**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROBİYOLOJİ**

**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**HİPERİMMUN SERUMLARDA *MYCOPLASMA* SP.'NİN PCR, LAMP VE BAKTERİYOLOJİK KÜLTÜR İLE BELİRLENMESİ**

**UFUK YAVUZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. K. Serdar DİKER**

**AYDIN–2023**

# **KABUL VE ONAY**

T.C Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ufuk YAVUZ tarafından hazırlanan “Hiperimmun Serumlarda *Mycoplasma* sp.’nin PCR, LAMP ve Bakteriyolojik Kültür ile Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir

 Tez Savunma Tarihi: 09/01/2023

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Üye (T.D.)  |  : Prof. Dr. K. Serdar DİKER  | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | …………….. |
| Üye  |  : Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ  | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | …………….. |
| Üye  | : Doç. Dr. Seyda CENGİZ  | Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi  | …………….. |

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ……………..……..… tarih ve ………………………… sayılı oturumunda alınan …………………… nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

 Prof. Dr. Süleyman AYPAK

 Enstitü Müdürü

# **TEŞEKKÜR**

Tez çalışmamın ve yüksek lisans programının her döneminde bana yardımcı olan, mesleki donanımını esirgemeden benimle paylaşan, benim iyi bir immunolog ve mikrobiyolog olabilmem için gerekli özveriyi ve altyapıyı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. K. Serdar DİKER’e teşekkürü bir borç bilirim. Mesleğe başladığım ilk günden beri bilgi birikimini çekinmeden benimle paylaşıp, bana bakış açısı kazandıran ve tez konumu belirlememde fikir veren Veteriner Hekim Dr. Mestan ÖZYER’e teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bana kendi çalışma disiplinini aktaran, moleküler uygulamaları kavramamı sağlayan ve diğer birçok konuda bana kararlı olmayı aşılayan Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ’a çok teşekkür ederim. Yüksek lisansa başladığım ilk günden beri bana her konuda yardımcı olan Prof. Dr. Şükrü KIRKAN’a teşekkür ederim. Fakültede geçirdiğim süre boyunca beni yalnız bırakmayıp arkadaşlıklarını paylaşan Evrim DÖNMEZ, Erdem SUR ve Arş. Gör. Yiğit SEFEROĞLU’na teşekkür ederim. Çalışma örnekleri eldesi aşamasında bana yardımcı olan ve sürece hâkim olmamı sağlayan Mustafa SAYAR’a teşekkür ederim. Tez yazım aşamasında bana yol gösteren arkadaşlarım Ekrem TINAZ ve Yunus ÇELİK’e teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve programdaki diğer öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Veteriner Hekim olmamda ve sonrasındaki süreçte mesleki olarak tecrübelenmemde çok büyük katkısı olan hayattaki tek rol modelim, amcam Veteriner Hekim Tahir S. YAVUZ’a çok teşekkür ederim.

Son olarak bana adaletli ve onurlu şekilde yaşamayı öğreten anneme çok teşekkür ederim. Gerçekleştirdiğim her şey senin emeklerine layık olabilmek için.

**İÇİNDEKİLER**

[KABUL VE ONAY i](#_Toc124325363)

[TEŞEKKÜR ii](#_Toc124325364)

[İÇİNDEKİLER iii](#_Toc124325365)

[SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v](#_Toc124325366)

[RESİMLER DİZİNİ vii](#_Toc124325367)

[TABLOLAR DİZİNİ viii](#_Toc124325368)

[ÖZET ix](#_Toc124325369)

[ABSTRACT x](#_Toc124325370)

[1. GİRİŞ 1](#_Toc124325372)

[2. GENEL BİLGİLER 2](#_Toc124325373)

[2.1. Mycoplasmatacae Familyası 2](#_Toc124325374)

[2.2. Mikoplazma Enfeksiyonları 6](#_Toc124325375)

[2.3. Pasif İmmunizasyon 8](#_Toc124325376)

[2.4. Mikoplazma Kontaminasyonları 12](#_Toc124325377)

[2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 15](#_Toc124325378)

[2.6. Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon 18](#_Toc124325379)

[3. GEREÇ VE YÖNTEM 19](#_Toc124325380)

[3.1. Gereç 19](#_Toc124325381)

[3.1.1. Besiyerleri 19](#_Toc124325382)

[3.1.2. PCR’da Kullanılan Solüsyonlar 20](#_Toc124325383)

[3.1.2.1. TBE Buffer 20](#_Toc124325384)

[3.1.2.2. Gel Loading Buffer 20](#_Toc124325385)

[3.1.3. PCR ve LAMP Primerleri 20](#_Toc124325386)

[3.1.4. DNA Polimeraz Enzimi ve Master Mix 24](#_Toc124325387)

[3.1.4.1. Bst DNA Polimeraz Enzimi 24](#_Toc124325388)

[3.1.4.2. SYBR Green 24](#_Toc124325389)

[3.1.5. Agaroz Jel 24](#_Toc124325390)

[3.1.6. Marker 24](#_Toc124325391)

[3.1.7. Kullanılan Cihazlar 25](#_Toc124325392)

[3.1.8. Hiperimmun Serum ve Çalışma Örnekleri 25](#_Toc124325393)

3.1.9. Pozitif ve Negatif Kontrol……………………………………………………………...25

[3.2. Yöntem 26](#_Toc124325394)

[3.2.1. Analiz Yöntemleri ve Örnekler 26](#_Toc124325395)

[3.2.3. Bakteriyolojik Kültür ile İdentifikasyon 28](#_Toc124325396)

[3.2.4. Moleküler İdentifikasyon 29](#_Toc124325397)

[3.2.4.1. PCR Optimizasyon Çalışmaları 29](#_Toc124325398)

[3.2.4.1.1. DNA Ekstraksiyon Optimizasyon Çalışmaları 29](#_Toc124325399)

[3.2.4.2. DNA Ekstraksiyonu 30](#_Toc124325400)

