar için patojen türleri bulunmkatadır (Brown ve ark. 2018b). Mollicutes sınıfının dahil olduğu Tenericutes bölümünün en son taksonomisi Tablo 2-1’de verilmektedir (Brown 2018).

Tablo 2-1: Tenericutes Bölümünün Taksonomisi

Bölüm : Tenericutes

Sınıf : Mollicutes

Takım :*Acholeplasmatales*

Aile:*Acholepplasmateceae*

Cins :*Acholeplasma*

Aile :*Incetra sedis*

Cins :*Canditus Phytoplasma*

Takım :*Anaeroplasmatales*

Aile :*Anaeroplasmataceae*

Cins:*Anaeroplasma*

Cins :*Asteroleplasma*

Takım :*Entomoplasmatales*

Aile :*Entomoplasmataceae*

Cins :*Entomoplasma*

Cins :*Mesoplasma*

Aile :*Spiroplasmataceae*

Cins :*Spiroplasma*

Takım :*Mycoplasmatales*

Aile :*Mycoplasmatacea*

Cins :*Mycoplasma*

Cins :*Ureaplasma*

Aile :*Incerta sedis*

Cins :*Eperythrozoon*

Cins :*Haemobartonella*

2.2. Mycoplasma Cinsi

Mycoplasmataceae ailesinde bulunan Mycoplasma cinsine ait tüler Mycoplasmalar olarak tanımlanmanın yanı sıra Mollicutes sınıfını içine alacak şekilde geniş bir ifade ile kullanılmaktadır (Miles ve Nicholas 1998).

Mycoplasma cinsindeki bakteriler, hücre duvarından yoksun, küçük (300-800 nm çapında) pleomorfik hücrelerdir. Ribozomlar, sitoplazmik membran ve bir adet çift

iplikcikli sirküler DNA molekülüne sahiptirler. Plazma membranın esnek yapısı nedeniyle türler çoğunlukla yuvarlak şekildedir (Brown ve ark. 2018a).

Kültürü yapılabilen türler genellikle katı besiyerinde çok küçük (<1 mm) koloniler oluşturur. Triptofanı kodlamak için UGA kodonunu kullanmaları, bugüne kadar incelenen tüm türlerin ayırt edici bir özelliğidir. Küçük (genellikle 0,5-1,5Mb) genomlarının bir sonucu olarak, sınırlı ara metabolizmaya sahiptirler ve beslenme açısından müşkülpesenttir. Üremeleri için eksojen şekerler veya arginin, kolesterol veya diğer steroller, peptitler ve serbest nükleik asitlere ihtiyaç duyarlar. Doğada, tüm türler zorunlu kommensal veya parazitlerdir (Brown ve ark. 2018a). Mycoplasma türleri geniş konakçı yelpazesine sahiptir, ancak konakçısına bağımlı olmanın sonucu olarak yüksek konak spesifitesine sahiptir (Falkow ve ark. 2006).

Bu organizmalar, prokaryotlar içindeki en küçük genoma sahip olmaları, kommensal ve patojen olarak omurgalı konakçılarla yakın ilişkileri ve tüm beslenme gereksinimlerini karşılamak için konakçıya tam bağımlılıklarından beklendiği gibi, en güç üreyen prokaryotları temsil etmektedirler. Bu durum klinik örneklerden mycoplasma izolasyonunu ve yeni türlerin tespit edilmesinini zorlaştırmaktadır. Ayrıca çok sınırlı ara metabolizma kapasitesine sahiptirler, bu da identifikasyon için geleneksel biyokimyasal testlerin kullanımını kısıtlar (Nicholas ve ark. 2008; Brown ve ark. 2018a).

Mycoplasma türleri, trikarboksilik asit döngüsünden ve oksidatif fosforilasyon gerçekleştirme kapasitelerini engelleyen kinon veya sitokromlardan yoksundur. Bunun yerine, glikoliz veya arginin dihidrolaz yolu yoluyla sadece düşük ATP üretme seviyelerine sahiptirler (Miles 1992a; Miles 1992b). Fermentatif türler, ATP ve asit üretmek için glikozu veya diğer karbonhidratları katabolize eder ve sonuç olarak ortamın pH'sını düşürürler. Fermentatif olmayan türler, arginin hidrolize ederek amonyak verirler,ve sonuç olarak ortamın pH'ını yükseltirler. *Mycoplasma fermentans* gibi türler her iki yolu da kullanır. *Mycoplasma bovis* gibi türler her iki yoldan da yoksundur, ancak ATP vermek için piruvat veya laktatı oksitleyebilir (Miles 1992a; Taylor ve ark. 1994).

Bu türleri üretebilmek için sterole ihtiyaç duyulmaktadır. Besi yeri içeriğide, maya ekstraktı, kan serumu ve/veya arginini mycoplasma üretme faktörleri olarak, şeker ve/veya arginini enerji kaynağı olarak ve fenol kırmızısı ise pH indikatörü olarak yer almaktadır. Ayrıca besi yerine, mycoplasma dışındaki bakterilerin üremesini engellemek için hücre duvarı sentezini inhibe edici antibiyotik ilavesi gereklidir (Nicholas ve ark.

2008). Mycoplasmaların ideal üreme ısıları 37 °C olmakla birlikte 20°C– 45°C aralığında üreme özelliği gösterebilirler. Mycoplasmalar tipik sahanda yumurta şekinde koloni morfolojisine sahip ve genellikler koloni çapıları 1 mm'den daha küçüktür. Bu nedenle koloniler ancak mikroskopta 35x büyütme büyütmede görülebilmektedir (Miles ve Nicholas 1998). Sıvı besiyerinde hafif bulanıklık ve dipte hafif sediment şeklinde ürerler ancak *Mycoplasma mycoides cluster* üyeleri istisnai olarak yoğun bulanıklık ve dipte sediment oluşturarak ürerler.Bazı türler ısıyla inaktive edilmiş at serumu veya yumurta sarısı içeren ortam üzerinde belirgin bir film ve spot reaksiyonuna neden olur. Besiyerinin yüzeyinde kolesterol ve fosfolipitlerden oluşan buruşuk bir film ve kolonilerin çevresinde yağ asitlerinin tuzlarını içeren koyu lekeler oluşturarak ürerme özelliği göstermektedir (Brown ve ark. 2018a).

Pro-enflamatuar veya pro-apoptotik membran lipoproteinleri, hücre dışı polisakkarit yapılar, adezinler, hücre dışı endopeptitazlar, glikozidazlar ve nükleazlar gibi virülens faktörlerine sahiptir. Bu faktörlerin yanı sıra amonyak, süperoksit radikaller ve hidrojen peroksit gibi ara metabolizma ürünleri de patogenezde önemli rol oynamaktadır. Ayrica bağışıklık hücreleri, hareket, biyofilm oluşumu, değişken yüzey artijenleri gibi muhtemel virulens mekanizmalarıda bulunmaktadır (Brown ve ark. 2018a). Patojen mycoplasmalar virulens faktörü olarak toksik metabolizma yan ürünleri üretmelerine karşın, spesifik ekzotoksin ürettikleri tespit edilmemiştir (Falkow ve ark 2006). Ancak *Mycoplasma pneomonia*'nın CARDS isimli sititoksini (Kannan ve Baseman 2006) ve *Mycoplasma arthritidis*'in MAM isimli süper antijeni (Atkin ve ark. 1994) istisna kabul edilmektedir.

İnsan ve hayvanlarda seröz ve müköz epitel yüzeylere affiniteleri vardır. Epitelyal yüzeylere kolonize olarak ekstraselüler mikroorganizma özelliği gösterirler. Ancak *Mycoplasmma gallisepticum* gibi bazı türlerin in vivo ve/veya in vitro hücre invazyonu yapabildiği bildirilmiştir (Razin ve Herrman 2002; Lam 2005, Falkow ve ark. 2006; Vogl ve ark. 2008). Mycoplasma türlerinin dokularda hücre içine gizlenme eğilimi nedeniyle antibiyotik tedavisi uzun soluklu olmaktadır. Hücre duvarı ve lipopolisakkarit yapısından yoksun olması ve kendi nükleotidlerini sentezleyememeleri nedeniyle, betalaktamlar, polimiksinler, fosfomisin, vankomisin, trimetoprim ve sülfonamitlere doğal direnç gösterirken, protein sentezi ve DNA replikasyonunu inhibe eden tetrasiklin, makrolid, florokinolon, fenikoller, pleuromutilinler ve aminoglikozitlere duyarlıdırlar. Ayrıca RNA

polimerazları rifampine duyarlı olmaması nedeniyle doğal direnç göstermektedir (Brown ve ark. 2018a).

Mycoplasma türleri oluşturdukları çeşitli infeksiyonların yanı sıra hücre kültürü kontaminasyonuna neden olmaktadır. Bu durum çalışmalarda sonuçların güvenilmez olmasına ve istenmeyen final ürünlere neden olmaktadır (Baseman ve Tully 1997). Yapılan çalışmalarda hücre kültürlerinde kontaminasyona neden olana 20 den fazla Mycoplasma türü tespit edilmiş olup bu türlerin% 90'ından fazlasının *Mycoplasma arginini, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma hominis, Mycoplasma hyorhinis* ve *Mycoplasma orale* kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Brown ve ark. 2018a).

En fazla kanatlılar ve evcil hayvanlarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Miles ve Nicholas 1998). Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatının 2019 yılı hayvan hastalıkları listesinde Kanatlı Mycoplasmosisi (*Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae*), Bulaşıcı Agalaksi, Bulaşıcı Keçi Ciğer Ağrısı ve Bulaşıcı Sığır Pleuropneumonisi olmak üzere 4 ana başlık içerisinde 8 adet mycoplasma türü bulunmaktadır (OIE 2019).

2.3. Mycoplasma iowae

2.3.1. Tanım

Mycoplasma infeksiyonları, kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunlar içerisinde *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* ve *Mycoplasma iowae* evcil kanatlı hayvanlar için en patojen olan türlerdir (Bradbury 2001).

Mycoplasma iowae, hindilerde kuluçka performansında azalma ve embriyonel ölümlerde artış ile karakterize ekonomik önemi olan bir infeksiyondur. (Jordan 1990). İnfeksiyon hindi sürülerinde yaygın olarak görülmesinin yanı sıra tavuklarda ve serbest uçan birçok kuştan da izole edilmiştir. (İzgür ve Akan 2002). Ayrıca deneysel yapılan bazı çalışmalarda, tavuk ve hindilerde embriyonal ölümler, orta derecede hava boşluğu iltihabı ve bacak anomolileri gözlenmiştir (Yoder ve Hofstad 1964; Bradbury ve Mccarthy 1981; Rhoades 1981,1984; Bradbury ve ark. 1988).

2.3.2. Etiyoloji

İlk *Mycoplasma iowae* izolasyonu 1955 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde, kuluçka verimi olmayan hindilerin hava keselerinden yapılmıştır ve İowae 695 serotipi

olarak isimlendirilmiştir (Yoder ve Hofstad 1962). *Mycoplasma iowae*'nin karakterizasyonu 1982'de Ulusal Sistemik Bakteriyoloji Komitesi Mycoplasmatales'in Taksonomisi Alt Komitesi tarafından tamamlanmıştır. Mollicutes sınıfı Mycoplasmataceae ailesi Mycoplasma cinsi altında sınıflandırılmıştır. Tip suş olarak 695 suşu belirlenmiştir (Jordan ve ark. 1982). Serotiplerin taksonomik durumu I, J, K, N, Q ve R harfleriyle adlandırılmış ancak bu gruplandırma daha sonraki yapılan moleküler çalışmalarla desteklenmemiştir (İzgür ve Akan 2002). Yapılan son taksonomik çalışmada nükleotid sekans verilerine göre *Mycoplasma iowae* pneumonia grubu içerisinde muris cluster'nda yer almaktadır (Brown ve ark. 2018a).

2.3.3. Morfoloji

Tüm Mycoplasma türlerinde olduğu gibi, *Mycoplasma iowae* suşlarının tipik koloni görünümü 'sahanda yumurta' şeklindedir ve mikroskobik olarak diğer Mycoplasma türlerinden kolay ayırt edilemezler. *Mycoplasma iowae* 695 suşunun kesitlerinde bir hücre duvarı bulunmadığı tespit edilmiştir (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Taramalı elektron mikroskopisi ile incelenen bazı *Mycoplasma iowae* hücrelerinin kabarcık benzeri bir yapıya sahip olduğu görülmüştür (Gallagher ve Rhoades 1983). Yine transmisyon elektron mikroskopisi ile yapılan bir çalışmada, infekte hindi embriyolarının bağırsağında *Mycoplasma iowae*'nın mukozaya koni biçiminde bir organeli ile tutunmasının (Mirsalimi ve ark. 1989), *Mycoplasma pneumoniae* (Collier ve Clyde 1971) ve *Mycoplasma gallisepticum* (Zucker-Franklin ve ark. 1966) ile benzer olduğu belirtilmiştir.

Mycoplasma iowae' yı kültür ve infekte dokularda taramalı elektron mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobuile inceledikleribir çalışmada, çok ince kesitlerde hücre zarının dışında bulanık görünümlü bir madde tabakasının var olduğunu ve rutenyum kırmızısı ile boyama sonrası bu tabakanın ince fibrillere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Doğal konak dokularında mycoplasma ve mukozanın mikrovillusları arasında fibriller görülmesine ragmen mukoza ve organizma arasinda belirgin bir tutunma görülmediği belirtilmiştir (Shareef ve ark. 1990).

2.3.4. Ekonomik Önemi

Mycoplasma cinsi içinde kanatlı hayvanlarda toplam 23 adet Mycoplasma türü bulunmasına karşın (Tablo 2-2), kanatlılar için *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma*

synoviae, *Mycoplasma meleagridis* ve *Mycoplasma ioawe* patojendir (Jordan 1985; Bradbury ve Morrow 2008; OIE 2019).

Ekonomik önemi embriyonal kayıp ve kuluçka veriminde azalmadan kaynaklanmaktadır. İngiltere'de bir çiftlikte yapılan çalışmada geç embriyonik mortalite ile kuluçka verimde % 2-5 kapasite düşüklüğüne neden olduğu bildirilmiştir (Grant 1987; Baxter-Jones 1991). Ayrıca *Mycoplasma iowae* enfekte embriyolarda ise % 2-10 ölüm oranına sahip olduğu belirtilmktedir (Jordan 1996; Bradbury ve Kleven 2003).

2.3.5. Epidemiyoloji

Hindiler, *Mycoplasma iowae* için en yaygın doğal konakçıdır ve ticari hindi sürülerinde yaygın olarak bulunur. Aynı zamanda birçok ülkede tavuklardan da izole edilmiştir (Yoder ve Hofstad 1962; Shimizu ve ark. 1979; Jordan ve Amin 1980; Benčina ve ark. 1987a, 1987b; Bradbury ve ark. 1990). Ayrıca *Mycoplasma iowae* ile infekte olduğu bilinen tek türün kanatlılar olduğu bildirilmektedir (Bradbury ve Kleven 2003).

Mycoplasma iowae'nin prevalansı bilinmemekle birlikte hindi yetiştiriciği yapılan çoğu bölgede görüldüğü ileri sürülmektedir (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Hindilerde ve tavuklarda zaman zaman bildirilmer yapılmıştır. Avustralya'da tespit edilmemiştir (Boyle ve ark. 1995). Ancak batı ve doğu Avrupa (Jordan ve Amin 1980; Gaillard-Perrin ve ark. 1985; Benčina ve ark. 1987a, 1987b), Kuzey Amerika (Kleven 1991), Japonya (Shimizu ve ark. 1979), Hindistan (Prasad ve Kumar 1975; Rathore ve ark. 1979), İsrail (Levisohn ve ark. 1995a), Pakistan (Al-Ankari ve Bradbury 1996) ve Zimbabwe'de (Mohan 1992) birdirimler yapılmıştır. *Mycoplasma iowae*, İngiltere'de Starling (*Stumus vulgaris*), Sarabatak (*Phalacrocorax carbo*), Balıkçıl (*Ardea cinerea*) ve Ahşap Güvercinlerden (*Columba palumbus*), European Eider (*Somateria mollissima*), Yakut Boğazlı Bülbül (*Rubigula dispar*) ve Yahina'dan (*Yahina castaniceps*) izole edilmiştir (Amin 1977). Bozeman ve ark. (1984) *Mycoplasma iowae*'yı sarı gerdanlı amazon papağanlarından (*Amazona ochrocephala auropalliatd*) izole etmiştir. Ayrıca *Mycoplasma iowae* 1982'de Fransa'da bir ağacın elma tohumundan izole edilmiştir (Grau ve ark. 1991).

Ülkemizde ise ticari faaliyet gösteren hindi işletmelerinde etken DNA'sı varlığı bildirilmiştir (Öngör ve ark. 2009).

Tablo 2-2: Kanatlılarda görülen Mycoplasma türleri

TÜR	**KONAK**
Mycoplasma anatis	Ördek, kaz
Mycoplasma anseris	Kaz
Mycoplasma buteonis	Şahin
Mycoplasma cloacale	Hindi, kaz
Mycoplasma columbinasale	Güvenrcin
Mycoplasma columbinum	Güvenrcin
Mycoplasma columborale	Güvenrcin
Mycoplasma corogypsi	Akbaba
Mycoplasma falconis	Doğan
Mycoplasma gallinaceum	Tavuk, sülün, keklik
Mycoplasma gallinarum	Tavuk, hindi
Mycoplasma gallisepticum	Tavuk, hindi, sülün, keklik, ötücü kuşlar
Mycoplasma gallopavonis	Hindi
Mycoplasma glycophilum	Tavuk, sülün, keklik
Mycoplasma gypis	Akbaba
Mycoplasma iners	Tavuk, hindi, sülün, keklik
Mycoplasma iowae	**Hindi, tavuk**
Mycoplasma imitans	Kaz, ördek, keklik
Mycoplasma lipofaciens	Tavuk, hindi
Mycoplasma meleagridis	Hindi
Mycoplasma pullorum	Tavuk, sülün, keklik
Mycoplasma sturni	Sığırcık
Mycoplasma synoviae	Tavuk, hindi

2.3.5.1. Bulaşma

Vertikal bulaşma

Yumurta kanalındaki yumurtaların enfeksiyonu ve ardından vertikal bulaşma, en önemli yayılma şeklidir. Bu durumun kapalı popülasyonlarda, kalıcı enfeksiyonların sürdürülme yolu olduğu ileri sürülmüştür. Yumurtadan çıkana kadar hayatta kalan enfekte embriyolar, popülasyonda sonraki nesli enfekte etmek için risk oluşturmaktadır. Enfekte bir tavuğun bir bağışık yanıt geliştirebildiği, bununla birlikte yumurta bulaşma seviyesinin azaldığı, ancak bağışık yanıtının genellikle yavaş olması nedeniyle yumurta geçişindeki azalmanın genellikle yumurtlamanın sonlarında meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca bu yanıtın gelişiminin, birkaç haftadan üç aya kadar herhangi bir zaman diliminde olduğu belirtilmiştir (Jordan 1996). Herhangi bir zamanda *Mycoplasma*

iowae saçımı yapan kanatlıların sayısı, oldukça değişken ve bu kanatlıların tespit edilmesinin güç olduğu ileri sürülmüştür (Cai ve ark. 2008).