[3.2.4.3. DNA’nın Elektroforezi ve Saflık Kontrolü 31](#_Toc124325401)

[3.2.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 31](#_Toc124325402)

[3.2.4.5. Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon 32](#_Toc124325403)

[4. BULGULAR 34](#_Toc124325404)

[4.1. Bakteriyolojik Kültür ile Kontaminasyon Tespiti 34](#_Toc124325405)

[4.2. DNA Ekstraksiyon Optimizasyon Çalışma Bulguları 37](#_Toc124325406)

[4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyon Bulguları 39](#_Toc124325407)

[4.4. Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon Analiz Bulguları 43](#_Toc124325408)

[5. TARTIŞMA 49](#_Toc124325409)

[6. SONUÇ 55](#_Toc124325410)

KAYNAKLAR……………………………………………………………………………….56

ÖZGEÇMİŞ…………………………………………………………………………………..64

# **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

|  |  |
| --- | --- |
| AITS | : Acheloplasma 16S ila 23S rDNA İntergenik Kopyalanmış Aralayıcı Bölge |
| **BP** | **:** Baz Çifti |
| **CBPP** | **:** Bulaşıcı Sığır Plöropnömonisi |
| **CFU** | **:** Koloni Oluşturan Birim |
| **CVMP** | **:** Veteriner Tıbbi Ürünler Komitesi |
| **DGGE** | **:** Denatüre Edici Gradyan Jel Elektroforezi |
| **DNA** | **:** Deoksiribonükleik Asit |
| **ELISA** | **:** Enzime Bağlı İmmunosorbent Testi |
| **FcRn** | **:** Yenidoğan Fc Reseptörü |
| **FDA** | **:** Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi |
| **HEPES** | **:** Hidroksietilpiperazin-N-2-etansülfonik asit |
| **IgA** | **:** İmmunoglobulin A |
| **IgG** | **:** İmmunoglobulin G |
| **IgM** | **:** İmmunoglobulin M |
| **IL-1beta** | **:** İnterlökin**-**1beta |
| **IL-4** | **:** İnterlökin 4 |
| **IL-6** | **:** İnterlökin 6 |
| **IL-10** | **:** İnterlökin 10 |
| **IU** | **:** İnternasyonel Ünite |
| **LAMP** | **:** Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon |
| **MIC** | **:** Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu |
| **MITS** | **:** Mycoplasma 16S ila 23S rDNA İntergenik Kopyalanmış Aralayıcı Bölge |
| **ML** | **:** Mililitre |
| **mM** | **:** Milimolar |
| **MMC** | **:** Minimum Mikoplazmasid Konsantrasyonu |
| **NCTC** | **:** Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu |
| **NM** | **:** Nanometre |
| **OD** | **:** Optik Dansite |
| **OIE** | **:** Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü |
| **oppD** | **:** Oligopeptid Permeaz D |
| **PCR** | **:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| **PPLO** | **:** Plöropnömoni Benzeri Organizmalar |
| **rDNA** | **:** Ribosomal Deoksiribonükleik Asit |
| **RNA** | **:** Ribonükleik Asit |
| **rRNA** | **:** RibosomalRibonükleik Asit |
| **RPM** | **:** Dakikadaki Devir Sayısı |
| **TH1** | **:** Yardımcı T Hücreleri 1 |
| **TH2** | **:** Yardımcı T Hücreleri 2 |
| **Title 9 CFR** | **:** Amerika Birleşik Devletleri Federal Düzenlemeler Kanunun 9. Başlığı |
| **U** | **:** Ünite |
| **uvrC** | **:** Nükleotid Eksizyon Onarım Enzimi |
| **UV** | **:** Ultraviyole  |
| **µl** | **:** Mikrolitre |
| **µM** | **:** Mikromolar |
| **µm** | **:** Mikrometre |

# **RESİMLER DİZİNİ**

[**Resim 1.** Işık mikroskobunda 34 Numaralı örnekte (10-3 dilüsyonu ile deneysel kontaminasyon örneği) görülen tipik *Mycoplasmopsis bovis* kızarmış yumurta (fried egg) koloni görseli…………………………………………………………………………………. 36](#_Toc119232500)

[**Resim 2.** Koloni mikroskobu altında 33 Numaralı örnekte (10-2 dilüsyonu ile deneysel kontaminasyon örneği) görülen tipik *Mycoplasmopsis bovis* kızarmış yumurta (fried egg) kolonilerinin görseli………………………………………………………………………….. 36](#_Toc119232501)

**Resim 3.** Farklı DNA ekstraksiyon yöntemleri uygulanan örneklerin elektroforez jel görüntüsü……………………………………………………………………………………...38

[**Resim 4.** Çalışma örneklerinin (1-14 numara) elektroforez jel görüntüsü…………………... 41](#_Toc119232502)

[**Resim 5.** Çalışma örneklerinin (15-28 numara) elektroforez jel görüntüsü…………………. 41](#_Toc119232503)

[**Resim 6.** Çalışma örneklerinin (29-38 numara) ve negatif, pozitif kontrollerin elektroforez jel görüntüsü……………………………………………………………………………………... 41](#_Toc119232504)

**Resim 7.** PCR çalışmasında kullanılan *Mycoplasma* sp. ve *Mycoplasmopsis bovis* pozitif kontrollerinin elektroforez jel görüntüsü……………………………………………………..42

[**Resim 8.** Çalışma örneklerinin (1-15 Numara) elektroforez jelde oluşturdukları merdiven benzeri görüntü………………………………………………………………………………. 45](#_Toc119232505)

[**Resim 9.** Çalışma örneklerinin (16-30 Numara) elektroforez jelde oluşturdukları merdiven benzer görüntü………………………………………………………………………………... 45](#_Toc119232506)

[**Resim 10.** Çalışma örneklerinin (31-38 numara) elektroforez jelde oluşturdukları merdiven benzeri görüntü………………………………………………………………………………. 46](#_Toc119232507)