Horizontal bulaşma

Kuluçkahane içinde ve civciv döneminde horizontal yayılma mümkündür, ancak daha az önemli bir enfeksiyon yolu olarak kabul edilmektedir (Burch ve Valks 2003). Bu, hassas kanatlıların aynı gün yumurtadan çıkması veya işletmedeki temizlik ve hijyen işleminin tam olarak yapılmaması durumunda meydana gelebilmektedir. Ayrıca daha yaşlı kanatlılar bir arada barındırıldığında, yoğunluğun enfekte dışkı yoluyla horizontal bulaşma derecesinde rolü olması muhtemeldir (Al-Ankari ve Bradbury 1996). Doğrudan veya dolaylı temas yoluyla ayrı kümeslerde sürüler arasında hastalık yayılma potansiyelinin ölçülmesi zordur. *Mycoplasma iowae*'nın aerosol ile bulaşma özelliğine sahip olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle *Mycoplasma gallisepticum* gibi aerosol yolla bulaşan diğer önemli Mycoplasma türleri ile karşılaştırıldığında *Mycoplasma iowae* infeksiyonunun kontrol altına alınmasının daha kolay olacağı ileri sürülmüştür (Wood ve Wilson 2013).

Enfekte semen ve suni tohumlama ile veneral bulaşmanın olduğu ve bu durumun damızlık kanatlıda yumurta kanalı enfeksiyonunu başlattığı bildirilmiştir (Shah-Majid ve Rosendal 1986a). Normalde ticari olarak kullanılan semen havuzlamasıyla enfeksiyon oranınınartacağı ileri sürülmüştür (Wood ve Wilson 2013).

2.3.6. Enfeksiyon belirtileri ve bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri

Mycoplasma iowae, hava kesesi iltihabı ve embriyo ölümüne neden olarak hindilerde kuluçka randımanının azalmasına neden olmaktadır (Brown ve ark. 2018a). Hindi embriyolarının en önemli ölüm nedenidir (Grant 1987). Sürüdeki artan embriyonel ölüm oranı, *Mycoplasma iowae* enfeksiyonunun en yaygın belirtisidir. Suş virülansındaki varyasyonlar nedeniyle hayatta kalan embriyolarda bir dizi klinik belirti ortaya çıkmaktadır. *Mycoplasma iowae* enfekte embriyoların % 2-10 ölüm oranına sahip olduğu bildirilmektedir (Jordan 1996; Bradbury ve Kleven 2003). Hem deneysel hem de doğal enfeksiyonla, embriyonik ölümlerin genellikle 18 ila 24 günlük inkübasyon sonrasında gerçekleştiği bildirilmiştir (Yoder 1970, Bradbury ve ark. 1988; Burch ve Valks 2003).

Mycoplasma iowae'nın, hindiler ve tavuklar için fazla immünojenik olmadığı, hatta hafifçe bağışıklık baskılayıcı olduğu bildirilmiştir. Torasik hava kesesi yoluyla infekte edilen günlük hindilerin, düşük bursa - vücut ağırlığı oranına sahip olduğu ve

koyun eritrositlerine karşı gecikmiş antikor yanıtı gösterdiği tespit edilmiştir (Bradbury 1984).

Yumurta sarı kesesinin 7. ve 14. günlerdeki inokülasyonu sonucunda 18. ve 24. günlerde çoğu embriyo ölürken 21. ve 24. günlerdeki inokülasyonlarda daha düşük patojenite saptanmıştır (Bradbury 1984b). Doğal infeksiyonda embriyolarda genellikle 16 ila 24 gün arasında ölümlerin gerçekleştiği, embriyoda gelişme geriliği, ödem, hemoraji vetüylerde anormallikler görüldüğü bildirmiştir (Baxter-Jones 1993).

Deneysel olarak enfekte olmuş kümeslerde, klinik belirtiler arasında hava kesesi iltihabı, bodurluk, zayıf tüylenme ve kondrodistrofi dahil bacak anormallikleri bulunmaktadır (Bradbury ve ark. 1988; Mirsalimi ve ark. 1989). Bodurluk ve zayıf tüylenme, hem embriyo hem de kanatlıdaki metabolik değişikliklerden kaynaklanır. Bacak anormallikleri *Mycoplasma iowae* infeksiyonu için patognomonik değildir, çünkü inkübasyon sırasında aşırı ısınma gibi diğer nedenler ve bazı beslenme yetersizliklerinde de benzer lezyonların görüldüğü ifade edilmektedir. Hindilerde en belirgin bacak anormalliği kondrodistrofidir (Wise ve Fuller 1976). Ancak saha koşullarında *Mycoplasma iowae* salgınlarında bacak ve vertebral deformitelerle kondrodistrofi sergileyen yeni bir doğal enfeksiyon varlığı bildirilmiştir (Trampel ve Goll 1994; Ley ve ark. 2010).

*Mycoplasma iowae'*nin yetişkin hindiler ve genç kanatlılarda bir miktar bağışıklık baskılayıcı olabileceği öne sürülmüştür. Bağışık yanıttaki hafif gecikme ve Bursa fabricius boyutundaki geçici küçülmenin bu öneriyi desteklediği belirtilmiştir (Bradbury ve McCarthy 1984). Bursa fabricius'daki hücre infiltrasyonu, B lenfositlerin üretimi üzerinde bir etkiye sahip olduğu, ancak *Mycoplasma iowae*'nın immünosupresyonun mekanizmasının henüz bilinemediği bildirilmektedir (Bradbury 2005).

Deneysel olarak infekte piliç embriyolarında da özellikle son haftalarda ölümler gerçekleştiği bildirilmiştir (Yoder ve Hofstad 1962,1964; McClenaghan ve ark. 1981; Bradbury ve Mccarthy 1983; Kempf ve ark. 1994).

Sahada *Mycoplasma iowae* infeksiyonunun tek belirtisi kuluçka veriminde düşüştür. Söz konusu infekte hayvanlardan alınan kuluçkalık yumurtaların düşük kaliteli olduğu bildirilmiştir (Bradbury 1984b; Jordan 1990). Ancak etkilenen birçok sürüde kuluçka kabiliyeti 1 ila 2 ay içinde tekrar normal hale geldiği görülmüştür (Kleven 1991).

Günlük yavrularda doğal *Mycoplasma iowae* infeksiyonuyla ilişkili olarak hava kesesi lezyonları bildirilmiştir (Dierks ve ark. 1967; Fabricant 1970) ancak *Mycoplasma meleagridis* gibi diğer mycoplasmaların varlığı göz ardı edilemeyeceği için kesin olarak *Mycoplasma iowae*'ye atfedilemeyeceği ifade edilmiştir (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Çok genç hindilerin ve tavukların deneysel infeksiyonu, çeşitli bacak anomalileri, depresyon, gelişme geriliği, anormal tüyler ve topallama ile sonuçlanmıştır. Bu belirtilerin çok genç yaşta genel infeksiyon sonucu olduğuna inanılmaktadır. (Bradbury ve Mccarthy 1981,1984; Bradbury ve Ideris 1982; Bradbury ve ark. 1988; Bradbury ve Kelly 1991).

2.3.7. İmmun Yanıt

Mycoplasma iowae ile infekte olan kanatlılarda sınırlı humoral yanıt gözlemlenmesine karşın, bağışıklık hakkında çok az bilgi mevcuttur. İnfekte olan hindilerde, 1-2 ay sonra gelişen embriyo ölümünde azalma ve organizmanın yumurta kanalından izole edilmesinde azalma belli bir bağışık seviyesinin gelişebileceğini düşündürmektedir. Nitekim, bu iyileşme safhasında, üreme inhibisyon testi ile saptanabilen lokal ve humoral antikor ürettiği saptanmıştır (Baxter-Jones 1993).

Hindi ve tavukların deneysel infeksiyonu sonucunda çok az hayvanın aglütinasyon ile tespit edilebilen antikor yanıtı oluşturduğu görülmüştür (Yoder ve Hofstad 1962, 1964; Bradbury 1984a; Bradbury ve ark. 1988). 11 farklı kanatlı mycoplasma türüne karşı tavuk antiserumu hazırladığında, diğer 10 mycoplasma türüne kıyasla *Mycoplasma iowae*'nın (suş 695 ve 'tip 8') daha az bağışık yanıt verdiğini rapor etmiştir (Bradbury 1982).

2.3.8. Patolojik bulgular

Mycoplasma iowae'nın kanıtlanmış tek patojenik etkisi doğal infeksiyonda hindilerde embriyo üzerinedir (Grant 1987). Mirsalimi ve ark. (1989), embriyo/yumurta ağırlık oranının infekte olmayan kontrollerden önemli derecede düşük olduğunu ve korioallantoik membranda belirgin ödem ve bazen hemorajinin olduğunu ortaya koymuştur.

Yapılan başka bir çalışmada embriyolarda gelişme geriliği ve konjesyonun yanı sıra splenomegali ve hepatomegali de görülmüştür. Histolojik olarak, koryoallantoik zar içerisinde heterofil ve mononükleer hücre infiltrasyonu ve ödem ile nekroz alanları

olduğu görülmüştür. Parenkimöz organlarda heterofil hücre infiltrasyonu da gözlenmiştir. Mukozal yüzeydeki eksudatın fibrin ve yangısal hücreleri ve özellikle de makrofajları içerdiği bildirilmiştir. Eksudat ve epitel arasında çok sayıda heterofil hücrenin fokal birikimi de gözlenmiştir (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Yoder ve Hofstad (1962, 1964), hindi ve tavukların diz ve ayak tabanına yapılan inokülasyonlar sonucu patolojik değişiklikler geliştiğini bildirmiştir.

Bazı infekte gençlerdetendon yırtığı ve eklem kıkırdağı erozyonları görülmüştür (Bradbury ve Mccarthy 1981, Bradbury ve Kelly 1991). *Mycoplasma iowae* ile infekte kanatlı dokularının histolojik incelenmesi, dalakta ve bursa fabriciusta ve aynı zamanda duodenum, ileum ve sekal tonsillerin lamina propriasında yangısal yanıt oluştuğunu ortaya koymuştur (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Jordan ve ark. (1992), 2 günlük civcivleri özofagus, trakea, kloaka ve doğrudan akciğer içine 3 farklı *Mycoplasma iowae* suşu ile eprüve ettiklerini ancak spesifik bir klinik bulgu veya lezyona rastlamadıklarını belirtmişlerdir.

Direkt olarak hava keselerine inokülasyon yapılan hindilerde (Yoder ve ark. 1962, 1964; Dierks ve ark. 1967; Rhoades 1981), bazı suşlar ciddi olmayan hava kesesi yangısı oluşturmuştur. Etkilenen hava keselerinin histolojik incelemesinde çoğu lenfosit olan çok sayıda yangısal hücre infiltrasyonu ile kalınlaşma görülmüştür (Rhoades 1981).

Erişkin kanatlılarda *Mycoplasma iowae* infeksiyonuna bağlı klinik bulgular ve lezyon bildirimleri yapılmamıştır (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

2.3.9. Tanı

2.3.9.1. Kültür

Hindilerde kuluçka veriminde azalma ve embriyolardaki lezyonlar *Mycoplasma iowae* için özel klinik belirtiler değildir. *Mycoplasma iowae* infeksiyonunun yanında *Mycoplasma meleagridis* infeksiyonunun da unutulmaması gerekmektedir. Benzer lezyonların beslenme problemi kaynaklı da olabileceği düşünülmelidir (Al-Ankari ve Bradbury 1996). Bu nedenle Mycoplasma infeksiyonlarında altın standart test izolasyondur. *Mycoplasma iowae* etkeni ölü embriyolar ve ekstra embriyonik sıvılarda yüksek miktarlarda bulunabilir (Mc Clenaghan ve ark. 1981; Bradbury ve Mccarthy 1983; Grant 1987). Rosales ve ark. (2017) tarafından yapılan 4 patojen mycoplasmanın beyin invazyonunun araştırıldığı çalışmada, *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma*

synoviae'nin beyinden izole edildiği ancak *Mycoplasma iowae* ve *Mycoplasma meleagridis*'in beyinden izole edilmediğini bildirmişlerdir.

Etken izolasyonu için en uygun inceleme örnekleri hava keseleri, bağırsaklar ve hindi yumurtalarıdır (Brown ve ark. 2018a). Hindilerin deneysel infeksiyonundan sonra, özellikle gastrointestinal sistem ve kloaka gibi bir dizi farklı dokudan izolasyon yapılabilmektedir (Shah-Majid ve Rosendal 1987a; Bradbury ve ark. 1988). Kabuk altı ölümlerde, genital sisteme kıyasla daha fazla etken bulunduğu bildirilmiştir (Grant 1987).

Kabuk altı örneklemenin, genital sistemden svapla örneklemeye oranla infeksiyonun daha duyarlı bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (Grant 1987). Çünkü yumurta kanalında nadiren *Mycoplasma iowae* tespit edilen hindilerin mikroorganizmayı büyük bir oranda yavrularına geçirebildiği görülmüştür. Ayrıca kloaka, fallus ve spermaları kültür negatif erkeklerin infeksiyonu dişilere bulaştırabildikleri ileri sürülmüştür (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Diğer birçok Mycoplasma türü gibi, *Mycoplasma iowae* fakültatif anaerobdur ve üremek için karbondioksite ihtiyaç duyar. Sıcaklık gereksinimleri mikroorganizmanın doğal yaşam alanını yansıtır; yani kanatlı Mycoplasma türlerinin optimum üreme sıcaklığı memeli mycoplasma türlerine göre biraz daha yüksektir (Gardella ve Delguidice 1983). Bazı *Mycoplasma iowae* suşları için optimum üreme sıcaklığı 41 - 43 ° C (Grau ve ark. 1991) olarak belirtilmiştir ancak izolasyon için 37 ° C'lik inkübasyon sıcaklığı yeterlidir (Barber ve Fabricant 1971). *Mycoplasma iowae,* serumlu zenginleştirilmiş standart mycoplasma besiyerinde ürer (Bradbury 1977). Serumun kalitesi, özellikle taze maya ekstraktının varlığı ve kalitesi başarılı bir izolasyon için önemlidir (Al-Ankarı ve Bradbury 1996; Miles ve Nicholas 1998) Diğer çoğu mycoplasma türü gibi *Mycoplasma iowae* da, talyum asetata ve ayrıca penisiline dirençlidir ve bunlar besiyerindeki kontaminant bakteri ve mantarların üremelerini inhibe etmek için kullanılırlar. *Mycoplasma iowae*'nın katı besi yerinde koloni oluşumu, oldukça değişkenlik göstermektedir. Koloniler genellikle agarda 37 ° C'de 2 ila 3 gün inkübasyondan sonra ortaya çıkar, ancak özellikle birincil izolasyonda daha uzun sürebilir. Hatta bazen bir koloni tespit edilmesi 2-3 haftayı bulabilir (Boyle ve ark. 1995; Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Kültürün *Mycoplasma iowae* için en yaygın tanısal test olmaya devam ettiği, ancak yavaş üreme hızı nedeniyle sorunlar yaşandığı belirtilmiştir (Boyle ve

ark. 1995). Pozitif kültürlerin identifikasyonu için immünofloresan testi kullanılabilir (Rosendal ve Black 1972). Fakat suşların antijenik farklılıkları birden fazla suştan hazırlanmış antiserumların kullanılmasını gerektirebilir (Bradbury ve ark. 1992).

Besiyerine yapılan ilk ekimde bulunacak bakteriyel kontaminantlar veya rekabete yol açabilecek patojenik olmayan diğer Mycolasmalar nedeniyle izolasyonda sıkıntı yaşanacağı bildirilmiştir (Cai ve ark. 2008). Özellikle kloakal numunelerde yaşanan kontaminant sorunu nedeniyle etken izolasyon başarısını en üst düzeye çıkarmak için hem sıvı besi yeri hemde katı besiyerinin birlikte kullanılması gerekliliği öne sürülmüştür (Al-Ankari ve Bradbury 1996). *Mycoplasma iowae'nın* bazen sıvı besiyerinde üreyemediği ve katı besiyerine ekim yönteminin daha fazla tercih edilmesi gerektğini belirten araştırıcılar da bulunmaktadır (Amin ve Jordan 1978). Saha suşları ile valide edilmiş PCR testlerinin geliştirilmesine kadar kültür birincil teşhis yöntemi olarak kullanılmıştır (Garcia ve ark. 1997; Cai *v*e ark. 2008).

Ancak, kültür, uygulanabilir ve önemli bir tanı yöntemi olmaya devam etmektedir ve PCR'den önemli ölçüde daha ucuzdur. Ancak *Mycoplasma iowae* kültürünün duyarlılığının, PCR ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bildirilmiştir (Wood ve Wilson 2013).

Çoğu suş 9,5'lik nispeten yüksek pH değerinde ürer (Barber ve Fabricant 1971). % 0.5 - % 1.0 safra tuzu varlığında üreme kabiliyetindedir (Fabricant 1970; Barber ve Fabricant 1971; Shah-Majid ve Rosendal 1987a).

Mycoplasma iowae, glikozu fermente eder ve arginini hidrolize eder (Bradbury 1983). Fosfataz üretmez, film-spot negatiftir, tetrazolyum klorürü indirgemez (Jordan ve ark. 1982). Patojen kanatlı mycoplasma türlerine ait biyokimyasal özellikler Tablo 2-3'de verilmektedir (Whitvear, 1976).

Tablo 2-3: Patojen Kanatlı Mycoplasmaların Biyokimyasal Özellikleri

Mycoplasma Türü	GF	AH	FA	TR	FS	Sİ
Mycoplasma gallisepticum	+	-	-	+	-	+
Mycoplasma synoviae	+	-	-	-/z	+	+
Mycoplasma meleagridis	-	+	+	-		+
Mycoplasma iowae	+	+	-	+	-	+

GF = Glikoz Fermentasyonu, AH = Arginin Hidrolizi, FA =Fosfataz Aktivitesi, TR = Tetrazolyum Redüksiyonu, FS = Film Spot Oluşumu, Sİ= Sterol

İhtiyacı Z: Zayıf Reaksiyon

2.3.9.2. Moleküler Tanı

Mycoplasma iowae'nin moleküler tespitinde PCR'ın deneysel olarak ilk kullanımı 1990'lı yılların başına kadar uzanmaktadır (Zhao and Yamamoto 1990; Kempf ve ark. 1994; Boyle ve ark. 1995). Deneysel multipleks PCR olarak ilk test ise 1996 yılında geliştirilmiştir (Garcia ve ark. 1996).

Hugh ve ark. (2008) 16S rRNA genini hedefleyen primerler ve problar kullanarak gerçek zamanlı PCR geliştirmiş ve saha validasyonunu ve PCR' ın duyarlılığının % 97.6, özgüllüğünün % 95.5 olduğu ortaya koymuşlardır.

Başka araştırıcılar, rRNA operonundan seçilen primerler kullanarak PCR geliştirmiştir. Garcia ve ark. (1995), Kempf ve ark. (1994) ve Boyle ve ark. (1995) primerlerin seçimini 16S rRNA geninin değişken bölgelerinden yaparken, Laigret ve ark. (1996) primerlerini rRNA operonunundan seçmiştir. Kempf ve ark. (1994), primerlerinin *Mycoplasma gallisepticum* da dahil olmak üzere diğer mycoplasma türlerinin tespitine izin verdiğini ancak PCR ürünlerinin boyutlarının farklı olduğunu bildirmişlerdir. Fan ve ark. (1995) kanatlı mycoplasmalarından DNA' yı amplifiye etmek için 16S rRNA geni içinden primerleri kullanmış ve daha sonra ürünlere RFLP uygulamıştır. Bununla birlikte, bu test aynı zamanda bakteri DNA'sını da çoğalttığından saha materyali için uygun bulunmamıştır. Garcia ve ark. (1995) tarafından geliştirilen testte, *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae* ve *Mycoplasma iowae* DNA'ları çoğaltılmış, ardından PCR ürünlerine RFLP uygulanmıştır. Bu test, embriyonlu yumurtalarda

Mycoplasma iowae infeksiyonunu saptamak için kullanılmıştır (Levisohn ve ark. 1995b). Garcia ve ark. (1996) dot-blot PCR testinde spesifik oligonükleotid problarını kullanmış ve testin deneysel olarak infekte hindilerden alınan trakeada ve kloakal svaplarda *Mycoplasma iowae*'yı tespit etmek için kültürden daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır.

Rebelo ve ark. (2011) 16S ribozomal RNA ile 23S ribozomal RNA genleri arasındaki boşluk bölgesi için spesifik üniversal primerler kullanarak gerçek zamanlı PCR-HRM testi geliştirmişlerdir. *Mycoplasma iowae*'nın yanı sıra çok sayıda mycoplasma türünü tespit ve ayırt edebilen test, floresan antikor testi ile uyumlu sonuçlar vermiştir.

Wang ve ark. (1997) tarafından *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma meleagridis* ve *Mycoplasma iowae*'yı içeren multipleks polimeraz zincir reaksiyonu geliştirilmiş, referans ve saha suşlarının içeren toplam 30 kültürde yapılan çalışmada, 4 patojen mycoplasma primerininde benzer duyarlılıkta olduğu tespit edilmiştir.

Tür spesifik DNA problarının, *Mycoplasma iowae* infeksiyonlarının teşhisi için önemli bir alternative olduğu, mümkünse, grubun tüm üyelerini tespit edebilmeli ve saha infeksiyonlarında bulunabilecek az sayıda mikroorganizmayı bulabilecek kadar hassas olmalıdırlar. Zhao ve Yamamoto (1990), grup için spesifik olan dot-blot deneyinde 10^6mikroorganizmanın eş değerini bulan bir prob geliştirdi. Daha sonra, tespit hassasiyeti, 10^2 - 10^3 hücre eşdeğerini saptayabilen PCR kullanılarak önemli ölçüde arttırılmıştır (Zhao ve Yamamoto 1993).

Hugh ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada 16S rRNA genini hedefleyen primerler ve problar kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR) geliştirilmiştir. Hindi kloacal svap örnekleri ile yapılan saha çalışmasında, Real Time PCR'nin tanısal duyarlılığının % 97.6 ve özgüllüğü ise % 95.5 olduğu bildirilmiş ve bu yöntemin *Mycoplasma iowae*'yi tespit etmek için etken izolasyonuna göre hızlı, duyarlı ve uygun maliyetli bir alternatift olabileceği ifade edilmiştir.

Dört patojenik kanatlı mycoplasmasının moleküler teşhisine yönelik seçilen genomik hedefleri türe özgü olduğu ve bu amaçla seçilen; intraspesifik olarak *Mycoplasma synoviae* ve *Mycoplasma meleagridis*'in 16S-23S intergenik aralayıcı bölgesini, *Mycoplama iowae*'nın 16S ribozomal DNA'sı ve MG'nin mgc2 geninin yüksek oranda korunmuş odaklarını içeren gerçek zamanlı TaqMan PCR'nın geliştirildiği ve

oldukça spesifik, doğruluğu ve etkinliği ile bu patojenlerin teşhisinde uygulanabilir olduğu bildirilmiştir (Raviv ve Kleven 2008).

Ghanem ve El-Gazzar (2016) tarafından yapılan Multilocus Sequence Typing (MLST) analizinde, *Mycoplasma iowae* pozitif klinik vakaları doğrudan DNA örneklerinden tanımlamak için kullanılabilen, oldukça tekrarlanabilir bir moleküler epidemiyolojik test olduğunu bildirmişlerdir.

Moleküler teşhis yöntemleri, özellikle Mycoplasma konsantrasyonunun düşük olduğu örneklerde *Mycoplasma iowae*'yı tespiti için uygun bir yöntemdir. PCR'nin yakın zamandaki gelişimi ve saha validasyonu ile sırasıyla% 97.6 ve% 95.5 tanısal duyarlılık ve özgüllük elde edildiği ve bunun da PCR' yi kültüre kıyasla daha uygulanabilir bir tanı alternatifi haline getirdiği ifade edilmiştir (Cai ve ark. 2008). Bu aynı zamanda, özgünlüğü iyileştirmeye odaklanan son çalışmalarla saha örneklerinde de gösterilmiştir (Ramirez ve ark. 2012).

Öngör ve ark. (2009) tarafından Türkiye'deki ticari hindi işletmelerine ait 23 kümesten toplam 624 trakeal svap örneğinde kanatlı mycoplasmalarını inceledikleri çalışmada, Mycoplasma genus spesifik PCR ile 25 pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Daha sonra yapılan tür spesifik PCR'larda ise, 7 kümese ait toplam 20 adet trakeal svap örneğinde *Mycoplasma iowae*, 3 kümese ait 3 adet trakeal svap örneğinde *Mycoplasma meleagridis* ve 2 kümese ait 2 adet trakeal svap örneğinde *Mycoplasma gallisepticum* DNA'sı tespit edilirken *Mycoplasma synoviae* DNA'sı tespit edilmediği bildirilmiştir.

PCR hızlı olmasına ve duyarlılık ve özgüllük açısından tanısal altın standart haline gelmesine rağmen, bazı dezavantajları vardır. Hem test hem de gereken ekipman açısından önemli ölçüde daha pahalıdır. DNA ekstraksiyonu, svap üzerindeki dışkı ve bakteri yüklerinden etkilenebilir ve kontaminasyonun yine de potansiyel olarak testi etkileyebildiği ifade edilmektedir (Cai ve ark. 2008). PCR, serotipler arasında ayrım yapmadan *Mycoplasma iowae*'yi yalnızca tür düzeyinde tanımlamaktadır. Ancak serotip tanımlaması gerektiği hallerde izolasyonun gerekliğinin önemi vurgulanmıştır (Wood ve Wilson, 2013).

2.3.9.3. Serolojik Tanı

Geleneksel serolojik testler doğal infeksiyonlarda antikorların belirlenmesinde büyük ölçüde başarısız olmuştur (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Mycoplasma iowae' nın belirgin bir humoral bağışıklık tepkisi uyandırmaktaki yetersizliği nedeniyle serolojik testlerin kullanılmasının hastalığın teşhisi için uygun bir yörtem olmadığı bildirilmiştir. Çabuk Serum Aglütinasyon testi (RSA) güvenirliliğinin az olması ve hemaglütinasyon inhibisyon testinin ise, *Mycoplasma iowae*'nın eritrositleri hemaglütine etme yeteneğinin zayıf olması nedeniyle kullanılamayacağı ifade edilmektedir (Zhao ve Yamamoto 1989; Bradbury 1999; Garcia ve ark. 1996; Rhoades 1984; İzgür ve Akan 2002).

Dierks ve ark. (1967), I, J, K ve N serotiplerininhindi eritrositlerini hemaglutine edebildiğini ancak bu özelliğin stabil olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde Timms (1967) tip 8 izolatın tavuk eritrositlerini aglütine ettiğini saptamıştır.

Yoder ve Hofstad (1962, 1964) 695 suşunun ve çeşitli saha suşlarının hindi eritrositlerini aglütine etme özelliğinin *Mycoplasma gallisepticum* S6 suşuna kıyasla daha yüksek olduğunu fakat hemaglütinasyon aktivitesinin S6 suşuna göre daha az stabil olduğu bildirmiştir. Roberts (1964), 695 suşunun çok sayıda memeli ve kanatlı türünün eritrositlerini aglütine edebildiğini ortaya koymuştur.

Stipkovits ve El-Ebeedy (1977) tavuk, hindi ve kaz hücreleri için bazı serotiplerin (I, J, K) referans suşlarının hemaglütinasyon özelliklerini gösterdiği, ancak N ve Q serotipinin hemaglütinasyon özelliği göstermediğini tespit etmiştir. Zhao ve Yamamoto (1989), I, J, K, N, Q ve R serotipleri ile 3 saha izolatının bir miktar HA aktivitesine sahip olduklarını, fakat bir saha suşu hariç 4, - 20 veya - 70 ° C'de 24 saatlik depolamadan sonra bu özelliğin kaybolduğunu ve yüksek titreye rağmen bu saha suşunun infekte hindilerin serumlarıyla hemaglütinasyon testinde reaksiyon vermediği saptanmıştır.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), hindilerde infeksiyonun tespiti için araştırılmış, ancak yalancı pozitif reaksiyonlara yol açmıştır (Jordan ve ark. 1987).

*Mycoplasma synoviae'*nın tespiti için çok duyarlı olan mikro-immünofloresans testinin *Mycoplasma iowae* antikorlarını tespit edemediği bildirilmiştir (Bradbury ve ark. 1990). Cummins ve Reynolds (1990) geliştirdikleri dot immunobinding testinin deneysel

olarak infekte hindilerde çalıştığını bildirmişlerdir. Ancak testin saha infeksiyonlarındaki doğruluğu belirlenmemiştir.

Levisohn ve ark. (1995a) tarafından 5 adet referans *Mycoplasma iowae* suşu ve bir saha suşunun antijeninden hazırlananbenzer bir dot immunobinding testi geliştirilmiş ancak deneysel olarak infekte hindilerde başarılı sonuç alınamamıştır.

2.3.10. Koruma Ve Kontrol

Mycoplasma gallisepticum ve *Mycoplasma synovia* gibi mycoplasma türlerinin aksine, *Mycoplasma iowae* için profilaktik aşılama mevcut değildir. Mycoplasmaların bir hücre duvarı yoktur ve dolayısıyla penisilin ve türevleri gibi hücre duvarı sentezini etkileyen antimikrobiyaller etkisizdir. *Mycoplasma iowae,* antimikrobiyallere diğer kanatlı patojenik mycoplasmalarından daha dirençlidir ve etkili tedavi seçeneklerinin mevcudiyeti genellikle sınırlıdır (Jordan ve ark. 1989; Kempf ve ark. 1989b; Gautier-Bouchardon ve ark. 2002).

Mycoplasma iowae suşlarının % 3'lük NaCl'ye ve % 0.02'lik metilen mavisine, diğer pek çok kanatlı mycoplasmasından daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Barber ve Fabricant 1971).

Mycoplasma iowae kapsamlı temizlik ve dezenfeksiyon prosedürleri ile öldürülebilir (Kleven 1991). Çevre şartlarında hayatta kalması hakkında çok az şey bilinmektedir. Ancak, *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae*'dan daha uzun süre hayatta kalabileceğini göstermiştir (Christensen ve ark. 1994). *Mycoplasma iowae* suşunun hindi sperminde 40 ° C'de 48 saat hayatta kalabildiği bildirilmiştir (Shah-Majid ve Rosendal 1986b).

Gelişen direnç durumu, diğer Mycoplasma infeksiyonlarını kontrol etmek için antimikrobiyallerin uzun süredir kullanılmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir (Kleven 2008).

Günümüzde Kuzey Amerika'da gıda üreten hayvanlarda kullanılmayan enrofloksasin ve tiamulin; tilosin, oksitetrasiklin ve linkomisin gibi diğer antimikrobiyallere karşı tanımlanan yüksek seviyeli direnç nedeniyle en yaygın kullanılan antibiyotikler gibi görünmektedir (Jordan ve ark. 1991, 1993; Burch ve Valks 2003).

Levisohn ve ark. (1992), standart *Mycoplasma iowae* suşlarının aksine İsrail saha suşlarının 100 g/ml tilosin tartrat tarfından inhibe edilmediğini fakat çoğu izolatın 0.05 - 1.0^g/ml enrofloksasin ile inhibe edildiğini bildirmiştir. Yeni kinolon grubu antibiyotiklerin yumurta ve gençlerin tedavisi için tercih edilen antibiyotik grubu olduğu ilei sürülmüştür (Kempf ve ark. 1989b; Jordan 1990).

İnfekte sürülerde, kuluçka problemlerini en aza indirgemek için enrofloxacin, egg-deeping yöntemi olarak kullanılmıştır (Baxter-Jones 1993).

Jordan ve ark. (1991) 5 gün süreyle içme suyuyla 50 ppm konsantrasyonunda verilen enrofloksasinin kanatlılarda *Mycoplasma iowae* infeksiyonu için en etkili tedavi şekli olduğunu ve vertikal bulaşmaya karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (Jordan ve ark. 1993).

Tiamutilin *Mycoplasma iowae*'ye karşı in vitro etkili olsa da (Grant 1987), yumurta tedavisinde ve deneysel olarak infekte olmuş tavukların içme suyuna katılarak tedavisinde etkili olmadığı saptanmıştır (Jordan ve ark. 1991).

Makrolidlere karşı Mycoplasma direncinin in vitro olarak hızlı bir biçimde şekillendiği ve dolayısıyla saha koşullarında benzer sonuçların elde edileceği öne sürülmüştür (Gautier-Bouchardon ve ark. 2002).

Mycolasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae ve *Mycoplasma meleagridis*'in eliminasyonu için önemli bir yöntem olan damızlık yumurtaların kuluçka öncesi tylosin tartrate ve gentamicin başta olmak üzere antibiyotiklerle muamelesinin, *Mycoplasma iowae*'yı elimine edemediği ileri sürülmüştür. Avrupa'da ve ABD'de bazı primer hindi yetiştiricileri tarafından *Mycoplasma iowae*'nin mikrobiyolojik izleme ile desteklenmek kaydıyla, damızlık yumurtalarının kuluçka öncesi Enrofloxacin tedavisi ile eradike edildiği belirtilmiş ve *Mycoplasma iowae* ile mücadelede en uygun antibiyotik grubunun florokinolonlar olduğu ileri sürülmüştür (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Tomczyk ve Minta (2002), parenteral tedavilere ek olarak, suni tohumlamadan önce hindi semen katkı maddesi olarak tilosin ve enrofloksasini kullanmış ve *Mycoplasma iowae*'yi tamamen ortadan kaldırdığını bildirmiştir.

Avrupa'da yapılan uygulamaların sonuçlarına göre yumurtalar bireysel olarak inoküle edilse bile yumurta tedavisi % 100 etkili olmadığı bildirilmiştir. İnfekte

damızlıkların kloakal kültür ile tespit edilmesi, bazı hindilerin infekte olduğu halde yumurtlama dönemine kadar kültür negatif olarak kalması nedeniyle başarısız olduğu ileri sürülmüştür. Eradikasyon programının sonlarına doğru yumurtalara antibiyotik tedavisi uygulanılmaması fakat yoğun kültürel tarama gerçekleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir (Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Mycoplasma iowae infeksiyonunun kontrolünde, hindilerde damızlık düzeyde kontrol sağlanmasının, kuluçkalık yumurtaların ilaçlanmasının ve bu sayede infeksiyon yükü azaltılarak embriyonal ölümler minimalize edilmesinin başarılı olacağı belirtilmiştir (Al-Ankari ve Bradbury 1996). Diğer tüm mycoplasma infeksiyonlarında olduğu gibi damızlıkların *Mycoplasma iowae*'dan ari olması hedeflenmelidir.

Tohumlama sırasında kloakal çapraz kontaminasyona yol açan kötü hijyen koşullarının damızlık sürülerinde yayılmaya sebebiyet verdiği bildirilmiştir. Çapraz kontaminasyonun sıkı biyogüvenlik tedbirlerinin uygulanmasıyla ve enfekte olan ve enfekte olmayan kanatlılar arasındaki dışkı transferinin ortadan kaldırılmasıyla durdurulabileceği bildirilmiştir (Wood ve Wilson 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İnceleme Örnekleri

Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmelerinde *Mycoplasma iowae* varlığının bakteriyolojik ve örnekten direkt Real Time PCR ile araştırılması amacıyla Kuluçkahane ve Damızlık İşletmeleri Yönetmeliği Uygulama Talimatı kapsamında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne kontrol amacıyla gönderilen 392 (1192) adet inceleme örneği kullanıldı. Bu örnekler;

1. Ülke genelindeki Hindi kuluçkahane işletmelerine ait 96 adet kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurta,
2. Ülke genelindeki Hindi damizlik işletmelerine ait her bir kümesden 4'er adet olmak üzere toplamda 100 adet trakeal svap havuzu (Her svap havuzu 5'er adet (5x100) svap içermektedir),
3. Ülke genelindeki Hindi damizlik işletmelerine ait her bir kümesden 4'er adet olmak üzere toplamda 100 adet kloakal svap havuzu (Her svap havuzu 5'er adet (5x100) svap içermektedir),
4. Marmara Bölgesinde yer alan tavuk kuluçkahane işletmelerine ait 96 adet kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurta,

olarak dağılım göstermektedir (Tablo 3.1).

İnceleme örneklerinden trakeal svaplar ve klokal svaplar, damızlık işletmelerinden transport besi yeri içerisinde gönderildi. Kuluçkahane işletmelerinden ise kabuk altı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurta numuneleri gönderildi. Laboratuvara gelen inceleme örnekleri bekletilmeden analize alınarak çalışma başlatıldı.

Bu çalışmada Türkiye faaliyet gösteren tüm hindi damızlık ve kuluçkahane işletmeleri çalışmaya dahil edildi.