[**Resim 11.** Çalışma örnek tüplerine (31-38 Numara) SYBR Green eklendikten sonra UV Transilluminatör cihazında kaydedilen görüntü……………………………………………... 46](#_Toc119232508)

[**Resim 12.** Çalışma örnek tüplerine (31-38 Numara) SYBR Green eklendikten sonra UV ışık kaynağı altında kaydedilen görüntü………………………………………………………….. 46](#_Toc119232509)

[**Resim 13.** Pozitif ve negatif kontrole SYBR Green eklendikten sonra UV ışık kaynağı altında kaydedilen görüntü…………………………………………………………………………… 46](#_Toc119232510)

# **TABLOLAR DİZİNİ**

[**Tablo 1.**  Konvansiyonel PCR’da *Mycoplasma* sp. ve *Mycoplasmopsis bovis* genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler 22](#_Toc119232905)

[**Tablo 2.** LAMP’da *Mycoplasma* sp. genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler 22](#_Toc119232906)

[**Tablo 3**. LAMP’da *Mycoplasmopsis bovis* genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler 23](#_Toc119232907)

[**Tablo 4.** Bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile karşılaştırmalı olarak çalışılan tüm örnekler 27](#_Toc119232908)

[**Tablo 5.** Deneysel olarak kontamine edilen örnekler 28](#_Toc119232909)

[**Tablo 6.** PCR analizine ait ısıl döngü ve süre diyagramı 32](#_Toc119232910)

[**Tablo 7.** Tipik LAMP protokolü 33](#_Toc119232911)

[**Tablo 8.** Farklı DNA ekstraksiyon yöntemleri uygulanan örneklerin DNA yoğunluğu 37](#_Toc119232912)

[**Tablo 9.** Optimizasyon örnekleri bakteriyolojik kültür sonuç tablosu 34](#_Toc119232913)

[**Tablo 10.** Çalışma örnekleri bakteriyolojik kültür sonuç tablosu 35](#_Toc119232914)

[**Tablo 11.** Optimizasyon örnekleri PCR analiz sonuç tablosu 39](#_Toc119232915)

[**Tablo 12.** Çalışma örnekleri PCR analiz sonuç tablosu 40](#_Toc119232916)

[**Tablo 13.** Optimizasyon örnekleri LAMP analiz sonuç tablosu 43](#_Toc119232917)

[**Tablo 14.** Çalışma Örnekleri LAMP analiz sonuç tablosu 44](#_Toc119232918)

[**Tablo 15.** Deneysel olarak kontamine edilen örneklerde üç yöntemin kontaminasyonu yakalama hassasiyeti aşağıdaki tabloda belirtilmiştir 47](#_Toc119232919)

[**Tablo 16.** Çalışma örneklerinin genel sonuç tablosu 48](#_Toc119232920)

# **ÖZET**

**HİPERİMMUN SERUMLARDA *MYCOPLASMA* SP.’NİN PCR, LAMP VE BAKTERİYOLOJİK KÜLTÜR İLE BELİRLENMESİ**

**Yavuz U**. **Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2023.**

**Amaç:** Bu araştırmada yenidoğanların tedavi ve koruması amacıyla üretilen hiperimmun sığır serumlarında mikoplazmaların belirlenmesi için bakteriyolojik kültür, PCR ve LAMP yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırmada bakteriyel antijenlerle immunize edilen donör sığırlardan elde edilen ham serumlar, bunların çeşitli işlemlerden geçirilen final ürünleri ve deneysel kontamine edilmiş serum örnekleri kullanıldı. Mikoplazma tanısı için bakteriyolojik kültür, DNA ekstraksiyon, PCR ve LAMP yöntemleri deneysel olarak kontamine edilen serum örneklerinde optimize edildi ve karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Deneysel olarak kontamine edilen sığır hiperimmun serum örneklerinde bakteriyolojik kültür ve PCR en az 103, LAMP ise en az 104 mikoplazmayı tespit etti. Örneklerden DNA ekstraksiyonunda fenol-kloroform-izoamilalkol yöntemi diğer ticari kitlere göre daha üstün bulundu. Donör hayvanlardan alınan ham serum örneklerinin %41.6’sı PCR ile, %25’i LAMP ile mikoplazmalar yönünden pozitif bulundu. Bakteriyolojik kültür yönteminde ise örneklerin hiçbirisinden mikoplazma izole edilemedi. Filtrasyon sonrası örneklerin hiçbirinde hiçbir yöntemle etken saptanmadı.

**Sonuç:** PCR ve bakteriyolojik kültürün hiperimmun serumlardaki Mikoplazma kontaminasyonunu saptamada en duyarlı yöntemler olduğu sonucuna varıldı. LAMP yönteminin duyarlılığının ve tekrarlanabilirliğinin diğer iki yönteme göre düşük olduğu anlaşıldı. Çalışma sonuçları ayrıca, ticari serum üretiminde mikoplazma kontaminasyonunun göz önünde bulundurulması ve son ürüne filtrasyon uygulanması gerektiğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Hiperimmun serum, *Mycoplasmopsis bovis*, Mikoplazma, Sığır, PCR, LAMP

# **ABSTRACT**

**DETECTION OF *MYCOPLASMA* SP. IN HYPERIMMUNE SERA BY BACTERIOLOGICAL CULTURE, PCR AND LAMP (METHODS)**

**Yavuz U. Aydin Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Microbiology Program, Master’s Thesis, Aydin, 2023.**

**Objective:** This study was performed to compare culture, PCR and LAMP methods for detection of Mycoplasmas in hyperimmune bovine sera produced to use in prophylaxis and treatment of neonatal diseases.

**Material and Methods:** Hyperimmune sera from donor cattle immunized with bacterial antigens, their processed-final products and experimentally contaminated serum samples were used in the study. Bacteriological culture, DNA extraction, PCR and LAMP methods for detection of Mycoplasmas were optimized and compared by using experimentally contaminated serum samples.