Tablo 3-1: Örnek alınan kanatlıların kaynakları, yetiştirilme amaçları, detaylı örnek sayıları ve örnek türleri

İşletme Türü	Örnek Alınan İşletme Sayısı	Örnek Alınan Kümes Sayısı	Örnek Havuzu	Örnek Sayısı	İnceleme Örneği
Damızlık Hindi İşletmesi	2	25	100	500	Trakeal Svap
Damızlık Hindi İşletmesi	2	25	100	500	Kloakal Svap
Hindi Kuluçkahanesi	4	–	-	96	Kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu hindi yumurtası
Tavuk Kuluçkahanesi	24	–		96	Kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu tavuk yumurtası

3.1.2. Besiyerleri

3.1.2.1. Besi Yerlerinde Kullanılan Stok Solüsyonlar

Taze Maya Ekstraktı Solüsyonu (%25)

250 gr taze ekmek mayası, final hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içerisinde eritildi. Karışım kaynatıldı, soğutuldu ve steril godelere eşit bir şekilde paylaştırılarak 20 dakika 3500 g ‘de santrifüj edildi. Hazırlanan ekstraktın ph’sı NaOH kullanılarak 8.0’e ayarlandı. Sırasıyla 0.8 µm’lik (Minisart, 16592), 0.45 µm’lik (Sartorius, 16555-K) ve 0.2 µm’lik selüloz asetat filter (Schleicher and Schuell, 10462200) kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan stok solusyon, 200 ml’lik falkon tüplerine paylaştırılarak -20 °C’de saklandı. (OIE, 2018)

NAD Solüsyonu (%1)

1 gr NAD (Serva, 30311.04) distile su içerisinde eritilerek, final hacim olan 100 ml’ye tamamlandı. 0,2 µm’lik selüloz asetat filtre (Schleicher and Schuell, 10462200) kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan stok solusyon, 20 ml’lik falkon tüplerine paylaştırılarak +4 C’de saklandı.

Talyum Asetat Solüsyonu (%5)

5 gr talyum asetat (Alfa Aesar, 11842) distile su içerisinde eritilerek, final hacim olan 100 ml'ye tamamlandı. 0,2 µm'lik selüloz asetat filtre (Schleicher and Schuell, 10462200) kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan stok solusyon, 20 ml'lik falkon tüplerine paylaştırılarak +4 C'de saklandı.

Fenol Kırmızısı Solüsyonu (%0.1)

0.1 g fenol kırmızısı (Bioshop, PHE600.25) distile su içerisinde eritilerek, final hacim olan 100 ml'ye tamamlandı. 0,2 µm'lik selüloz asetat filtre (Schleicher and Schuell, 10462200) kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan stok solusyon, 40 ml'lik falkon tüplerine paylaştırılarak +4 C'de saklandı.

Glikoz Solüsyonu (%10)

10 g glikoz (Ambresco, 0188) distile su içerisinde eritilerek, final hacim olan 100 ml'ye tamamlandı. 0.2 µm'lik selüloz asetat filtre (Schleicher and Schuell, 10462200) kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan stok solusyon, 20 ml'lik falkon tüplerine paylaştırılarak +4 C'de saklandı.

Arginin Solüsyonu (%10)

10 g L-arginine monohydrocloride (Merck, 1.01543.0050) distile su içinde eritilerek, final hacim olan 100 ml'ye tamamlandı. 0.2 µm'lik selüloz asetat filtre (Schleicher and Schuell, 10462200) kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan stok solusyon, 20 ml'lik falkon tüplerine paylaştırılarak +4 C'de saklandı.

3.1.2.2. Kanatlı Mycoplasma Sıvı Besi Yeri

Birinci Kısım

Mycoplasma Broth (BD,255720)	14.7 g
Distile su	700 ml

Tüm malzemeler uygun miktarlarda tartılarak distile su içerisinde eritildi. KarışımıN pH'sı 7.8'e ayarlandı. Hazırlanan besiyeri 121 °C' de ve 15 dakika süre ile

otoklavlanarak steril edildi. 56 °C'ye ayarlanmış benmaride soğutuldu ve ikinci kısım ilave edildi (Miles ve Nicholas 1998; OIE 2018).

İkinci Kısım

Domuz Serumu (Gibco, 26250)	150 ml
Taze Maya Ekstraktı Solüsyonu (%25)	100 ml
NAD Solüsyonu (%1)	10 ml
Glikoz Solüsyonu (%10)	10 ml
Arginin Solüsyonu (%10)	10 ml
Talyum Asetat Solüsyonu (%5)	10 ml
Penicilin G 1.000.000 IU (İ.E. Ulagay,703002)	1 flakon
Fenol Kırmızısı Solüsyonu (%0.1)	20 ml

Hazırlanan besiyeri steril kapaklı şişelere 9'ar ml paylaştırıldı. Etiketlendikten sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.*Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu kullanılarak besiyerinin kalite kontrolü yapıldı.

3.1.2.3. Kanatlı Mycoplasma Katı Besi Yeri

Birinci Kısım

Mycoplasma Broth (BD,255720)	14.7 g
Distile su	700 ml
Bakteriyolojik agar (Liofilchem, 611001)	10 g

Tüm malzemeler uygun miktarlarda tartılarak distile su içerisinde eritildi. Karışımın pH'sı 7.8'e ayarlandı. Hazırlanan besiyeri 121 °C' de ve 15 dakika süre ile otoklavlanarak steril edildi. 56 °C'ye soğutuldu ve ikinci kısım ilave edildi (Miles ve Nicholas 1998; OIE, 2018).

İkinci Kısım

Domuz Serumu (Gibco, 26250)	150 ml
Taze Maya Ekstraktı Solüsyonu (%25)	100 ml
Glikoz Solüsyonu (%10)	10 ml
Arginin Solüsyonu (%10)	10 ml
Talyum Asetat Solüsyonu (%5)	10 ml

NAD Solüsyonu (%1)	10 ml
Penicilin G 1.000.000 IU (İ.E. Ulagay,703002)	1 flakon
Fenol Kırmızısı Solüsyonu (%0.1)	20 ml

Hazırlanan katı besiyeri 90mm çaplı steril plastik petri kutularına dökülerek etiketlendi. Kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı. Besiyerinin kalite kontrolü *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu kullanılarak yapıldı.

3.1.3. Referans Maddeler

3.1.3.1. Referans Suş

Mycoplasma iowae NCTC 10185 referans suşu Pendik veteriner Kontrol Enstitüsü Kanatlı Mycoplasmaları OIE Referans Laboratuvarından temin edildi. Referans suş, hazırlanan besiyerilerinin kalite kontrol suşu olarak, etken izolasyonunda test kontrol olarak, moleküler tanıda pozitif kontrol olarak ve mimimum tespit limiti belirlemede referans olarak kullanıldı. *Mycplasma meleagridis, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma gallinaruim* ve *Acheloplasma laidlawii* seçicilik çalışmasında referans suş olarak kullanıldı.

3.1.3.2. Referans Hiperimmun Serum

Mycoplasma iowae st.695 Rab.Tull/2 antiserumu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Kanatlı Mycoplasmaları OIE Referans Laboratuvarından temin edildi. Referans serum, inceleme örneklerinden elde edilecek izolatların üreme inhibisyon testi ile identifikasyonunda referans serum olarak kullanıldı.

3.1.4. Moleküler Yöntem Gereçleri

3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu Gereçleri

Mycoplasma iowae NCTC 10185 referans suşu ve inceleme örneklerinin DNA ekstraksiyonu için High Pure PCR Templete Preparation Kit (Roche, 11796828001) kullanıldı.

High Pure PCR TempletePreparation Kit İçeriği:
Binding Buffer, Proteinaz K, Tissue-lysis Buffer, Inhibitor Removal Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, Filtreli Tüp, Toplama Tüpleri

3.1.4.2. Real Time PCR DNA Amplifikasyon Gereçleri

Mycoplasma iowae NCTC 10185 referans suşu ve inceleme örneklerine ait DNA'ların amplifikasyonu için *Mycoplasma iowae* Real-Time PCR Tespit Kiti (Bio-Speedy-BS-DTC-V-206-100) kullanıldı.

Mycoplasma iowae Real-Time PCR Tespit Kiti içeriği:

2x qPCR Mix, (Enzim ve tampon karışımı), *Mycoplasma iowae*-Oligo Mix (*Mycoplasma iowae* hedef oligonükleotitler), İnh ve Reak. Kont._NA (İnhibisyon/Reaktif Kontrol Template ve Oligoları), PC-*Mycoplasma iowae* (Pozitif Kontrol Template ve qPCR Mix Karışımı) ve NTC (No Kontrol (Negatif) Template)

3.1.4.3. Diğer gereçleri

Buzdolabı (Arçelik)

Derin dondurucu (Arctiko)

DNaz ve RNaz'dan arındırılmış mikosantrifüj tüpleri,(Eppendorf)

DNaz ve RNaz'dan arındırılmış Pipet Uçları (Neptune)

Kuru blok ısıtıcı (Biosan- Bio TDB-100)

Lamin air flow (Esco Class 2 BSC)

Mikrosantrifüj (Hettich –Mikro 120)

Nanodrop1000 (Thermo)

Otomatik pipetler (0.5-10 µl, 10-100µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, Eppendorf),

PCR Cabinet (Esco-PCR 4A1)

Pipetler 1 ml (0.01 bölmeli), 5 ve 10 ml (0.1 ml bölmeli)

q-PCRtüpü (4titute)

Real time PCR cihazı (Roche- Light Cycler 96)

Steril pens, spatül, bistüri v.b. malzemeler

Vorteks (Biosan- Bio Vortex V1)

3.2. Yöntem

3.2.1. Etken izolasyonu

İnceleme örneklerinden hindi ve tavuk kuluçkahanelerine ait kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolara ait hava keseleri ve trakeaları steril pens ve makas yardımıyla, ekstra embriyonal sıvıları ise steril enjektör yardımıyla alınarak, havanda steril kum ve kanatlı mycoplasma sıvı besi yeri ilavesi ile ezilerek homojenize edildi. Elde edilen homojenattan 9'ar ml kanatlı mycoplasma sıvı besi yerinde10^{-6}'ya kadar on katlı dilusyonları yapılarak ekimler gerçekleştirildi. İnceleme örneklerinden transport medium içerisinde gelen trakeal ve kloakal svap havuzlarından ise alınan 1 ml transport medium, 9'ar ml kanatlı mycoplasma sıvı besi yerinde10^{-6}'ya kadar on katlı dilusyonları yapılarak ekimler gerçekleştirildi. Kanatlı mycoplasma katı besi yerlerine ekimlerde, besiyerleri 6 eşit parçaya ayrılarak dilusyonları yapılmış ekimlerden 1 damla bırakıldı. Ekimleri tamamlanmış olan sıvı ve katı besiyerleri 37°C' de ve %5 karbondioksit içeren etüvde inkübe edildi. Mycoplasmaların üreme gereksinimlerinden biri olan nemi sağlayabilmek için, etüvün su haznesi tamamen doldurudu. İnkubasyona kaldırılan katı ve sıvı kültürler üreme yönünden her gün kontrol edildi (Miles ve Nicholas 1998).

Ekim işlemi gerçekleştirilen sıvı besi yerleri renk değişimi ve bulanıklık yönünden gözle kontrol edildi. Sıvı kültürlerde Mycoplasma üreme belirtisi olan homojen bulanıklık yada renk değişimi gözlenen kültürlerden, steril pipet yardımı ile ekim oranı %10 (v/v) olacak şekilde sıvı besiyerine, hemde 1 damla kültürden yayma şeklinde katı besi yerine pasajlar yapıldı. Sıvı kültürlerde oluşan homojen olmayan bulanıklık veya tüpün dibinde tortu oluşumunun gözlenmesi kontaminasyon olarak değerlendirildi. Kontamine kültürlerden steril enjektör yardımı ile alınan 2 ml kültür, 0,45 µm por çaplı steril membran filtreden süzülerek ekim oranı %10 (v/v) olacak şekilde 9 ml sıvı besi yerine ve 1 damla katı besiyerine olmak üzere pasajlandı.

İnkübasyonun 7. gününe kadar besiyerlerinde üreme varlığı gözlemlendi. Üreme saptanmayan sıvı kültürlerin sıvı ve katı besiyerlerine 3 kör pasajı yapıldı. Bu amaçla üreme şüphesi olmayan kültürlerden steril pipet vasıtasıyla 1 ml alınarak 9 ml sıvı besiyerine, 1 damla şüpheli kültür ise katı besiyerine yayma şeklinde pasajlandı. 3 kör pasajdan sonra üreme belirtisi göstermeyen şüpheli kültürler negatif olarak değerlendirildi.

İlk ekimi gerçekleştirilen her inceleme örneği ile paralel olarak *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu üretildi.

3.2.1.1. Biyokimyasal Yöntemlerle İdentifikasyon

Glikoz Fermentasyonu

Kanatlı Mycoplasma Besiyeri, arginin ilavesi olmadan glikozlu ve glikozsuz olmak üzere 2 farklı şekilde hazırlandı. 24-72 saatlik saf kültürden 0.05 ml miktarında bir glikozlu ve bir glikozsuz besi yerine ekimler yapıldı. 37° C'de 24-72 saat inkübasyona bırakıldı. Birer adet ekim yapılmamış glikozlu ve glikozsuz besi yeri de kontrol olarak beraber inkübe edildi.Ekim yapılan glikozlu besi yeri ph'sının 0,5 veya daha fazla derece düşerek besi yerindeki glikozun kullanımına bağlı fenol kırmızısı indikatörlüğünde renk değişimi oluşması ve kontrol tüplerinde değişim oluşmaması glikoz fermentasyonu pozitif olarak değerlendirildi.

Arginin Hidrolizi

Kanatlı Mycoplasma Besiyeri, glikoz ilavesi olmadan argininli ve argininsiz olmak üzere 2 farklı şekilde hazırlandı. 24-72 saatlik saf kültürden 0.05 ml miktarında bir argininli ve bir argininsiz besi yerine ekimler yapıldı. 37° C'de 24-72 saat inkübasyona bırakıldı. Birer adet ekim yapılmamış argininli ve argininsiz besi yeri de kontrol olarak beraber inkübe edildi. Ekim yapılan argininli besi yeri pH'sının 0,5 veya daha fazla yükselerek renk besi yerindeki argininin kullanımına bağlı fenol kırmızısı indikatörlüğünde renk değişimi oluşması ve kontrol tüplerinde değişim oluşmamasıarginine hidrolizi pozitif olarak değerlendirildi.

Film Spot Formasyonu

Test yapılacak izolatların 24-72 saatlik kültürü ile sıvı ve katı besi yerine ekim yapıldı. 37° C' de ve %5 CO_2 içeren etüvde 2 haftaya kadar inkube edildi. Katı besi yerleri iki günde bir koloni etraflarında spot ve film oluşumları yönünden stereomikroskopta kontrol edildi. Ayrıca katı besi yerleri inkubasyon süresi sonunda distile su ile yıkanarak yüzeydeki film tabakası kontrol edildi.

3.2.1.2. Üreme İnhibisyon Testi ile İdentifikasyon

Test yapılacak olan izolatın 10^{-3}'e kadar dilüsyonu yapıldı. Test için en az iki dilüsyon kullanıldı (10^{-1} ve 10^{-3}). Kanatlı Mycoplasma Katı Besi Yeri petri plaklarının

arkasına kalemle boydan boya düz ve birbirine paralel çizgiler çizildi. Her bir kültür dilüsyonundan 50µL çizginin bir kenarına bırakılarak petri eğildi ve damlanın çizgi boyunca ilerlemesi sağlandı. Kuruması beklenip ekim çizgisi uzunluğunun ortasından 6 mm çaplı daire şeklinde agar parçası kesilip çıkarıldı. Oluşan çukura 30-40 µl antiserum taşırmadan konuldu. Kuruması beklenip, petri ters çevrilerek 37 °C'de inkübe edildi. Üreme süreci sonunda çukur etrafında üreme inhibisyon zonunun oluşması kontrol edildi.

3.2.2. MolekülerYöntemlerle Etken İdentifikasyonu

3.2.2.1. Transport medium ve Referans Suşlardan DNA Ekstraksiyonu

İnceleme örneklerinden alınarak -20°C'de saklanan trakeal ve kloakal svap havuzlarına ait transport mediumlar ve *Mycoplasma iowae* NCTC 10185, *Mycoplasma meleagridis, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma gallinaruim* ve *Acheloplasma laidlawii* suşlarının DNA ekstraksiyonu küçük modifikasyonlarla kit protokolüne göre yapıldı. (Roche – 11796828001)

1. 1,5 ml ependorf tüpe 1 ml kültür konup 10 000 g 'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve dipteki pelet 200 µl PBS ile resüspanse edildi. (İnceleme örneklerinden elde edilecek DNA miktarını arttırmak için kit protokolünün 1. basamağı olan, 200 µl kültürün 3000 g'de 5 dk santrifüj edilme aşaması yerine uygulandı)
2. Süspansiyona 40 µl Proteinaz-K ve 200 µl Binding Buffer ilave edildi.
3. Karışım vortekslendikten sonra kuru blok ısıtıcıda 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. İnkubasyonu tamamlanan karışıma 100 µl isopropanol ilave edilerek vortekslendi.
5. Filtreli tüp, toplama tüpünün içerisine yerleştirilerek karışım filtreli tüpün içerisine boşaltıldı. Tüpler 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtreli tüp yeni bir toplama tüpünün içerisinde yerleştirildi.
6. 500 µl İnhibitor Removal Buffer ilave edilen filtreli tüp, 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtreli tüp yeni bir toplama tüpünün içerisinde yerleştirildi.
7. Filtreli tüpe 1. yıkama işlemi için 500 µl Wash Buffer konuldu. 8000 g'de 1 dakika sanrtifüj işlemi gerçekleştirildi.
8. 2. Yıkama işlemi için filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer tekrar konularak 8000 g'de 1 dakika sanrtifüj işlemi gerçekleştirildi.

9. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 10 saniye maksimum devirde santrifüj edildi.
10. Filtreli tüp mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
11. Önceden 70 °C'de ısıtılımış olan Elution Buffer'dan 200 µl filtreli tüpe konularak 8000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
12. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA moleküler çalışmalarda kullanılma üzere -20°C deepfreeze kaldırıldı.

3.2.2.2. Homojenatlardan DNA Ekstraksiyonu

İnceleme örneklerinden kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolardan hazırlanan homojenatlar DNA ekstraksiyonu kit protokolüne göre yapıldı. (Roche – 11796828001)

Kit protokolüne göre;

1. Kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolardan hazırlanan homojenattan 50 mg alınarak 1,5 ml ependorf tüpüne konuldu.
2. Üzerine 200 µl Tissue-lysis Buffer ve 40 µl Proteinaz K ilave edildi, vortekslenerek 55 °C'de 1 saat inkübe edildi.
3. 1 saatin sonunda 200 µl Binding Buffer ilave edildi vortekslenerek 70 °C'de 10 dakika inkube edildi.
4. İnkubasyonu tamamlanan karışıma 100 µl isopropanol ilave edilerek vortekslendi.
5. Filtreli tüp, toplama tüpünün içerisine yerleştirilerek karışım filtreli tüpe aktarıldı. Tüpler 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtreli tüp yeni bir toplama tüpünün içerisinde yerleştirildi.
6. 500 µl İnhibitor Removal Buffer ilave edilen filtreli tüp, 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtreli tüp yeni bir toplama tüpünün içerisinde yerleştirildi.
7. Filtreli tüpe 1. yıkama işlemi için 500 µl Wash Buffer konuldu. 8000 g'de 1 dakika sanrtifüj işlemi gerçekleştirildi.
8. 2. Yıkama işlemi için filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer tekrar konularak 8000 g'de 1 dakika sanrtifüj işlemi gerçekleştirildi.
9. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 10 saniye maksimum devirde santrifüj edildi.
10. Filtreli tüp mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.