**Results:** In experimentally contaminated hyperimmune bovine serum samples, bacteriological culture and PCR methods detected as low as 103 Mycoplasma, and LAMP method 104 Mycoplasma. Phenol-chloroform-isoamylalcohol method was found superior to other commercial kits in the DNA extraction from samples. Mycoplasmas contamination were found in %41.6 and %25 of unproccesed hyperimmune bovine sera from donor animals with PCR and LAMP, respectively. In bacteriologic culture, Mycoplasma could not be isolated from any sample. Filter-processed samples were found negative for mycoplasmas by all three methods.

**Conclusion:** PCR and bacteriological culture were found to be the most sensitive methods for detection of Mycoplasma contamination in hyperimmune sera. Sensitivity and repeatability of LAMP was lower when comparing with other two methods. Results also showed that Mycoplasma contamination should be considered in commercial serum production and filtration should be applied to final product.

# **Keywords:** Hyperimmune serum, *Mycoplasmopsis bovis*, Mycoplasma, Bovine, PCR, LAMP

# **GİRİŞ**

Yenidoğan canlıların bazılarında antikor geçişi plasenta aktarımı ile sağlanır. Doğumdan sonra ise immunglobulin bakımından oldukça zengin olan kolostrum sütü alımı ile pasif bağışıklık güçlendirilir ve yenidoğan canlılar patojen etkenlere karşı daha az duyarlı hale gelir. Fakat plasentadan antikor geçişi ruminantlar için geçerli değildir; anneden yavruya plasenta ile hiçbir immunglobulin sınıfı geçmez. Bu sebeple yenidoğan ruminantlar çevrede bulunan patojen mikroorganizmalara karşı oldukça savunmasızdırlar. Çevrede bulunan patojenlerin vücuda girmesi durumunda henüz bağışıklığı olmayan ve savunması düşük olan yenidoğan ruminantlarda şiddetli ishal, enterotoksemi, solunum yolu hastalıkları, sepsis ve ölümle sonuçlanan vakalar gözlenir. Yenidoğan hayvanların pasif bağışıklığının güçlenmesi için kaliteli kolostrum verilmesi gereklidir. Kolostrum sütünün normal süte kıyasla kıvamı daha yoğun ve içerik olarak normal süte kıyasla çok daha zengindir. Yenidoğan ruminantların ilk 2 saat içerisinde en az 2 litre, 12 saat içerisinde de en az 6 litre kolostrum sütü alması gereklidir. Yeterli miktarda ve kaliteli kolostrum alımı pasif bağışıklığı arttırır (Chase ve diğerleri, 2008).

Kolostrumun yeterli miktarda alınmadığı, kalitesiz kolostrumun alındığı veya bağışıklığın desteklenmesi amacıyla hiperimmun serum uygulamaları yapılmaktadır. Ancak serumlar latent konumdaki ve filtrelerden geçebilen küçük mikroorganizmaları taşıyabilir. Bu etkenleri incelemek için sterilite testleri de yapılmaktadır. Sterilite testlerinde kontaminasyon kaynağı olarak genellikle viruslar ve hücre duvarına sahip olmayan, kendi kendini kopyalayabilen en küçük patojen mikroorganizma olarak geçen mikoplazmalar da aranmaktadır. Sterilite testlerinde mikoplazma tespiti için genellikle selektif besiyerine ekim yapılarak etkenin varlığı aranmaktadır (CVMP). Patojen mikoplazma serotipleri ruminantlarda mastitis, arthritis, konjonktivitis ve pnömoniye sebep olmaktadır (Nicholas ve diğerleri, 2008; Nicholas ve diğerleri, 2016).

Mikoplazmaların biyolojik ürünlerde belirlenmesi için kullanılan klasik kültür yöntemi yaklaşık 2 hafta sürmektedir. Bu ise elde edilen ürünün sahada kullanımını geciktirmektedir. Bu nedenle hiperimmun serumların mikoplazma kontaminasyonlarını daha hızlı sonuç veren yöntemlerle yapılmasını gerektirmektedir. Bu çalışmada hiperimmun serumlarda mikoplazma türlerinin bakteriyolojik kültür, hızlı sonuç veren moleküler yöntemlerden konvansiyonel PCR ve laboratuvar teçhizatı gerektirmeyen LAMP yöntemleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

# **GENEL BİLGİLER**

## **2.1. Mycoplasmatacae Familyası**

*Mycoplasma*, *Mycoplasma* ve *Ureaplasma*'yı içeren *Mollicutes* sınıfının herhangi bir üyesine atıfta bulunmak için kullanılan bir terimdir. Ancak son yıllarda yapılan düzenlemeden sonra [Mycoplasmataceae](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=2092&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock" \o "family) familyası sınıflandırılması ve adlandırılmasında büyük değişiklikler olmuştur. Mycoplasmatacae familyası 4 esas cins (*Mesomycoplasma*, *Mycoplasma*, *Mycoplasmopsis* ve *Ureaplasma*) olarak tekrar sınıflandırılmıştır.Ruminantlarda bulunan ve hastalık oluşturan en bilindik mikoplazmaların bir kısmı da yeni oluşturulan cins isimlendirilmesine dahil olmuştur. Yeni isimlendirmede *Mesomycoplasma* cinsi içinde;*Mesomycoplasma bovoculi, Mesomycoplasma conjunctivae, Mesomycoplasma dispar, Mesomycoplasma ovipneumoniae,* *Mycoplasma* cinsi içinde; *Mycoplasma capricolum, Mycoplasma mycoides, Mycoplasma ovis,* *Mycoplasmopsis* cinsi içinde ise *Mycoplasmopsis agalactiae, Mycoplasmopsis arginini, Mycoplasmopsis bovigenitalium, Mycoplasmopsis bovirhinis, Mycoplasmopsis bovis* olarak tekrardan isimlendirilmiştir (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2020).

[**Mycoplasmataceae**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=2092&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock) familyasındaki klasik mikoplazma grubu 4 cins (*Mesomycoplasma*, *Mycoplasma*, *Mycoplasmopsis* ve *Ureaplasma*) ve 127 türü kapsamaktadır (NCBI, 2020). Mikoplazmaların en önemli özelliği hücre duvarlarının olmamasıdır (Andrea ve diğerleri, 2020). Mikoplazmalar, en küçük genomlara sahip, kendi kendini kopyalayabilen en küçük patojen organizmalardır; guanin ve sitozin bakımından düşüktürler (Baron, 1996). Mikoplazmaların hücre duvarının bulunmaması ortamdaki osmotik basınç ve sıcaklık değişimlerine duyarlı hale gelmesine neden olur. Ayrıca peptidoglikan sentezini etkileyen birçok antimikrobiyalin (penisilin ve sefalosporin vb.) mikoplazmalar üzerinde etkisiz olması da hücre duvarının bulunmamasının bazı avantajlarındandır (Nicholas ve diğerleri, 2008).

Mikoplazmalar doğada yaygın olarak bulunan saprotrofik veya parazitik bakterilerdir. Oksijensiz ortamda rahatlıkla hayatta kalabilirler. Hücre yapısına sahip oldukları için DNA ve RNA'yı birlikte içerirler. Mikoplazmaların tanımlanmış organelleri arasında sitoplazma, ribozom, serbest protein, eriyebilir protein ve üç katlı hücre membranı bulunmaktadır. Birçok bakterinin aksine fimbria, pilus ve kapsülleri yoktur. Mikoplazmaların hücre duvarı yerine üç katlı hücre membranının bulunması morfolojilerini pleomorfik hale getirir. Ayrıca üç katlı membran yapısına sahip olmaları filtrelerden rahatlıkla geçebilmelerini sağlar. Mikoplazmaların katı besiyerinde kızarmış yumurta (fried egg) görünümü oldukça tipiktir (Sladek, 1986). Mikoplazmalar 16S rRNA analiz metodu kullanılarak filogenetik olarak araştırıldığında gram pozitif bakterilerden köken aldıkları ve zamanla evrimleştikleri ileri sürülmektedir. Edmond Nocard ve Pierre Roux’un 1898’de bulaşıcı sığır plöropnömonisi çalışması sonucu bakteri kültürü gibi büyüyen ve filtrenebilen mikroorganizmalara plöropnömoni benzeri organizmalar (PPLO) ismini koymuşlardır. Mikoplazmalar gram pozitif *Lactobacillus* cinsi ile yakından ilişkilidir. *Bacillus* ve *Streptococcus* gibi birlikte oldukları bakteri grubuyla ortak ataları paylaşırlar ve bu bakterilerin ortamda antibiyotik bulunması halinde L formu oluşturması nedeniyle mikoplazmalar ile ilişkilendirilirler (Razin ve Hermann, 2002).

Mikoplazmaları in vitro kültürlemenin zorluğu araştırmaların önündeki en büyük engeldir. Doğada çok daha fazla mikoplazma mevcuttur, ancak buna rağmen henüz çoğu izole edilememiştir (Razin ve diğerleri, 1998). Mikoplazma üretiminde genellikle sığır kalp infüzyon, pepton, maya özütü ve hayvan serumları kullanılır. (Razin, 1991). Mikoplazmalar, eksojen yağ için tamamen konakçıya bağımlıdırlar (Rodwell ve Mitchell, 1979). Farklı hayvan serum türleri (buzağı, at, domuz) %5-20 oranında esansiyel lipid kaynağı olarak kullanılır. Peptonlar, ortama farklı polipeptitler, di-peptitler ve amino asit sağlar (Miles, 1992). Besiyerinde kullanılan hayvan serumları genellikle 56oC’de 30 dakika boyunca inkübe edilerek hücre lizisi sağlanır (Razin, 1978). Oksijen oranı mikoplazma büyümesinde önemli bir rol oynar. Oksijen ihtiyacı zorlanmaya bağlıdır; bazı mikoplazmalar anaerobik koşullarda büyümeyi tercih eder. Mikoplazmalarda hücre duvarı olmadığından diğer hücrelere daha duyarlıdırlar. Diğer hücre duvarlı bakterilere göre hipo-ozmotik ortamda parçalanırlar, bu nedenle sodyuma ve osmotik basınca ihtiyaç duyarlar. Optimum büyüme için 7-14 atmosfer basıncı mikoplazmalar için en iyisidir (Rodwell and Mitchell, 1979).Mikoplazmaların büyümesi, pH'daki herhangi bir değişikliğe duyarlıdır, pH değerlerinin dar aralığı nedeniyle ortam iyi tamponlanmalıdır. Mikoplazma büyümesi için en çok kullanılan tamponlar fosfat tamponu ve hidroksietilpiperazin-N-2-etansülfonik asit (HEPES) solüsyonudur (Miles, 1992). Mikoplazmalar hem insanlarda hem de hayvanlarda çok çeşitli hastalıklara neden olur. Özellikle hayvanlarda yaygın olarak pnömoni, arthritis, konjonktivitis, mastitis, abort vb. enfeksiyonlardan sorumludur. Mikoplazma enfeksiyonlarının spesifik tanısı genellikle hastalıklardaki benzerlik ile birlikte mevcut kullanılan tanı testlerinin yetersiz olmasına neden olmaktadır. Mikoplazmalar oldukça zor üreyen bakterilerdir ve tipik olarak kültürlenmesi haftalar sürer. Birçok serolojik test spesifik değildir ve duyarsızdır. Son zamanlarda PCR analizi bir dizi mikoplazma türünü saptamak için kullanılmıştır. Ancak şu anda bilinen 125 mikoplazma türünün hepsi için PCR testleri geliştirmek oldukça zordur. Yine de PCR analizi ile birçok mikoplazma türü izole ve identifiye edilebilmektedir. Denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGGE) ile spesifik bantlanma görüntülenmektedir (Fisher ve Lerman,1983; Lerman ve Beldjord, 1999). Bu yöntem görüntülemeyi inhibe edici kimyasalları önlemeye dayanmaktadır. Kimyasalların neden olduğu iplik ayrılmasını takiben DNA parçalarının göçünün engellenmesi için denatürantlar kullanılarak mikrobiyal ortamda çeşitlilik analizi için yaygın olarak kullanılmıştır (Muyzer, 1999). Daha önceki çalışmalarda evrensel primerler kullanarak DGGE yönteminin etkinliği gösterilmiş ve16S rDNA'nın V3 bölgesi için 27 veteriner mikoplazmasını tespit etmek ve ayırt etmek için kullanılmıştır (McAuliffe ve diğerleri, 2003). Mikoplazma türlerine özgü primerler geliştirilerek bu yöntemin doğrudan sahaya uygulanması sağlanmıştır. Son on yılda, nükleik asit aracılı prosedürler büyük ölçüde önem kazanmıştır. Daha önceleri kullanılan serolojik ve protein bazlı yöntemler karmaşık ve çok verimli olmaması sebebiyle laboratuvar çalışmalarında moleküler yöntemler önem kazanmıştır. Moleküler tiplendirme çalışmalarında PCR'ın kullanılması suşların identifikasyonunda geleneksel yöntemlere kıyasla Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE) kullanılarak genotiplendirilmektedir (Pfützner ve Sachse, 1996; Nicholas ve Ayling, 2003).