11. Önceden 70 °C'de ısıtılımış olan Elution Buffer'dan 200 µl filtreli tüpe konularak 8000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
12. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C deepfreeze kaldırıldı.

3.2.2.3. İnceleme Örnekleri ve Referans Suşlara Uygulanan Real Time PCR

Mycoplasma kültürlerinden ve inceleme örneklerinden elde edilen DNA ekstraktları kullanıldı. 200µl ısıya dayanıklı DNaz ve RNaz'dan arındırılmış qPCR tüpleri içerisine, finalde11 µl reaksiyon karşımı olmak üzere,

5 µl 2x qPCR Mix, (Enzim ve tampon karışımı), 3 µl *Mycoplasma iowae*-Oligo Mix (*Mycoplasma iowae* hedefli oligonükleotitler), 1µl İnh ve Reak. Kont. NA (İnhibisyon/Reaktif Kontrol Template ve Oligoları) ve 2 µl DNA ekstraktı konuldu.
DNA amplifikasyonu, 95 °C'de 5 dakika ön inkubasyon işleminden sonra, 40 döngü olmak üzere, 95 °C'de 15 saniye denatürasyon ve 60 °C'de 50 saniye bağlanma ve uzama işlemleri ile tamamlandı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Real Time PCR Programı

Ön İnkubasyon – 1 Döngü	Çoğalma - 40 Döngü		
	Denatürasyon	Bağlanma ve Uzama	Floresan Okuma
95 °C -5 dakika	95 °C -15 saniye	60 °C -50 saniye	FAM/ HEX

FAM ve HEX kanallarında elde edilen çoğalma eğrilerinin şekli incelendi ve sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak değerlendirildi. FAM ve HEX kanallarında okuma gerçekleştirildi. HEX kanalında qPCR IC (İnternal Kontrol) ve FAM kanalında qPCR hedef reaksiyonların Cq değerleri incelendi. Her iki kanal için $37 \leq Cq$ negatif, $Cq < 37$ ise pozitif olarak değerlendirildi. Real Time PCR analizinin doğruluğu için pozitif kontrolün pozitif, negatif kontrolün ise negatif sonuç vermesi beklendi.

3.2.3. Minimum Tespit Limitinin Belirlenmesi

Kullanılan Real Time PCR Kitinin duyarlılığını belirlemek için minimum tespit limiti çalışması yapıldı. Bu çalışmada *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu

kullanıldı. Liyofilize *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu açıldı ve referans suştan 200 µl alınarak High Pure PCR Templete Preparation Kit (Roche, 11796828001) kit protokolüne göre DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen DNA miktarı spektrofotometrik olarak Thermo, Nanodrop1000 cihazında ölçüldü ve ng/µl cinsinden konsantrasyonu elde edildi. Elde edilen DNA, 10 katlı seri sulandırılarak dilusyonları hazırlandı. Her bir dilusyona Real Time PCR analizi yapıldı. Kitin saptayabildiği en düşük DNA miktarı belirlendi.

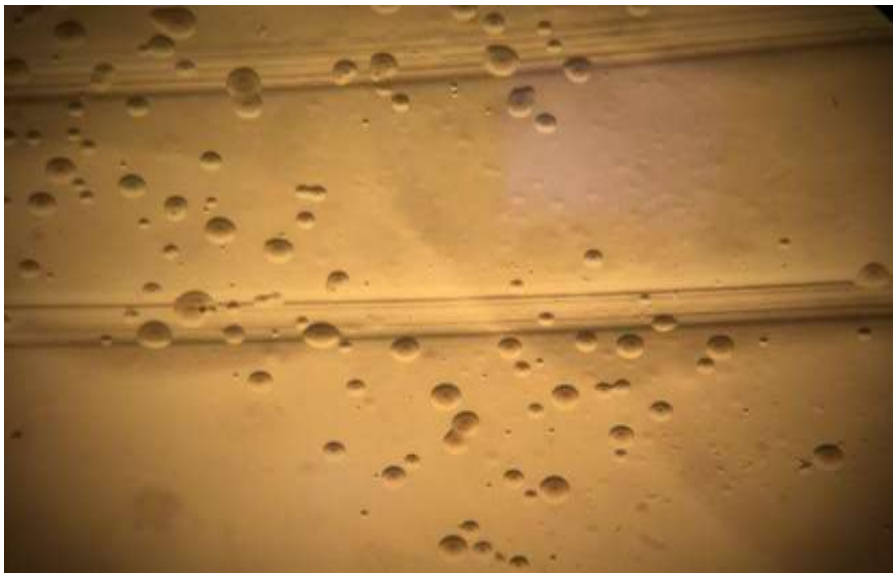
3.2.4. Seçicilik

Kullanılan Real Time PCR Kitinin seçiciliğni belirlemek üzere kanatlı mycoplasma türleriyle seçicilik çalışması yapıldı. Bu çalışmada *Mycoplasma iowae* NCTC 10185, *Mycoplasma gallisepticum* NCTC 10115, *Mycoplasma synoviae* WVU 1853, *Mycplasma meleagridis* NCTC 10153 , *Mycoplasma gallinaruim* ve *Acheloplasma laidlawii* suşları kullanıldı. Kanatlı Mycoplasmaları Besi yerinde üretilen 72 saatlik kültürlerden 200 µl alınarak High Pure PCR Templete Preparation Kit (Roche, 11796828001) protokolüne göre DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lara Real Time PCR testi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Etken İzolasyonu Sonuçları

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarına kontrol amaçlı gönderilen Türkiye genelindeki damızlık hindi işletmelerinden 100 trakeal svap havuzu ve 100 kloakal svap havuzu, türkiye genelindeki hindi kuluçkahanelerinden 96 kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurta ve Marmara bölgesindeki tavuk kuluçkahanelerinden 96 kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurtalarda Mycoplasma spp. izole edilmedi. Etken izolasyon çalışmalarında paralel çalışılan *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşunda üreme gözlendi (Resim 4-1).



Şekil 4-1: Katı kültürde *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 Referans Suşu Kolonisi

4.1.1. Biyokimyasal Yöntemlerle İdentifikasyon Sonuçları

Mycoplasma iowae NCTC 10185 referans suşu biyokimyasal olarak glikoz fermentasyonu, arginine hidrolizi ve film-spot oluşumu yönünden incelenmiştir.

Glikoz Fermentasyonu

Üreme gözlenen *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşunun 24-72 saatlik saf kültürü ile yapılan çalışmada suşunun glikoz fermentasyonunun pozitif olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4-2).

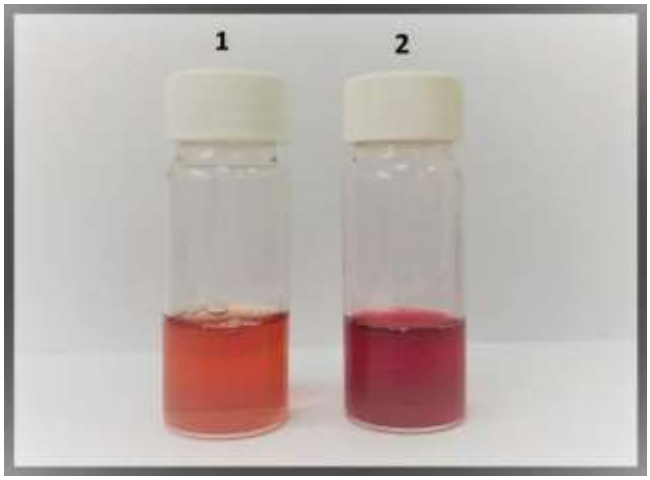


Şekil 4-2: *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 Referans Suşu Glikoz Fermantasyonu

1. Glikoz fermentasyonu pozitif *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu
2. Steril Glikoz ilaveli Kanatlı Mycoplasma Besiyeri

Arginin Hidrolizi

Üreme gözlenen *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşunun 24-72 saatlik saf kültürü ile yapılan çalışmada arginin hidrolizinin pozitif olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 Referans Suşu Arginin Hidrolizi

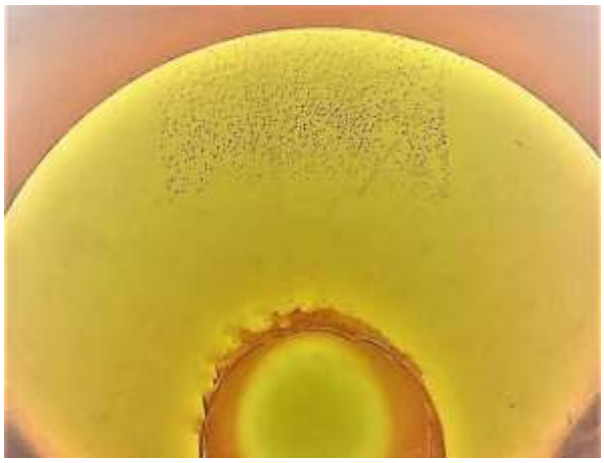
1. Steril Arginin ilaveli Kanatlı Mycoplasma Besiyeri
2. Arginin Hidrolizi pozitif *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu

Film Spot Formasyonu

Üreme gözlenen *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşunun 24-72 saatlik kültüründe yapılan incelemede referans suşunun film spot formasyonu gözlenmedi.

4.1.2. Üreme İnhibisyon Testi ile İdentifikasyon Sonuçları

Üreme gözlenen *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu ile yapılan üreme inhibisyon testinde 72 saat sonunda ekim hattında bulunan çukurun etrafında üreme inhibisyon zonu görüldü (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 Referans Suşu Üreme İnhibisyon Zonu.

4.2. Moleküler Yöntemlerle Çalışma Sonuçları

4.2.1. Minimum Tespit Limiti Çalışmasının Sonuçları

Mycoplasma iowae NCTC 10185 referans suşun ekstraksiyonu sonucunda ekstrakte edilen DNA miktarı spektrofotometrik olarak 196,5 ng/µl olarak belirlendi ve 10^{-6} 'ya kadar 10 katlı seri dilüsyonlarına uygulanan Real Time PCR sonucunda kitin minimum tespit limitinin 0,1965 ng/µl olduğu belirlendi (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suş DNA'sı Minimum Tespit Limiti Çalışma Sonuçları

Sıra	Numune İsmi	Cq	Değerlendirme	Boya
1	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	25.00	Pozitif	FAM
2	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185 10^{-1}	28.29	Pozitif	FAM
3	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185 10^{-2}	32.27	Pozitif	FAM
4	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185 10^{-3}	34.29	Pozitif	FAM
5	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185 10^{-4}	-	Negatif	FAM
6	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185 10^{-5}	-	Negatif	FAM
7	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185 10^{-6}	-	Negatif	FAM

4.2.2. Seçicilik Çalışması Sonuçları

Mycoplasma iowae NCTC 10185, *Mycplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma gallinaruim* ve *Acheloplasma laidlawii* şuslarının ekstraksiyonu sonucunda ekstrakte edilen DNA'ları ile seçicilik çalışması yapıldı. Ekstrakte edilen suşların DNA'ları ile yapılan Real Time PCR çalışmasında, *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 DNA'sında *Mycoplasma iowae* DNA'sı saptandı. Diğer suşlara ait DNA'larda ise *Mycoplasma iowae* DNA'sı saptanmadı. (Tablo 4-2) Sonuçta kullanılan kitin *Mycoplasma iowae* için spesifik bir test olduğunu doğruladı.

Tablo 4-2: Seçicilik Çalışma Sonuçları

Sıra	Numune İsmi	Cq	Değerlendirme	Boya
1	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	14.33	Pozitif	FAM
2	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	16.57	Pozitif	HEX
3	*Mycoplasma gallisepticum* NCTC 10115	-	Negatif	FAM
4	*Mycoplasma gallisepticum* NCTC 10115	17.16	Pozitif	HEX
5	*Mycoplasma synoviae* WVU 1853	-	Negatif	FAM
6	*Mycoplasma synoviae* WVU 1853	16.26	Pozitif	HEX
7	*Mycoplasma meleagridis* NCTC 10153	-	Negatif	FAM
8	*Mycoplasma meleagridis* NCTC 10153	17.22	Pozitif	HEX
9	*Mycoplasma gallinarum*	-	Negatif	FAM
10	*Mycoplasma gallinarum*	16.50	Pozitif	HEX
11	*Acheloplasma laidlawii*	-	Negatif	FAM
12	*Acheloplasma laidlawii*	16.48	Pozitif	HEX
13	Pozitif Kontrol	18.68	Pozitif	FAM
14	Pozitif Kontrol	13.70	Pozitif	HEX
15	Negatif Kontrol	-	Negatif	FAM
16	Negatif Kontrol	-	Negatif	HEX

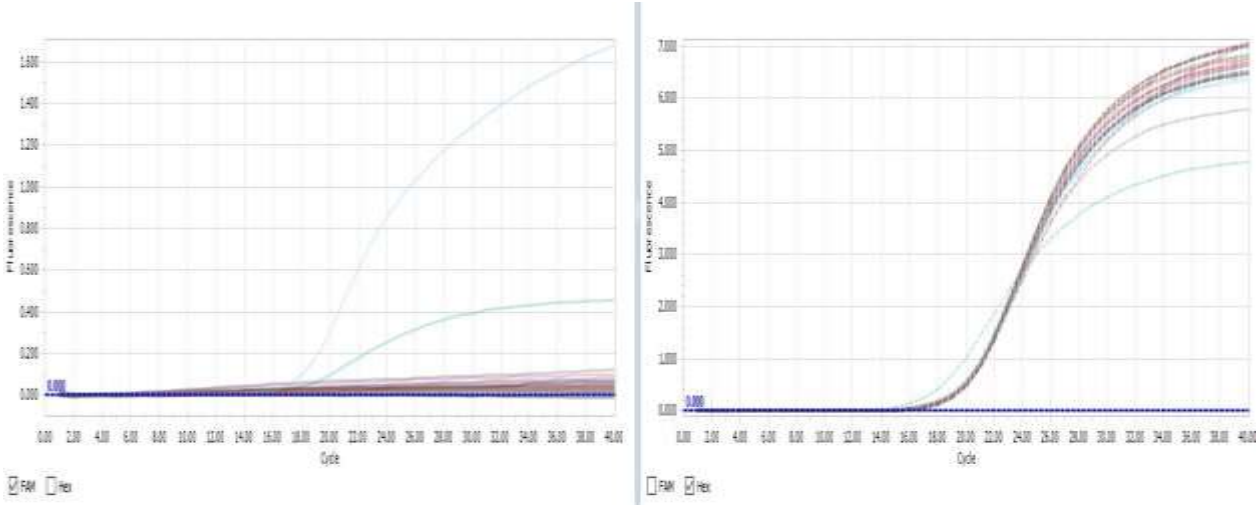
4.2.3. İnceleme Örneklerine Uygulanan Real Time PCR Bulguları

Türkiye genelindeki damızlık hindi işletmelerine ait 100 trakeal svap havuzundan elde edilen şüpheli DNA' ların Real Time PCR ile etken DNA'sı tespiti çalışması sonuçlarında pozitiflik saptanmadı.

Trakeal svap havuzlarına ait Real Time PCR çalışmasında, HEX kanalında yapılan okumada Cq değeri 37'den küçük okunarak internal kontrolün çalıştığı görüldü. FAM kanalında yapılan okumada ise Cq değeri tespit edilmedi. Trakeal svap

havuzlarında *Mycoplasma iowae* DNA'sı tespit edilmezken, pozitif kontrol pozitif, negatif kontrol ise negatif sonuç verdi. Kalite kontrol olarak ekstraksiyon aşamasından itibaren kullanılan *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu HEX kanalında yapılan okumada Cq değeri 16.39, FAM kanalında yapılan okumada ise Cq değeri 16.97 ile pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 4-3) (Şekil 4-5).

Şekil 4-5: Trakeal Svap Havuzuna ait Real Time PCR Amplifikasyon Eğrileri.



Tablo 4-3: 21 Adet Trakeal Svap Havuzuna ait Real Time PCR Amplifikasyon Sonuçları

Sıra	Numune İsmi	Cq	Değerlendirme	Boya
1	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	16.97	Pozitif	FAM
2	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	16.39	Pozitif	HEX
3	Trakael svap-1	-	Negatif	FAM
4	Trakael svap-1	16.36	Pozitif	HEX
5	Trakael svap-2	-	Negatif	FAM
6	Trakael svap-2	16.11	Pozitif	HEX
7	Trakael svap-3	-	Negatif	FAM
8	Trakael svap-3	16.35	Pozitif	HEX
9	Trakael svap-4	-	Negatif	FAM
10	Trakael svap-4	16.34	Pozitif	HEX
11	Trakael svap-5	-	Negatif	FAM
12	Trakael svap-5	15.62	Pozitif	HEX
13	Trakael svap-6	-	Negatif	FAM
14	Trakael svap-6	16.41	Pozitif	HEX
15	Trakael svap-7	-	Negatif	FAM
16	Trakael svap-7	16.34	Pozitif	HEX
17	Trakael svap-8	-	Negatif	FAM
18	Trakael svap-8	16.51	Pozitif	HEX
19	Trakael svap-9	-	Negatif	FAM
20	Trakael svap-9	16.67	Pozitif	HEX
21	Trakael svap-10	-	Negatif	FAM
22	Trakael svap-10	16.59	Pozitif	HEX
23	Trakael svap-11	-	Negatif	FAM
24	Trakael svap-11	16.53	Pozitif	HEX
25	Trakael svap-12	-	Negatif	FAM
26	Trakael svap-12	16.40	Pozitif	HEX
27	Trakael svap-13	-	Negatif	FAM
28	Trakael svap-13	16.54	Pozitif	HEX
29	Trakael svap-14	-	Negatif	FAM

30	Trakael svap-14	16.44	Pozitif	HEX
31	Trakael svap-15	-	Negatif	FAM
32	Trakael svap-15	16.39	Pozitif	HEX
33	Trakael svap-16	-	Negatif	FAM
34	Trakael svap-16	16.61	Pozitif	HEX
35	Trakael svap-17	-	Negatif	FAM
36	Trakael svap-17	16.85	Pozitif	HEX
37	Trakael svap-18	-	Negatif	FAM
38	Trakael svap-18	16.67	Pozitif	HEX
39	Trakael svap-19	-	Negatif	FAM
40	Trakael svap-19	16.77	Pozitif	HEX
41	Trakael svap-20	-	Negatif	FAM
42	Trakael svap-20	16.69	Pozitif	HEX
43	Trakael svap-21	-	Negatif	FAM
44	Trakael svap-21	16.72		HEX
45	Pozitif Kontrol	18.37	Pozitif	FAM
46	Pozitif Kontrol	14.41	Pozitif	HEX
47	Negatif Kontrol	-	Negatif	FAM
48	Negatif Kontrol	-	Negatif	HEX

Türkiye genelindeki damızlık hindi işletmelerine ait 100 kloakal svap havuzundan elde edilen şüpheli DNA' ların Real Time PCR ile etken DNA'sı tespiti çalışması sonuçlarında pozitiflik saptanmadı.