*M. bovis* ilk kez 1961'de ABD'de şiddetli mastitisli bir inekten izole edilmiştir (Hale ve diğerleri,1962). Daha sonra birçok Avrupa ülkesi dahil olmak üzere tüm dünyada enfeksiyon bildirilmiştir (Nicholas ve Ayling, 2003). Mikoplazmaların genomları son derece küçük olduğundan gerekli besinleri sağlamak için konakçıya bağımlıdırlar. Mikoplazmalar hem konakçıya bağımlı olmaları hem de hücre duvarının bulunmamasından dolayı konakçı bağışıklık savunmalarına ve antimikrobiyallere karşı son derece savunmasızdırlar. Mikoplazmalar dış etkenlere oldukça savunmasız olduklarından hayatta kalmak için çeşitli antijenik değişimler oluştururlar. Mikoplazmaların hücre duvarının bulunmamasından dolayı çapraz bağlanmayı ve peptidoglikan sentezine engel olan penisilinler ve sefalosporinler grubu antibiyotikler etkili değildir. Mikoplazmalar folik asit sentezini inhibe eden sülfonamidlere ve mikrobiyal solunumu engelleyen aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı da dirençlidirler (Barragry, 1994).

Mikoplazmaların biyofilm üreterek çevrede ve konakçıda hayatta kalma şansını arttırdığı ve antimikrobiyallere karşı daha az duyarlı hale geldiği bilinmektedir (McAuliffe ve diğerleri, 2006).

Mikoplazmalarla ilgili çoğu antimikrobiyal çalışma in vitro ortamda Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) değerlerinin belirlenmesi üzerinedir. MIC'ler, bir antimikrobiyalin patojeni inhibe edecek en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır. Minimum inhibisyon konsantrasyonu özellikle tanı laboratuvarları tarafından direnci ölçmek için kullanılır. Çoğu zaman yeni geliştirilen antimikrobiyallerin in vitro aktivitesini belirlemek için de uygulanır. MIC metodu antibiyotiklerin inhibitör etkilerini ölçerken, antimikrobiyallerin vücut üzerindeki öldürücü etkisini değerlendirmez. Mikoplazmalar için ise inhibe edici en düşük konsantrasyonu belirlemek için Minimum Mikoplazmasid Konsantrasyonu (MMC) uygulanır (Cooper ve diğerleri,1993; Hannan, 2000). Antimikrobiyal duyarlılık testi, veteriner hekimleri sahada yönlendirme açısından oldukça önemlidir. Antimikrobiyallerin olası etkinliği hakkında bilinçli bir seçim yapmayı sağlar. MIC verilerinin sağlanması, veteriner hekimler için görünüşte daha az etkili olduğu düşünülen antimikrobiyallerin seçilmesi ve farmakokinetik olarak akciğerlerde veya sütte konsantre olabilen bazı antimikrobiyallerin kullanımını tedavi etmek için daha uygun hale getirebilir. MIC değerleri belirlenen antimikrobiyaller farklı ülkelerde mikoplazmalara karşı farklı antimikrobiyal preparatlar için etkili tedavi dozu olarak uygulanabilir (Nicholas ve diğerleri, 2008).

## **Mikoplazma Enfeksiyonları**

Mikoplazma türlerinin yaptığı hastalıklar arasında en bilineni Bulaşıcı Sığır Plöropnömoni (CBPP) hastalığıdır. Bulaşıcı Sığır Plöropnömonisi Mycoplasma mycoides subsp. mycoides suşunun neden olduğu, sığırlarda görülen ciddi bir bulaşıcı sınır ötesi hastalıktır*.* M. mycoides subsp. capri, M. mycoides subsp. mycoides büyük koloni (LC)veM. mycoides subsp. mycoides küçük koloni (SC), Mycoplasma mycoidestüründeki en çok bilinen üç alt türdür*.* Hastalıkenfekte sığırlar ve duyarlı hayvanlar arasında doğrudan veya yakın temas yoluyla bulaşır. Endemik bölgelerde gıda güvenliğini tehlikeye atma özelliği olan, ekonomik önemi çok yüksek bir hastalıktır. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün (OIE) “A” Hastalıklar Listesi grubunda yer alan ve acil salgın raporlaması gerektiren bakteriyel hastalıktır (Alhaji ve diğerleri, 2020). Ateş, burun akıntısı, öksürük, zor solunum, şiddetli ödem, akciğerlerde interstisyel dokuların proliferasyonu, yaygın pnömoni ve serofibrinöz plörezi ile karakterizedir (Done ve diğerleri, 1995).

Salgınlar sırasında, başlangıçta hastalığın hiperakut ve akut formları baskınken, subakut ve kronik formunda klinik belirtiler, salgın ilerledikçe daha belirgin hale gelir.  Bu nedenle bazı enfekte hayvanların taşıyıcı olabileceği gerçeğiyle birleştiğinde, endemik bölgelerde klinik CBPP vakalarını tespit etmek bazen zordur (Alhaji ve diğerleri, 2020; Newton ve Norris 2000). CBPP salgını, hastalık tarafından hiç tehdit edilmeyen duyarlı bir sığır sürüsünde meydana geldiğinde, sürüde %100'e varan morbidite ve yaklaşık %50'ye varan mortaliteye neden olur (Masiga ve diğerleri, 1996).

Mikoplazmaların küçük ruminantlarda oluşturduğu en bilindik diğer bir hastalık ise Bulaşıcı agalaksidir. Bulaşıcı agalaksi; mastitis, arthritis ve keratokonjonktivitis enfeksiyonları ile karakterize olan süt koyunları ve keçilerde görülen önemli bir hastalıktır (OIE, 2004). Bulaşıcı agalaksi hastalığının esas etkeni *Mycoplasma agalactiae*’dir. Ancak son yıllarda *M.capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC ve *M. putrefaciens* etkenleri birçok ülkede mastitisli ve artritisli keçilerden izole edilmiştir. Bu nedenle bahsedilen dört etken de Bulaşıcı agalaksinin sebepleri arasında gösterilmektedir (McAuliffe ve diğerleri, 2006). *M. agalactiae* ilk olarak 1923’te koyunlardan izole edilmiştir. *M. agalactiae*'nin neden olduğu hastalığın ana klinik belirtileri laktasyon dönemindeki dişilerin %60-80 oranında mastitis vakasıdır. Diğer sebep olduğu enfeksiyonlar arasında arthritis, keratokonjonktivitis ve abortus oranları ise popülasyonun %10'undan azdır. *M. agalactiae* keçilerde Bulaşıcı agalaksi salgınlarının %90'ından, koyunlarda ise neredeyse %100’ünden sorumludur (Bergonier ve diğerleri, 1997). *M. agalactiae*'nin neden olduğu solunum yolları rahatsızlığı çok nadiren Bulaşıcı agalaksi özelliğidir. Genelde rapor edildiği durumlarda diğer patojen olan *M. mycoides* ile karışık bir enfeksiyonun sonucu olabilir(Jaÿ ve Tardy, 2019). Bulaşıcı agalaksi etiyolojisine eklenen diğer üç mikoplazma türleri sadece keçilerde olsa da bazen klinik olarak benzer sonuçlara neden olur (Migliore ve diğerleri, 2021).

Mikoplazmalar arasında *Mycoplasma bovis* türünün pnömoni, mastitis, arthritis ve genital sistem hastalıklarında etkili olduğu bilinmektedir. Özellikle sığır solunum yolu hastalığında viral patojenler ve çevresel stres faktörlerinin predispozan etkisi sonucunda *M. bovis* hastalığı meydana getirir (Nicholas ve diğerleri, 2008).

Hastalıktan etkilenen enfekte sığırlar aylarca hatta yıllarca enfeksiyon rezervuarı görevi görürler (Pfützner, 1990). *M. bovis*’in neden olduğu bir diğer hastalık mastitistir. Meydana gelen mastitis oldukça bulaşıcı ve kullanılan antibiyotiklere karşı dirençlidir. Enfeksiyonun seyri pürülant rengi bozulmuş, anormal sekresyonlar ile karakterizedir. Genellikle antibiyotik veya antienflamatuvar ilaçlar ile tedavi edilemediği için hastalıklı hayvanların sürüden çıkarılması ile sonuçlanabilir (Nicholas ve diğerleri, 2016).

Özellikle buzağılarda görülen bir diğer hastalık ise arthritistir. Eklemlerde şişlik, hassasiyet ve topallık sonucunda yem tüketiminde azalma ve güçten düşme görülür. Bu tarz vakalarda da antibiyotik tedavisi çok başarılı sonuç vermemektedir (Kirby ve Nicholas, 1996). Ayrıca *M. bovis* üretra ve testislerin artan enfeksiyonuna yol açarak orşitise neden olur. Sperma kalitesinde azalmaya sebep olur ve sperma ile etken yayılmaya devam eder (Kreusel ve diğerleri, 1989).

## **Pasif İmmunizasyon**

Memeli hayvanlarda gebelik periyodu boyunca anneden yavruya maternal antikor aktarımı plasental yol ile olmaktadır. Hayvanlarda plasental bağışıklık transferi plasentanın yapısı ile direkt ilişkilidir. Anne ile yavru arasındaki plasenta katmanları ne kadar kalın ve kompakt yapıda ise maternal antikor transferi o derece az olur veya hiç olmaz. Söz konusu katmanlar ne kadar az ve ince ise antikorların bu katmanları aşarak yavruya ulaşması o derece kolay olur. Ruminantlarda bulunan plasenta yapısı sindesmokoryal plasentadır. Bu plasentasyon yapısında koryonik epitelyum ile maternal epitelyum temas halindedir. Anne ile fetüs arasında 6 adet katman bulunur. Ancak koryonik epitelyum içinde bazı alanlarda maternal epitele geçişler vardır. Ancak bu katmanların fazlalığı anneden yavruya antikor geçişini engeller. Bu nedenle buzağı, kuzu, oğlak vb. ruminant yavruları doğduklarında hiç maternal antikor taşımazlar (Şen, 2019).