Kloakal svap havuzlarına ait Real Time PCR çalışmasında, HEX kanalında yapılan okumada Cq değeri 37'den küçük okunarak internal kontrolün çalıştığı görüldü. FAM kanalında yapılan okumada ise Cq değeri tespit edilmedi. Kloakal svap havuzlarında *Mycoplasma iowae* DNA'sı tespit edilmezken, pozitif kontrol pozitif, negatif kontrol ise negatif sonuç verdi. Kalite kontrol olarak ekstraksiyon aşamasından itibaren kullanılan *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu HEX kanalında yapılan okumada Cq değeri 16.52, FAM kanalında yapılan okumada ise Cq değeri 15.95 ile pozitif olarak değerlendirildi. (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: 21 adet Kloakal Svap Havuzuna ait Real Time PCR Amplifikasyon Sonuçları

Sıra	Numune İsmi	Cq	Değerlendirme	Boya
1	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	15.95	Pozitif	FAM
2	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	16.52	Pozitif	HEX
3	Kloakal svap-1	-	Negatif	FAM
4	Kloakal svap-1	15.54	Pozitif	HEX
5	Kloakal svap-2	-	Negatif	FAM
6	Kloakal svap-2	16.88	Pozitif	HEX
7	Kloakal svap-3	-	Negatif	FAM
8	Kloakal svap-3	15.82	Pozitif	HEX
9	Kloakal svap-4	-	Negatif	FAM
10	Kloakal svap-4	16.07	Pozitif	HEX
11	Kloakal svap-5	-	Negatif	FAM
12	Kloakal svap-5	15.80	Pozitif	HEX
13	Kloakal svap-6	-	Negatif	FAM
14	Kloakal svap-6	16.22	Pozitif	HEX
15	Kloakal svap-7	-	Negatif	FAM
16	Kloakal svap-7	16.15	Pozitif	HEX
17	Kloakal svap-8	-	Negatif	FAM
18	Kloakal svap-8	16.01	Pozitif	HEX
19	Kloakal svap-9	-	Negatif	FAM
20	Kloakal svap-9	16.11	Pozitif	HEX
21	Kloakal svap-10	-	Negatif	FAM
22	Kloakal svap-10	16.89	Pozitif	HEX
23	Kloakal svap-11	-	Negatif	FAM
24	Kloakal svap-11	16.28	Pozitif	HEX
25	Kloakal svap-12	-	Negatif	FAM
26	Kloakal svap-12	17.36	Pozitif	HEX
27	Kloakal svap-13	-	Negatif	FAM
28	Kloakal svap-13	16.61	Pozitif	HEX
29	Kloakal svap-14	-	Negatif	FAM
30	Kloakal svap-14	16.52	Pozitif	HEX
31	Kloakal svap-15	-	Negatif	FAM
32	Kloakal svap-15	16.39	Pozitif	HEX
33	Kloakal svap-16	-	Negatif	FAM
34	Kloakal svap-16	16.37	Pozitif	HEX
35	Kloakal svap-17	-	Negatif	FAM
36	Kloakal svap-17	16.77	Pozitif	HEX

37	Kloakal svap-18	-	Negatif	FAM
38	Kloakal svap-18	16.62	Pozitif	HEX
39	Kloakal svap-19	-	Negatif	FAM
40	Kloakal svap-19	16.33	Pozitif	HEX
41	Kloakal svap-20	-	Negatif	FAM
42	Kloakal svap-20	16.55	Pozitif	HEX
43	Kloakal svap-21	-	Negatif	FAM
44	Kloakal svap-21	15.85	Pozitif	HEX
45	Pozitif Kontrol	17.79	Pozitif	FAM
46	Pozitif Kontrol	14.13	Pozitif	HEX
47	Negatif Kontrol	-	Negatif	FAM
48	Negatif Kontrol	-	Negatif	HEX

Türkiye genelindeki hindi kuluçkahanelerine ait 96 kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu hindi yumurtasından elde edilen şüpheli DNA' ların Real Time PCR ile etken DNA'sı tespiti çalışması sonuçlarında pozitiflik saptanmadı.

Türkiye genelindeki hindi kuluçkahane işletmelerine ait 96 kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu hindi yumurtalarına ait Real Time PCR çalışmasında, HEX kanalında yapılan okumada Cq değeri 37'den küçük okunarak internal kontrolün çalıştığı görüldü. FAM kanalında yapılan okumada ise Cq değeri tespit edilmedi kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu hindi yumurtalarında *Mycoplasma iowae* DNA'sı tespit edilmezken, pozitif kontrol pozitif, negatif kontrol ise negatif sonuç verdi. Kalite kontrol olarak ekstraksiyon aşamasından itibaren kullanılan *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu HEX kanalında yapılan okumada Cq değeri 16.88, FAM kanalında yapılan okumada ise Cq değeri 13.80 ile pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu hindi yumurtalarına ait Real Time PCR Amplifikasyon Sonuçları

Sıra	Numune İsmi	Cq	Değerlendirme	Boya
1	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	13.80	Pozitif	FAM
2	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	16.88	Pozitif	HEX
3	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası-1	-	Negatif	FAM
4	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -1	16.50	Pozitif	HEX
5	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası **-2**	-	Negatif	FAM
6	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -2	16.47	Pozitif	HEX
7	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -3	-	Negatif	FAM
8	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -3	16.43	Pozitif	HEX
9	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -4	-	Negatif	FAM
10	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -4	16.48	Pozitif	HEX
11	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -5	-	Negatif	FAM
12	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -5	16.43	Pozitif	HEX
13	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -6	-	Negatif	FAM
14	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -6	16.50	Pozitif	HEX
15	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası **-7**	-	Negatif	FAM
16	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -7	16.40	Pozitif	HEX
17	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -8	-	Negatif	FAM
18	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -8	16.75	Pozitif	HEX
19	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -9	-	Negatif	FAM
20	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -9	16.52	Pozitif	HEX
21	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -10	-	Negatif	FAM
22	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -10	16.55	Pozitif	HEX
23	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -11	-	Negatif	FAM
24	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -11	16.48	Pozitif	HEX
25	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -12	-	Negatif	FAM
26	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -12	16.38	Pozitif	HEX
27	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -13	-	Negatif	FAM
28	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -13	16.69	Pozitif	HEX
29	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -14	-	Negatif	FAM
30	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -14	16.60	Pozitif	HEX
31	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -15	-	Negatif	FAM
32	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -15	16.62	Pozitif	HEX
33	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -16	-	Negatif	FAM
34	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -16	16.54	Pozitif	HEX
35	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -17	-	Negatif	FAM

36	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -17	16.64	Pozitif	HEX
37	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -18	-	Negatif	FAM
38	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -18	16.51	Pozitif	HEX
39	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -19	-	Negatif	FAM
40	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -19	16.58	Pozitif	HEX
41	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -20	-	Negatif	FAM
42	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -20	16.71	Pozitif	HEX
43	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -21	-	Negatif	FAM
44	Kabukaltı Embriyolu Hindi Yumurtası -21	16.75	Pozitif	HEX
45	Pozitif Kontrol	18.45	Pozitif	FAM
46	Pozitif Kontrol	14.37	Pozitif	HEX
47	Negatif Kontrol	-	Negatif	FAM
48	Negatif Kontrol	-	Negatif	HEX

Marmara Bölgesindeki tavuk kuluçkahanelerine ait 96 kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu hindi yumurtasından elde edilen şüpheli DNA' ların Real Time PCR ile etken DNA'sı tespiti çalışması sonuçlarında pozitiflik saptanmadı.

Marmara Bölgesindeki tavuk kuluçkahane işletmelerine ait 96 kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu tavuk yumurtalarına ait Real Time PCR çalışmasında, HEX kanalında yapılan okumada Cq değeri 37'den küçük okunarak internal kontrolün çalıştığı görüldü. FAM kanalında yapılan okumada ise Cq değeri tespit edilmedi kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu tavuk yumurtalarında *Mycoplasma iowae* DNA'sı tespit edilmezken, pozitif kontrol pozitif, negatif kontrol ise negatif sonuç verdi. Kalite kontrol olarak ekstraksiyon aşamasından itibaren kullanılan *Mycoplasma iowae* NCTC 10185 referans suşu HEX kanalında yapılan okumada Cq değeri 16.33, FAM kanalında yapılan okumada ise Cq değeri 16.33 ile pozitif olarak değerlendirildi. (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu tavuk yumurtalarına ait Real Time PCR Amplifikasyon Sonuçları

Sıra	Numune İsmi	Cq	Değerlendirme	Boya
1	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	14.89	Pozitif	FAM
2	*Mycoplasma iowae* NCTC 10185	16.33	Pozitif	HEX
3	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -1	-	Negatif	FAM
4	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -1	16.26	Pozitif	HEX
5	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -2	-	Negatif	FAM
6	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -2	16.21	Pozitif	HEX
7	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -3	-	Negatif	FAM
8	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -3	16.30	Pozitif	HEX
9	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -4	-	Negatif	FAM
10	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -4	15.83	Pozitif	HEX
11	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -5	-	Negatif	FAM
12	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -5	16.34	Pozitif	HEX
13	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -6	-	Negatif	FAM
14	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -6	16.23	Pozitif	HEX
15	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -7	-	Negatif	FAM
16	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -7	16.08	Pozitif	HEX
17	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -8	-	Negatif	FAM
18	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -8	16.28	Pozitif	HEX
19	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -9	-	Negatif	FAM
20	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -9	16.44	Pozitif	HEX
21	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -10	-	Negatif	FAM
22	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -10	16.32	Pozitif	HEX
23	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -11	-	Negatif	FAM
24	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -11	16.38	Pozitif	HEX
25	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -12	-	Negatif	FAM
26	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -12	16.53	Pozitif	HEX
27	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -13	-	Negatif	FAM
28	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -13	16.50	Pozitif	HEX
29	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -14	-	Negatif	FAM
30	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -14	16.67	Pozitif	HEX
31	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -15	-	Negatif	FAM
32	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -15	16.48	Pozitif	HEX
33	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -16	-	Negatif	FAM
34	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -16	11.58	Pozitif	HEX
35	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -17	-	Negatif	FAM

36	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -17	16.57	Pozitif	HEX
37	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -18	-	Negatif	FAM
38	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -18	16.63	Pozitif	HEX
39	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -19	-	Negatif	FAM
40	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -19	16.58	Pozitif	HEX
41	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -20	-	Negatif	FAM
42	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -20	16.68	Pozitif	HEX
43	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -21	-	Negatif	FAM
44	Kabukaltı Embriyolu Tavuk Yumurtası -21	16.71	Pozitif	HEX
45	Pozitif Kontrol	17.70	Pozitif	FAM
46	Pozitif Kontrol	14.61	Pozitif	HEX
47	Negatif Kontrol	-	Negatif	FAM
48	Negatif Kontrol	-	Negatif	HEX

5. TARTIŞMA

Mycoplasmalar, bir konakçıya girip kolonize olma ve aynı zamanda kanatlının bağışıklık tepkisinden kaçma yeteneklerinden dolayı başarılı bir patojen gruptur. *Mycoplasma iowae* çoğunlukla hindilerin bir patojeni olmasına rağmen, diğer evcil kümes hayvanlarında da bulunabilir.

Mycoplasma iowae, geçici bir bağışıklık bastırma durumunu tetikleyebilme yeteneğine sahiptir ve bu durum, düşük veya saptanamayan bir humoral bağışıklık tepkisine neden olarak kendisini bağışıklık sisteminden gizleme kapasitesi verir. Bu, *Mycoplasma iowae*' nın hem teşhis edilmesini hem de kontrol edilmesini zorlaştırır.

Mycoplasma iowae kanatlılar için patojen ve öncelikle embriyoya ve daha sonra nesilden nesile aynı kümes içinde aktarımının devam etmesiyle problemlere neden olur. Bu, kuluçka kabiliyetinin azalması, beklenenden daha yüksek embriyonik mortalite, gelişme geriliği ve bacak anormallikleri gibi bir dizi klinik semptoma neden olmaktadır. (Wood ve Wilson 2013).

Türkiye'de özellikle kanatlı hayvan yetiştiriciliği son yıllarda çok büyük gelişme kaydetmiştir. Bir taraftan yeni modern işletmeler açılırken diğer taraftan da işletme kapasiteleri ve entegrasyon kabiliyetlerini oldukça arttırmışlardır. Gerek damızlık ve ticari kanatlı hayvan ve kuluçkalık yumurta üremesi, gerekse ticari amaçla civciv tedarik etmesi nedeniyle, kuluçkahane ve damızlık kanatlı işletmelerinde ortaya çıkan infeksiyöz hastalıklar sadece o işletmeyi etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda yumurta ve civcivlere de bulaşarak, ticari işletmelerde de infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle zincirin birinci ve en önemli halkası olan kuluçkahane ve damızlık kanatlı işletmelerin infeksiyöz hastalıklar yönünden kontrolü büyük önem arz etmektedir.

Türkiyede artan üretim ve işletme kapasitesi nedeniyle kanatlı hayvan sağlığını tehtit eden mikroorganizmalara karşı kontrol programı oluşturulmuş ve 20.03.2007 tarihli ve 26468 sayılı Resmi Gazete"de yayımlanan Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği kapsamında söz konusu işletmelerin kontrolleri gerçekleştirilmeye başlanmıştır.

Söz konusu yönetmelik ve uygulama talimatı kapsamında Kuluçkahane ve Damızlık işletmelerinde *Mycoplasma gallisepticım* ve *Mycoplasma synoviae,* hindi

işletmelerinde ise ilave olarak *Mycoplasma meleagridis*'in kontrolü yapılılırken, günümüzde *Mycoplasma synoviae*'nın söz konusu işletmelerde kontrolü kaldırılmıştır.

2007 yılından günümüze söz konusu yönetmelik ve uygulama talimatında bir takım değişiklikler yapılmıştır. Bu değişikliklerden en önemlisi, infekte damızlık sürüden elde edilen yumurtaların, bu sürü damızlıktan çıkarılıncaya kadar, egg-deeping uygulayarak yumurtaların kullanımına izin verilmişti. Ancak ilerleyen süreçte bu uygulamanın hastalıkla mücadelede etkin bir yol olmadığına karar verilmiş, uygulama kaldırılmış ve Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği değiştirlerek 16.01.2014 tarih ve 28884 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanmıştır. İlgili yönetmelik ve uygulama talimatı kapsamında, kanatlı mycoplasma türlerinin işletmelerden elimine edilmesinin güçlüğü nedeniyle, günümüzde söz konusu işletmelerde *Mycoplasma gallisepticum* veya *Mycoplasma meleagridis'*in bakteriyolojik veya moleküler yöntemlerle tespit edilmesi halinde işletmelerde bulunan damızlık kanatlılar ve/veya damızlık yumurtalar itlaf edilerek etkenle mücadele yoluna başlanmıştır.

Bu etkenlerin yanı sıra Kanatlı Mycoplasmalarının dört patojen türünden biri olan *Mycoplasma iowae*, hindi sürülerinde yaygın olarak görülmesinin yanı sıra tavuklarda ve serbest uçan birçok kuştan da izole edilmiştir.

Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatının (OIE) 2019 yılı bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde Kanatlı Mycoplasmaları başlığı altında *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae* bulunmasının yanı sıra kümes hayvanlarında hastalığa neden olabilen *Mycoplasma meleagridis* ve *Mycoplasma iowae*'ya da dikkat çekilmektedir.

Mycoplasma iowae'nin bazı damızlık hindi sürülerinde yok edilmesiyle kontrolünün sağlandığı (Al-Ankari ve Bradbury 1996; Bradbury ve Kleven 2003), ancak *Mycoplasma iowae*'nin ABD ulusal kümes hayvanları iyileştirme planına dahil edilmediği bildirilmiştir (Ley ve ark. 2010).

Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı'nin 2019 yılı Ulusal Kümes Hayvanları İyileştirme Planı (National Poultry Improvement Plan) çerçevesinde kuluçkahane ve damzılık işletmelerinde *Mycoplasma syvoviae, Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma meleagridis*'in düzenli kontrolleri yapılmaktadır.

Bunun yanı sıra Amerika Birleşik Devletleri Hayvan Sağlığı Derneği Komitesinin kümes hayvanları ve diğer kuş türlerinin bulaşıcı hastalıkları ile ilgili yayınladıkları 2012

ve 2013 yılları raporlarında, laboratuvarlarda pozitif *Mycoplasma iowae* infeksiyonu vakalarının artmasına bağlı olarak insidansın arttığı belirtilmiş, bu nedenle *Mycoplasma iowae* ticari hindi popülasyonunu etkileyen hastalıklardan biri olarak derecelendirilerek listeye eklenmiştir. (Committee on Poultry and Other Avian Species, 2012, 2013).

Hindilerde kuluçka veriminde azalma ve embriyolardaki lezyonlar *Mycoplasma iowae* için spesifik belirtiler olmayıp hastalığın doğrulanabilmesi için laboratuvar analizi şarttır (Al-Ankari ve Bradbury 1996). Diğer birçok Mycoplasma türünde olduğu gibi *Mycoplasma iowaea* için de altın standart izolasyondur. Fakültatif anaerobdur ve üremek için karbondioksite ihtiyaç duyar. Serumlu zenginleştirilmiş standart Mycoplasma besiyerinde üremekte, ancak besi yerine ilave edilecek olan maya ekstraktının taze olmasının başarılı bir izolasyon için önemli olduğu belirtilmektedir (Bradbury 1977; Al-Ankari ve Bradbury 1996; Miles ve Nicholas 1998). *Mycoplasma iowae*'nın 37 ° C'de 2 ila 3 gün inkübasyondan sonra üreyebildiği, ancak özellikle birincil izolasyonda bu sürenin uzadığı hatta bazen bir koloni tespit edilmesi 2-3 haftayı bulabildiği belirtilmiştir (Boyle ve ark. 1995; Al-Ankari ve Bradbury 1996).

Etkenin ölü embriyolar ve ekstra embriyonik sıvılarda, kloakada, trakeada ve hava keselerinde yüksek miktarlarda bulunabildiği bildirilmiştir (Mc Clenaghan ve ark. 1981; Bradbury ve Mccarthy 1983; Grant 1987; Brown ve ark. 2018a). Bu çalışmada damızlık işletmelerinden aynı kanatlılara ait trakeal ve kloakal svaplar ile kuluçkahanelerinden ise kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumutalara ait ekstra embriyonal sıvılar, trakeal ve hava keselerini içeren homojenatlar kullanılarak etken izolasyonu ve/veya etken DNA'sı tespitini en üst düzeye çıkartabilmek amaçlanmış ve bu doğrultuda örnekler kullanılmıştır. Ancak toplanan örneklerin hiçbirinden *Mycoplasma iowae* izole edilmemiştir.

Mycoplasma iowae'nin yumurta kanalındaki yumurtaların enfeksiyonu ile vertikal bulaşması, en önemli yayılma şekli olduğu ve bu durumun işletmelerde, kalıcı enfeksiyonların sürdürülme yolu olduğu ileri sürülmüştür (Jordan 1996). Kuluçkahane içinde ve civciv döneminde horizontal yayılma mümkün olduğu ancak daha az önemli bir enfeksiyon bulaş yolu olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Burch ve Valks 2003). Bu çalışmada ülke genelindeki hindi damızlık işletmeleri ve kuluçkahaneleri ile Marmara bölgesindeki tavuk kuluçkahanelerinden örnekleme yapılarak etkenin muhtemel geçiş

yollarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ancak toplanan örneklerin hiçbirinden *Mycoplasma iowae* izole edilmemiştir.

Mycoplasma iowae izolasyonunda besiyerinin kalitesinin önemli olduğu, etkenin serumlu zenginleştirilmiş standart mycoplasma besiyerinde ürediği bildirilmiştir (Bradbury 1977). Araştırıcılar serumun kalitesinin, özellikle taze maya ekstraktının varlığının ve kalitesinin başarılı bir izolasyon için önemli olduğunu vurgulamışlardır (Al-Ankari ve Bradbury 1996; Miles ve Nicholas 1998) Bu çalışmada, etken izolasyonu amacıyla standart kanatlı mycoplasma besiyerine taze maya ilavesi yapılarak hazırlanan besiyerlerine ekimler gerçekleştirilmiştir. İlk ekimlerde üremenin geç olabileceği ihtimaline karşın izolasyonun, 3 pasaj ve inkubasyon 21 gün sürecek şekilde yapılarak etkenin izolasyon şansının yükseltilmesi amaçlanmıştır.

Garcia ve ark. (1997) tarafindan yapilan çalışmada *Mycoplasma iowae* izolasyonunun, PCR ile kıyasla, hassasiyetinin daha yüksek olduğu bunun muhtemel sebebinin ise kabukalltı ölümü gerçekleşmiş embriyolardaki etken miktarının az olması ve bu sebeple PCR tespit limitinin bu miktari tespit edecek seviyede olmadığı ayrıca PCR inhibitörlerinin de yalancı negatifliğe neden olabileceği ileri sürülmüştür.

Mycolasma iowae saçılım miktarının değişken olabildiği ve bu kanatlıların tespit edilmesinin zor olduğu bildirilmiştir (Cai ve ark. 2008). Bu durumun aralıklı veya değişken miktardaki etken saçımı nedeniyle etkenin ve/veya DNA'sının tespit edilmesini zor olduğu bildirilmiştir (Wood ve Wilson 2013). Bu çalışmada inceleme örneklerinden hem izolasyon hemde direkt Real Time PCR çalışılarak etkenin olası varlığında tespitinin en üst düzeyede olması amaçlanmıştır. Ancak alınan örneklerde izolasyon ve direkt Real Time PCR ile etken saptanmamıştır.

Konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle *Mycoplasma iowae*'nin izolasyon ve identifikasyonunun altın standart test olmasına karşın, birçok araştırıcı tarafından çeşitli moleküler yöntemler kullanılarak etkenin direkt klinik materyalden kısa süre identifiye edilecileceğini ortaya koymuşlardır. (Garcia ve ark. 1996; Hugh ve ark. 2008; Raviv ve Kleven 2008; Rebelo ve ark. 2011; Öngör ve ark. 2009; Ghanem ve El-Gazzar 2016)

Wood ve Wilson (2013) tarafından konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle *Mycoplasma iowae* izolasyonun uygulanabilir önemli bir tanı yöntemi ve moleküler

yöntemlere kıyasla daha az maliyetli olduğu ancak izolasyon duyarlılığının PCR ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük düzeyde olduğunu ifade edilmiştir.

Bir çok araştırıcı moleküler çalışmaların birinci basmağı olan DNA ekstraksiyonunun yöntemin doğru ve güvenilir sonuç verilebilmesi açısından bir çalışma planının en önemli halkalarından biri olduğunu vurgulamıştır (Leng ve ark. 1994; Garcia ve ark. 1997).

Yapılan çalışmalarda, yalancı negatifliğin en olası nedeninin, ekstrakte edilen DNA'daki PCR inhibe edici maddeler olduğu bildirilmektedir. (Leng ve ark. 1994) Yine deneysel olarak enfekte edilmiş hindi embriyolarından alınan inceleme örneklerinden, Proteinase K ilaveli ekstraksiyon yöntemiyle DNA ekstraksiyonun ile geleneksel kaynatma yöntemiyle yapılan DNA ekstraksiyonunun karşılaştırıldığı çalışmada, Proteinase K ekstraksiyon yönteminin, *Mycoplasma iowae* DNA tespitinde daha etkili olduğunu ve bunun muhtemel amplifikasyon reaksiyonuna müdahale eden maddelerin ortadan kaldırılması veya inaktive edilmesi olabileceği kanaatine varıldığı bildirilmiştir (Garcia ve ark. 1997). Bu çalışmada da Garcia ve ark. (1997) tarafından önerildiği üzere, özellikle kontaminant varlığı çok olan kloakal svap başta olmak üzere, trakeal svap ve kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurtalardan hazırlanan homojenatların DNA ekstraksiyonları Proteinase K aşaması bulunan kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiş ve olası negatif amplifikasyon reaksiyonların önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Hugh ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada 16S rRNA genini hedefleyen primerler ve problar kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR) geliştirilmiştir. Hindi kloakal svap örnekleri ile yapılan saha çalışmasında, Real Time PCR'nin tanısal duyarlılığının % 97,6 ve özgüllüğü ise % 95,5 olduğu bildirilmiş ve bu yöntemin *Mycoplasma iowae*'yi tespit etmek için etken izolasyonuna göre hızlı, duyarlı ve uygun maliyetli bir alternatift olabileceği ifade edilmiştir.

Dört patojenik kanatlı mycoplasmasının moleküler teşhisine yönelik seçilen genomik hedefleri türe özgü olduğu ve bu amaçla seçilen; intraspesifik olarak *Mycoplasma synoviae* ve *Mycoplasma meleagridis*'in 16S-23S intergenik aralayıcı bölgesini, *Mycoplama iowae*'nın 16S ribozomal DNA'sı ve MG'nin mgc2 geninin yüksek oranda korunmuş bölgelerini içeren gerçek zamanlı TaqMan PCR'nın geliştirildiği ve oldukça yüksek özgüllüğü ve duyarlılığı ile bu patojenlerin teşhisinde uygulanabilir olduğu bildirilmiştir (Raviv ve Kleven 2008).

Bu çalışmada ise %100 özgüllük ve % 98 duyarlılık değerlerine sahip valide ticari bir kit kullanmışıtr. Kitin yapılan seçicilik çalışmasına dördü kanatlı patojeni olmak üzere, 5 farklı Mycoplasma türü ve *Acheloplasma laidlawii* ile çalışılmış ancak herhangi bir çapraz reaksiyon oluşmadığı görülmüştür. Çalışılan klaokal svaplar, trakeal svaplar ve kabukaltı ölümü gerçekleşmiş embriyolu yumurtalardan hazırlanan homojenatlarıdan direk Real Time PCR ile etken tespiti çalışması yapılmış ancak hiçbir örnekte etken DNA'sı tespit edilmemiştir.

Öngör ve ark. (2009) tarafından Türkiye'deki ticari hindi işletmelerine ait 23 kümesten toplam 624 trakeal svap örneğinde kanatlı mycoplasmalarını inceledikleri çalışmada, 7 kümese ait toplam 20 adet trakeal svap örneğinde *Mycoplasma iowae* DNA'sı tespit edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ülkemiz damızlık ve kuluçkahanelerde etken varlığı ve/veya DNA'sının tespit edilmemiş olması nedeniyle etkenin ticari işletmelere bulaşma yolunun horizontal yolla olduğu düşünülmüştür.

Wood ve Wilson (2013) *Mycoplasma iowae* infeksiyonunun tespit edilmesi ve yayılmasıyla ilişkili risk yönetiminin, hızlı teşhis, tedavi, hijyen, biyogüvenlik ve risk değerlendirmesi gibi bir dizi uygulama içerdiğini bildirmişlerdir. *Mycoplasma iowae*'nın ticari sürülerde kontrolünün, temel olarak *Mycoplasma iowae* içermeyen sürülerden sağlanması ve uygun biyogüvenlik seviyelerinin sürdürülmesi yoluyla gerçekleştirilebileceğini vurgulamışlardır. Ülkemizde damızlık ve kuluçkahane işletmelerinde düzenli kontrol programları uygulanmakta ve yüksek biyogüvenlik tedbirleri güncellenmektedir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma sonucunda *Mycoplasma iowae* infeksiyonunun ülkemiz damızlık ve kuluçkahaneleri için uygulanan kontroller ve biyogüvenlik çalışmaları ile risk oluşturmadığı ve alınan bu önlemler sayesinde işletmelerinin sahada saptanmış olan infeksiyonun kaynağı olmadığı sonucuna varılmıştır.

Mycoplasma iowae'nın hindi damızlık ve kuluçkahane işletmelerinde izole edilmemesi ülkemiz hayvancılığı açısında çok olumlu bir sonuç olmasına rağmen, bu sonucun sürdürülebilir olması için söz konusu işletmelerde etkenin düzenli kontrolünün yapılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

Al-Ankari A.S. ve Bradbury J.M, (1996). *Mycoplasma iowae*: A review. Avian Pathology, 25, 205-229.

Amin, M.M. (1977). Avian mycoplasma: studies on isolation, infection and control. PhD Thesis, University of Liverpool.

Amin M.M. ve Jordan, F.T.W. (1978). A comparative study of some cultural methods in the isolation of avian mycoplasma from field material. Avian Pathology 7: 455-470.

Atkin, C.L., Wei, S. ve Cole, B.C. (1994). The *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM: purification and identification of an avtive peptide. Infection and immunity, 62(12), 5367-5375.

Barber, T.L. ve Fabricant, J. (1971). Identification of Mycoplasmatales: procedures for both characterization and purification. Applied Microbiology, 21, 594-599.

Baseman, J.B. ve Tully, J.G. (1997). Mycoplasma: sophisticated, reemerging and burdened by their notoriety. Emerging infectious disease, 3(1),21.

Baxter-Jones, C. (1991). Egg hygiene: microbial contamination, significance and control, in: S.G. Tullet (Ed) Avian Incubation, Vol. 22, 269-276 (Poultry Science Symposium Series, Butterworth-Heinemann, London).

Baxter-Jones, C. (1993). An introduction to *Mycoplasma iowae*, in: Newly Emerging and Re-emerging Avian Diseases: applied research and practical applications for diagnosis and control, pp. 9-11 (American Association of Avian Pathologists, Minneapolis, USA).

Benčina, D., Dorrer, D. ve Tadina, T. (1987a). Mycoplasma species isolated from six avian species. Avian Pathology, 16, 653-664.

Benčina, D., Mrzel, I., Tadina, T. ve Dorrer, D. (1987b). Mycoplasma species in chicken flocks with different management systems. Avian Pathology, 16, 599-608.

Boyle, J.S., Good, R.T. ve Morrow, C.J. (1995). Detection of the turkey pathogens *M. meleagridis* and *Mycoplasma iowae* by amplification of genes coding for rRNA. Journal of Clinical Microbiology, 33, 1335-1338.

Bozeman, L.H., Kleven, S.H. ve Davis, R.B. (1984). Mycoplasma challenge studies in budgerigars (Melopsitticus undulatus) and chickens. Avian Diseases, 28, 426-434.

Bradbury, J.M. (1977). Rapid biochemical tests for characterization of the Mycoplasmatales. Journal of Clinical Microbiology, 5, 531-534.

Bradbury, J.M. (1982). The use of chicken antiserum for the identification of avian mycoplasmas by indirect immunofluorescence. Avian Pathology, 11, 113-121.

Bradbury, J.M. (1983). *Mycoplasma iowae*—an avian Mycoplasma with unusual properties. Yale Journal of Biology and Medicine, 56, 912.

Bradbury, J.M. (1984a). Effect of *Mycoplasma iowae* infection on the immune system of the young turkey. Israel Journal of Medical Sciences, 20, 985-988.

Bradbury, J.M. (1984b). *Mycoplasma iowae* infection in turkeys. Turkeys, 32, 24-26.

Bradbury, J.M. ve Mccarthy, J. (1981). Rupture of the digital flexor tendons of chickens after infection with *Mycoplasma iowae*. Veterinary Record, 109, 428-429.

Bradbury, J.M. ve Ideris, A. (1982). Abnormalities in turkey poults following infection with *Mycoplasma iowae*. Veterinary Record, 110, 559-560.

Bradbury, J.M. ve Mccarthy, J.D. (1983). Pathogenicity of *Mycoplasma iowae* for chick embryos. Avian Pathology, 12, 483-496.

Bradbury, J.M. ve Mccarthy, J.D. (1984). *Mycoplasma iowae* infection in chicks. Avian Pathology, 13, 529-543.

Bradbury J.M. ve Morrow C. (2008). Poultry Diseases 6th Edition Avian Mycoplasmas Chapter 20, 221.

Bradbury, J.M., Ideris, A. ve Oo, T.T. (1988). *Mycoplasma iowae* infection in young turkeys. Avian Pathology, 17, 149-171.

Bradbury, J.M., Grant, M., Baxter-Jones, C. ve Wilding, G.P. (1990). *Mycoplasma iowae*: the current situation. Proceedings of the 39th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, pp. 49-50.

Bradbury, J.M. ve Kelly, D.F. (1991). *Mycoplasma iowae* infection in broiler breeders. Avian Pathology, 20, 67-78.

Bradbury, J.M., Al-Ankari A., Yavari C.A., Baxter-Jones, C. ve Wilding, G.P. (1992). Comparison of *Mycoplasma iowae* field strains by restriction endonuclease analysis. IOM Letters, vol. 2, Abstracts of the 9th International Congress of the International Organization for Mycoplasmology, August 1992, Ames, Iowa, USA. 154.

Bradbury, J.M. (1999). Blood testing for mycoplasmas. International Hatchery Practice 13: 15-17.

Bradbury, J.M. (2001). Avian mycoplasmas. In Poultry diseases (F. Jordan, M. Pattıson, D. Alexander & T. Faragher, eds). W.B. Saunders, London, 178-193.

Bradbury J.M. ve Kleven, S.H. (2003). *Mycoplasma iowae* infection, in: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Mcgougald, L.R. ve Swayne D.E. (Eds) Diseases of Poultry, 11th ed., 766-771.

Bradbury, J.M. (2005). Poultry Mycoplasmas: Sophisticated pathogens in simple guise. British Poultry Science 46: 125-136.

Brown, D.R. (2018). Tenericutes. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Erişim Tarihi: 01.02.2021 https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.pbm00025.pub2

Brown, D.R., May, M, Bradbury, J.M, Balish, M.F, Calcutt, M.J, Glass, J.I, Tasker, S, Messick, J.B, Johansson, K.E. ve Neimark, H. (2018a). Mycoplasma. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Erişim Tarihi: 01.02.2021 https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm01263.pub2

Brown, D.R., May M., Bradbury, J.M. ve Johansson, KE. (2018b). Mollicutes. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Erişim Tarihi: 01.02.2021 https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.cbm00048.pub2

Burch, D. ve Valks, M. (2003). Treating and controlling mycoplasma infections. World Poultry 19: 10-12.

Cai, H.Y., Bell-Rogers, P., Parker, L., Ferencz, A. ve Pozder, P. (2008). Development and field validation of a *Mycoplasma iowae* real-time polymerase chain reaction assay. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20: 230-235.

Christensen, N.H., Yavari, C.A., Mcbain, A.J. ve Bradbury, J.M. (1994). Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. Avian Pathology, 23, 127-143.

Collier, A.M. ve Clyde, W.A. (1971). Relationships between *Mycoplasma pneumoniae* and human respiratory epithelium. Infection and Immunity, 3, 694-701.

Committee on Poultry and Other Avian Species (2012). Report of The Committee on Transmissible Diseases of Poultry and Other Avian Species. Erişim Tarihi: 18.02.2021 https://www.usaha.org/upload/Committee/TransDisPoultry/report-pad-2012.pdf

Committee on Poultry and Other Avian Species (2013). Report of The Committee on Transmissible Diseases Of Poultry And Other Avian Species. Erişim Tarihi: 18.02.2021 https://www.usaha.org/upload/Committee/TransDisPoultry/report-pad-2013.pdf

Cummins, D.R. ve Reynolds, D.L. (1990). Use of an avidin-biotin enhanced dot-immunobinding assay to detect antibodies for avian Mycoplasma in sera from Iowa market turkeys. Avian Diseases, 34, 321-328.

Dierks, R.E., Newman, J.A. ve Pomeroy, B.S. (1967). Characterization of avian mycoplasma. Annals of the New York Academy of Sciences, 143, 170-189.

Fabricant, J. (1970). Occurrence, characteristics and potential pathogenicity of serotype I avian mycoplasma. Journal of the American Veterinary Medical Association, 156, 1269, Abstracts of the 107th AVMA Meeting, 1970.

Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. VE Dworkin, M. (2006). The Prokaryotes (3rd ed., Vol. 4). New York: Springer.

Fan H.H., Kleven, S.H., Jackwood M.W., Johansson, K.E., Pettersson, B. ve Levisohn, S. (1995). Species identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Diseases, 39, 398-407.

Gaillard- Perrin, G., Andral, B. ve Marter, I. (1985). Isolement et identification de *Mycoplasma iowae* chez la dinde. Deux examples. Bulletin de l'Academie Veterinaire de France, 58, 267-272.

Gallagher, J.E. ve Rhoades, K.R. (1983). Scanning electron and light microscopy of selected avian strains of *Mycoplasma iowae*. Avian Diseases, 27, 211-217.

Garcia, M., Jackwood, M.W., Levisohn, S. ve Kleven, S.H. (1995). Detection of *Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae* and *Mycoplasma iowae* by multi-species PCR and restriction fragment length polymorphism Avian Diseases, 39, 606-616.

Garcia, M., Jackwood, M.W., Head, M., Levisohn, S. ve Kleven S.H. (1996). Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* PCR amplification products. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 8, 56-63.

Garcia, M., Gerchman, I., Meir, R., Jackwood, M.W, Kleven S. H. ve Levısohn S. (1997). Detection of *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma iowae* from dead-in-shell turkey embryos by polymerase chain reaction and culture. Avian Pathology Vol. 26, Iss. 4, 765-778.)

Gardella, R.S. ve Delguidice, R.A. (1983). Optimal temperature and atmospheric conditions for growth, in: S. Razin, J.G. Tully (Eds) Methods in Mycoplasmology, Vol. 1, pp. 211-215 (New York, Academic Press).

Gautier-Bouchardon A.V., Reinhardt, A.K., Kobisch, M. ve Kempf, I. (2002). In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae,* Veterinary Microbiology 88 47–58.

Ghanem, M. ve El-Gazzar, M. (2016). Development of Multilocus Sequence Typing (MLST) assay for *Mycoplasma iowae*. Veterinary Microbiology, Volume 195, 2-8.

Grant, M. (1987). Significance, epidemiology and control methods of *Mycoplasma iowae* in turkeys. PhD thesis, Council for National Academic Awards.

Grau O., Laigret F., Carle, P., Tully, J.G., Rose, D.L. ve BovÉ, J.M. (1991). Identification of a plant-derived mollicute as a strain of an avian pathogen, *Mycoplasma iowae*, and its implications for mollicute taxonomy. International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 473-478.

Hirsh, D.C., MacLachan, N.J. ve Walker, R.L. (2004). Veterinary Microbiology (2nd ed.) Iowa:Blacwell.

Hugh, Y., Bell-Rogers C.P., Parker, L, Ferencz, A. ve Pozder, P. (2008). Development and field validation of a *Mycoplasma iowae* real-time polymerase chain reaction assay, J Vet Diagn Invest 20:230–235.

İzgür, M. ve Akan, M. (2002). Kanatlı Hayvan Hastalıkları.Medisan Yayın Serisi-50, sf, 89-92.

Jordan, F.T.W. ve Amin, M.M. (1980). A survey of mycoplasma infections in domestic poultry. Research in Veterinary Science, 28, 96-100.

Jordan, F.T.W. (1985). People, poultry and pathogenic mycoplasmas. British Poultry Science, 26, 1-15.

Jordan, F.T.W. (1990). Avian Mycoplasmoses, in: F.T.W. Jordan (Ed.) Poultry Diseases, 3rd edn, pp. 74-85 (London, Bailliere Tindall).

Jordan, F.T.W., ERNø, H., Cottew, G.S, Hinz, K.H. ve Stipkovits, L. (1982). Characterization and taxonomic description of five mycoplasma serovars (serotypes)

of avian origin and their elevation to species rank and further evaluation of the taxonomic status of *Mycoplasma synoviae*. International Journal of Systematic Bacteriology, 32, 108-115.

Jordan, F.T.W., Yavari, C. ve Knight, D. (1987). Some observations on the indirect ELISA for antibodies to *Mycoplasma iowae* serovar in sera from turkeys considered to be free from mycoplasma infections. Avian Pathology, 16, 307-318.

Jordan, F.T.W., Gilbert, S., Knight, D.L. ve Yavari, C.A. (1989). Effect of Baytril, Tylosin and Tiamulin on avian mycoplasmas. Avian Pathology, 18, 659-673.

Jordan, F.T.W., Horrocks, B.K. ve Jones, S.K. (1991). A comparison of Baytril, Tylosin and Tiamulin in the control of *Mycoplasma iowae* infection of turkey poults. Avian Pathology, 20, 283-289.

Jordan, F.T.W., Horrocks, B.K., Jones, S.K. ve Clee, C.M. (1992). The production of *Mycoplasma iowae* infection of turkey poults suitable for monitoring antimicrobials. Avian Pathology 21:307-313.

Jordan, F.T.W., Horrocks, B.K. ve Froyman, R. (1993). A model for testing the efficacy of enrofloxacin (Baytril) administered to turkey hens in the control of *Mycoplasma iowae* infection in eggs and embryos. Avian Diseases, 37, 1057-1061.

Jordan, F.T.W. (1996). Avian Mycoplasmosis, in: Jordan, F.T.W. ve Pattison, M. (Eds) Poultry Diseases, 4th ed. 81-93 (London: W. B. Saunders Company).

Kannan, T.R. ve Baseman, J.B. (2006). ADP-ribosylatin and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumonia* represent unique virulence determinant among bacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Science, 103(17), 6724-6729

Kempf, I., Guittet, M., Le Gros, F.X., Toquin, D. ve Bennejean, G. (1989a). *Mycoplasma iowae*: field and laboratory studies to evaluate egg transmission in turkeys. Avian Pathology, 18, 299-305.

Kempf, I., Ollivier, C., L'hospitalier, R., Guittet, M. ve Bennejean, G. (1989b). Concentrations minimales inhibitrices de 13 antibiotiques vis-à-vis de 21 souches de mycoplasmes des vollailles. Le Point Vétérinaire, 20, 935-940.

Kempf, I., Blanchard, A., Gesbert, F., Guittet, M. ve Bennejean, G. (1994). Comparison of antigenic and pathogenic properties of *Mycoplasma iowae* strains and development of a PCR-based detection assay. Research in Veterinary Science, 56, 179-185.

Kleven, S.H. (1991). *Mycoplasma iowae* infection, in: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid, H.W. Yoder JR (Eds) Diseases of Poultry, 9th edn, pp. 231-235 (Ames, Iowa State University Press).

Kleven, S.H. (2008). Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. Avian Diseases 52: 367- 374.

Laigret, F., Deaville, J., Bové, J.M. ve Bradbury, J.M. (1996). Specific detection of *Mycoplasma iowae* using polymerase chain reaction. Molecular and Cellular Probes, 10, 23-29.

Lam, K.M. (2005). Chemotaxis in *Mycoplasma gallisepticm*. Avian disease, 49(1)152-154.

Leng, Z., Kenny, G.E. ve Roberts, M.C. (1994). Evaluation of the detection limits of PCR for identification of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. Molecular and Cellular Probes, Volume 8, Issue 2, Pages 125-130.

Levisohn, S., Berman, E. ve Weisman, Y. (1992). Minimal inhibitory concentrations of tylosin and enrofloxacin in *Mycoplasma iowae* and *M. meleagridis* isolates from turkeys in Israel. IOM Letters, Vol. 2, Abstracts of the 9th International Congress of the International Organisation for Mycoplasmology, August 1992, Ames, Iowa, USA, p. 310.

Levisohn, S., Jackwood, M.W. ve Kleven, S.H. (1995a). New approaches for detection of *Mycoplasma iowae* infection in turkeys. Final Report, US-Israel Binational Agricultural Research and Development Project IS-1852-90, Bet Dagan, Israel.

Levisohn, S., Gerchman, E., MEIR, R., Garcia, M. ve Jackwood, M.W. (1995b). The use of a multi-species polymerase chain reaction test for diagnosis of pathogenic mycoplasmas in clinical samples. Proceedings of the 44th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, pp. 42-43.

Ley, D.H., Marusak R.A., Vivas, E.J., Barnes, H.J. ve Fletcher, O,J. (2010). *Mycoplasma iowae* associated with chondrodystrophy in commercial turkeys. Avian Pathology 39(2), 87_93.

Mcclenaghan, M., Bradbury, J.M. ve Howse, J.N. (1981). Embryo mortality associated with avian mycoplasma serotype I. Veterinary Record, 108, 459-460.

Miles, R.J. (1992a). Catabolism in Mollicutes. J Gen Microbiol 138: 1773–1783.

Miles, R.J. (1992b). Cell nutrition and growth. Mycoplasmas:Molecular Biology and Pathogenesis. Maniloff J, McElhaney R, Finch L, Baseman J. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 23–40.

Miles, R. ve Nicholas, R. (1998). Mycoplasma Protocols. Totowa, N.J.:Humana Press.

Mirsalimi, S.M., Rosendal, S. ve Julian, R.J. (1989). Colonization of the intestine of turkey embryos exposed to *Mycoplasma iowae*. Avian Diseases, 33, 310-315.

Mohan, K. (1992). *Mycoplasma spp*. from poultry (Gallus gallus) in Zimbabwe. IOM Letters, Vol. 2, Abstracts of the 9th International Congress of the International Organisation for Mycoplasmology, Ames, Iowa, USA. p. 155.

Neimark, H.C. (1979). Phylogenetic relationships between mycoplasmas and other prokaryotes. In The Mycoplasmas, vol. 1, MF Barile & S Razin (eds). Academic Press, New York; 43–61.

Nicholas, R., Ayling, R. ve McAuliffe, L. (2008). Mycoplasma Disease of Ruminants. Wallingford, UK:CABI.

O.I.E. (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 3.3.5. Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplsma synoviae*). Erişim Tarihi: 10.06.2020. World Organization for Animal Health: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf

O.I.E. (2019). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. Erişim tarihi: 19.02.2021. World Organization for Animal Health:https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/

Öngör, H., Kalın, R., Karahan, M., Çetinkaya, B. ve Akan, M. (2009). Detection of mycoplasma species in turkeys by culture and polymerase chain reaction. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2009, 28 (3), 1103-1109.

Prasad, A.K. ve Kumar, S. (1975). Serological grouping of Mycoplasma isolated from respiratory tract of poultry in India. Indian Journal of Animal Science, 45, 784-786.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.S. Fitzpatrick, E.S., Fanning, s. ve Hartigan, P.J. (2011). Veterinary Microbiology Disese (2nd ed.) West Sussex: Blackwell.

Rathore, B.S., Mohanty, G.C. ve Rajya, B.S. (1979). Isolation of mycoplasma from oviducts of chickens and their pathogenicity. Indian Journal of Microbiology, 19, 192-197.

Ramirez, S.A., Dare, C., Yavari, C.A. ve Bradbury J.M. (2012). A diagnostic polymerase chain reaction for *Mycoplasma iowae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. Avian Pathology (June 2012) 41(3), 317_322.

Razin , S. ve Herrman, R. (2002). Moleculer Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Raviv, Z. ve Kleven, S.H. (2008). The Development of Diagnostic Real-Time TaqMan PCRs for the Four Pathogenic Avian Mycoplasmas. Avian Diseases 53:103-107.

Rebelo, A.R., Parker, L. ve Cai, H.Y. (2011). Use of high-resolution melting curve analysis to identify Mycoplasma species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 23(5) 932–936.

Rhoades, K.R. (1981). Pathogenicity of strains of the IJKNQR group of avian mycoplasmas for turkey embryos and poults. Avian Diseases, 25, 104-111.

Rhoades, K.R. (1984). Comparison of strains of *Mycoplasma iowae*. Avian Diseases, 28, 710-717.

Roberts, D.H. (1964). Serotypes of avian mycoplasma. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, 74, 447-456.

Rosales, R.S., Puleio, R., Loria, G.R., Catania, S. ve Nicholas, R.A.J. (2017). Mycoplasmas: Brain invaders? Res Vet Sci. , 113:56-61.

Rosendal, S. ve Black, F.T. (1972). Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section B., 80, 615-622.

Shah-Majid, M. ve Rosendal, S. (1986a). *Mycoplasma iowae* from turkey phallus and semen. Veterinary Record, 118, 435.

Shah-Majid, M. ve Rosendal, S. (1986b). The viability of *Mycoplasma iowae* at 40°C in turkey semen. Poultry Science, 65, 1631-1632.

Shah-Majid, M. ve Rosendal, S. (1987). Evaluation of growth of avian mycoplasmas on bile salt agar and in bile broth. Research in Veterinary Science, 43, 188-190.

Shareef, J., Wilcox, J. ve Kumar, P. (1990). Adherence of *Mycoplasma iowae* to epithelial mucosa of the cloaca. Zentralblatt für Bakteriologie, Supplement 20, 872-874.

Shimizu, T., Numano, K. ve Uchida, K. (1979). Isolation and identification of mycoplasmas from various birds: an ecological study. Japanese Journal of Veterinary Science, 41, 273-282.

Stipkovits, L. ve El-Ebeedy, A.A. (1977). Biochemical and serological studies of avian mycoplasmas. Zentralblatt für Veterinarmedizin, Section B, 24, 218-230.

Taylor, R.R., Varsani, H. ve Miles R.J. (1994). Alternatives to arginine as energy sources for the non-fermentative *Mycoplasma gallinarum*. FEMS Microbiol Lett 115: 163–167.

Timms, L. (1967). Isolation and identification of avian mycoplasma. Journal of Medical Laboratory Technology, 24, 79-89.

Trampel, D.W. and Goll, F. (1994). Outbreak of *Mycoplasma iowae* infection in commercial turkey poults. Avian Diseases 38: 905-909.

Tomczyk, G. ve Minta Z. (2002). Elimination of mycoplasma from the turkey semen. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 46: 11-15.

Tully, J.G. (1983). Cloning and filtration techniques for mycoplasmas. In Methods in Mycoplasmology, vol. 1, Academic Press, New York; pp 173–177.

Vogl, G., Plaickner, A., Szathmary, S., Stipkovits, L., Rosengarten, R. ve Szostak, M.P. (2008). *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. Infection and immunity, 76(1)71-76.

Wang H., Fadl, A.A. ve Khan, M.I. (1997). Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. Department of Pathobiology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Connecticut, USA.

Wise, D.R. ve Fuller, M.K. (1976). Pathogenicity studies in poultry with an undefined serotype of mycoplasma. Research in Veterinary Science, 20, 334-339.

Whithear, K.G. (1976). Avian Mycoplasmosis. Australian Bureau of Animal Health.

Wood B.J. ve Wilson. S.J. (2013). *Mycoplasma iowae* in turkeys (Meleagris gallopavo) World's Poultry Science Journal, Vol. 69, 909-9016.

Woese, C.R., Maniloff, J. ve Zablen, L.B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proc Natl Acad Sci U S A 77: 494–498.

Yoder, H.W.J. ve Hofstad, M.S. (1962). A previously unreported serotype of avian mycoplasma. Avian Diseases, 6, 147-160.

Yoder, H.W.J. ve Hofstad, M.S. (1964). Characterization of avian mycoplasma. Avian Diseases, 8, 481-512.

Yoder, H.W.J. (1970) Preincubation heat treatment of chicken hatching eggs to inactivate mycoplasma. Avian Diseases 14: 75-86.

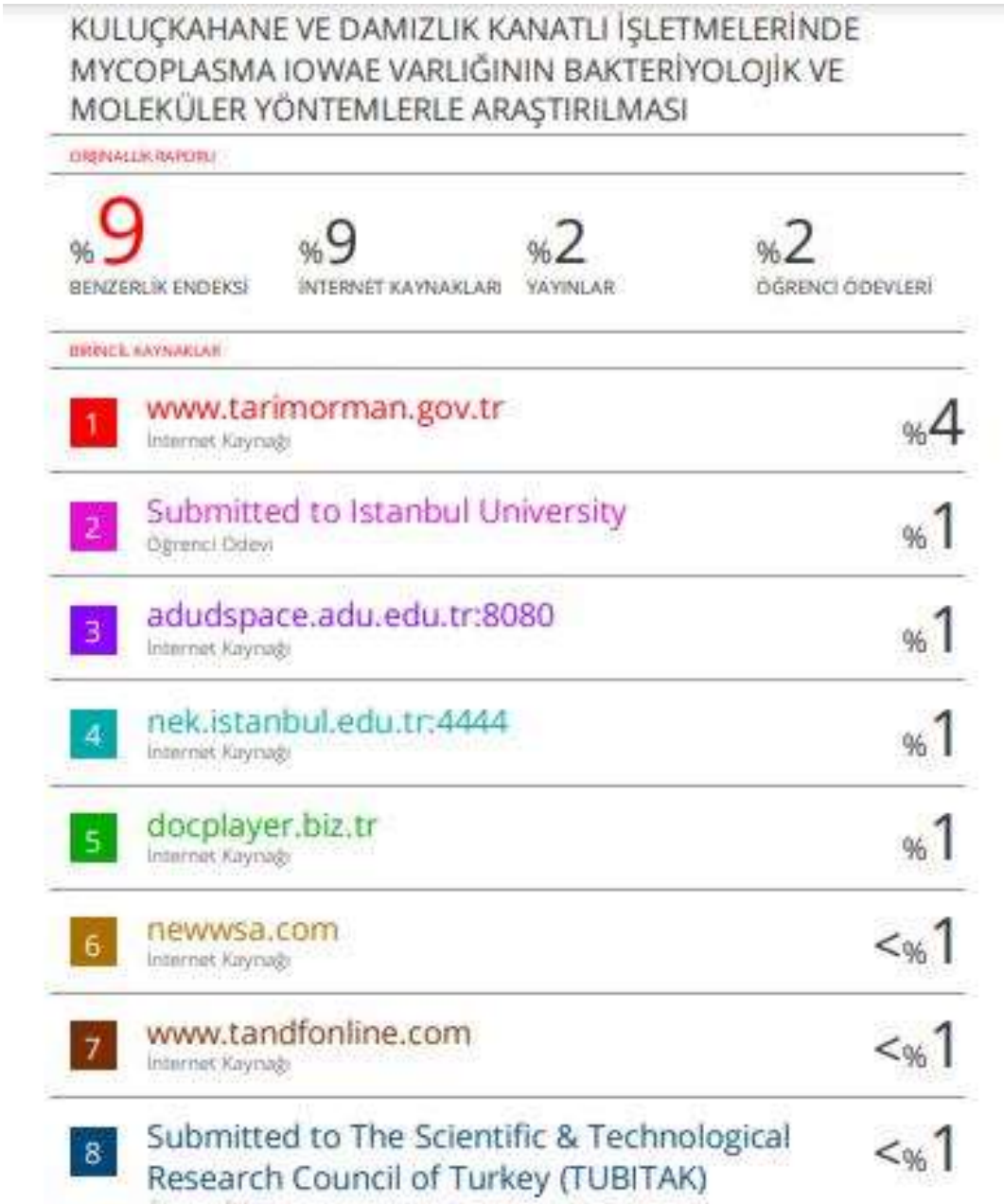
Zhao, S. ve Yamamoto, R. (1989). Heterogeneity of *Mycoplasma iowae* determined by restriction enzyme analysis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1, 165-169.

Zhao, S. ve Yamamoto, R. (1990). *Mycoplasma iowae* species-specific DNA probe. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2, 334-337.

Zhao, S. ve Yamamoto, R. (1993). Amplification of *Mycoplasma iowae* using polymerase chain reaction. Avian Diseases, 37, 212-217.

Zucker-Franklin, D., Davidson, M. ve Thomas, L. (1966). The interaction of mycoplasmas with mammalian cells. I. Hela cells, neutrophils and eosinophils. Journal of Experimental Medicine, 124, 521-531.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



KULUÇKAHANE VE DAMIZLIK KANATLI İŞLETMELERİNDE MYCOPLASMA IOWAE VARLIĞININ BAKTERİYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%9	%9	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.tarimorman.gov.tr İnternet Kaynağı	%4
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
6	newwsa.com İnternet Kaynağı	<%1
7	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)	<%1

.

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar:

Özdemir, Ü., Türkyılmaz, M.A., Sayı, O., Erpek, Ş.H. ve Nicholas, R.A.J. (2018) Survey for contagious caprine pleuropneumonia in goat herds in the Thrace region of Turkey. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 37 (3).

Tebliğler:

Poster Tebliğler:

Erpek, Ş.H., Karahan, M. ve Özdemir, Ü. (2019). First isolation of *Mycoplasma iners* from geese flock in Turkey.European Mycoplasma Conference, London, England, 18-19 March.

Özdemir, Ü., Erpek, Ş.H., Gülaçti, İ. ve Atil, E. (2016). PCR detection of *Mycoplasma gallisepticum* in a penguin from a zoo in Istanbul. 7th International Scientific Meeting, Days of Veterinary Medicine. Struga, Macedonia. 22-24 September.

Çelebi, Ö, Özdemir., Ü, Büyük, F, Ünsal Baca, A, Erpek, Ş.H., Karahan, M, Otlu, S, Şahin, M, Coşkun, M.R., Çelik, E, Gülmez Sağlam, A., Büyük, E. ve Akça, D. (2020) Isolation of Mycoplasma spp. from goose lungs with pneumonia and identification of the isolates by molecular methods. 14. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. Online. 13-16 Ekim.