Yenidoğan ve genç ruminantların, hastalıklara karşı korunmadaki en önemli faktör ineklerden aktarılan pasif bağışıklığa bağlıdır. Kolostrum ile transfer edilen ineklerden alınan antikor, yenidoğanlarda enfeksiyonla savaşmak için mevcut olan doğuştan gelen tepkileri aktive eder ve düzenler (Chase ve diğerleri, 2008). Fetal ruminantlar ağırlıklı olarak doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından korunur. Fagositik hücrelerin (nötrofiller ve makrofajlar) aracılık ettiği doğal immun yanıt, geç gebelik dönemine kadar tam olarak gelişmez ve fetal kortizol düzeylerindeki artış nedeniyle gebelik yaklaştıkça fonksiyonel kapasitede düşüş olur (Barrington, 2001). Kompleman sistemi gibi humoral unsurlar etkilidir; ancak, seviyeleri yetişkinlere göre daha az seviyededir. İnterferon, bir fetüste gebeliğin 60. gününe kadar erken bir tarihte indüklenebilir. Edinilmiş bağışıklığın tüm hücresel bileşenleri fetal hayvanlarda mevcuttur (Chase ve diğerleri, 2008). Periferik kan T hücrelerinin sayısı, doğumdan 1 ay önce başlayarak, fetal ruminantların lenfoid dokularını dolaşıp doldurdukları için önemli ölçüde azalır (doğumda yaklaşık %60'tan %30'a düşer). Gelişmekte olan fetüslerde B hücreleri çok daha düşük sayılarda bulunur. Fetüslerde %1-2 oranında, yenidoğanlarda ise %10-20 oranında seyreder (Kampen ve diğerleri, 2006). Sığır fetüslerinin bir özelliği agamaglobulinemidir (Barrington, 2001).

Ruminantların rahim içinde enfekte olmadıkça neredeyse hiç antikorları yoktur. Enfeksiyona maruz kaldıklarında ise, yetişkinlere kıyasla nispeten düşük seviyelere sahiptirler ve ağırlıklı olarak IgM'den oluşur. Yenidoğan buzağılar doğumda immunolojik olarak saf değildir. Fagositlerin aktivasyonunu ve dokulara girişini de sınırlayan rahimdeki koruyucu ortam nedeniyle adaptif bağışıklığı artırma şansları yoktur. Buzağılar ayrıca maternal faktörler ve doğumun hormonal etkileri ve dolaşımdaki, dokulardaki antikor eksikliği nedeniyle de yetersizdir. Kolostrumun hızlı bir şekilde alınması ile yenidoğan hayvanların yaşamın en az ilk 2 ila 4 haftasında immunolojik koruma sağlaması için gereklidir (Chase ve diğerleri, 2008).

Kolostrum esas olarak antikorlar, sitokinler ve hücrelerden oluşur. Antikor, kolostrumun kritik bir bileşenidir ve agamaglobulinemik hayvanlar için acil bir antikor kaynağı sağlar. Doğumdan kısa bir süre sonra kolostrum içirilen hayvanların serumunda önemli konsantrasyonlarda immunglobulin bulunurken, kolostrumdan yoksun hayvanlarda yaşamın ilk 3 günü boyunca sadece eser miktarda immunglobulin bulunur (Clover ve Zarkover, 1980). Kolostrumdan yoksun hayvanlarda endojen IgM üretimi, doğumdan 4 gün sonrasına kadar dolaşımda oluşmaya başlamaz ve 8 günlük yaşa kadar fonksiyonel seviyelere (1 mg/mL) ulaşmaz. Dolaşımdaki IgA, IgG 1 ve IgG 2 seviyeleri bu buzağılarda doğumdan 16 ila 32 gün sonrasına kadar istenilen seviyelere ulaşmaz (Husband ve Lascelles, 1975).

Bu antikorların seviyeleri, doğumdan yaklaşık 4 ay sonrasına kadar yetişkin seviyelerine yaklaşmaz; o sırada IgG 2, yetişkin seviyelerinin sadece yarısıdır. Kolostrumun önemli bileşenlerinden bir diğeri ise sitokinlerdir (Hagiwara ve diğerleri, 2000). Bu immunolojik hormonlar, fetal immun yanıtın gelişmesine yardımcı olur. Bu sitokinlerin meme bezinde mi, kolostrumda bulunan lökositler tarafından mı yoksa her ikisinde mi salgılandığı açık değildir. İnterlökin 1-beta (IL-1beta), IL-6, tümör nekroz faktörü-beta ve interferon-gama sığır kolostrumunda bulunur ve proinflamatuar bir yanıtla ilişkilidir. Normal bağışıklık gelişiminde neonatal lenfositlerin bağırsakta toplanmasına yardımcı olurlar. Kolostrum, öncelikle sitokinler gibi küçük moleküllerin absorpsiyonu ile gerçekleştirilen, nötrofillerin bakterileri fagosite etme yeteneğini hızla geliştirir (Chase ve diğerleri, 2008). Kolostrumun üçüncü bileşen ailesi hücreleri içerir. Kolostrum, 1 x 106 ile 3 x 106 hücre /ml arasında lökositleri içerir (Lee ve diğerleri, 1980). Bu canlı lökositler, periferik kanda benzer oranlarda bulunur, ancak daha büyük bir makrofaj fraksiyonu (%40-50) ve daha küçük bir lenfosit fraksiyonu (%22-25) ve nötrofil (%25-37) bulunur (Reber ve diğerleri, 2005).

Lenfositlerin çoğu T lenfositlerdir, %5'ten azı ise B lenfositlerdir. Bu maternal hücrelerin bazıları dolaşıma girer ve doğumdan 24 saat sonra en yüksek seviyelere ulaşır (Reber ve diğerleri, 2006). Maternal lökositleri içeren kolostrum alan hayvanlar, antijen sunan hücreleri daha hızlı geliştirir (Reber ve diğerleri, 2005). Bu oldukça önemlidir, çünkü antijen sunan hücreler, patojenlere veya aşılara karşı kazanılmış bir bağışıklık tepkisinin geliştirilmesi için en önemli hücrelerdir. Yenidoğanlar tarafından kolostrum alımı ve emilimi kolostral absorpsiyon, neonatal reseptör FcRn tarafından bağırsak hücreleri ve “taşıma vakuolleri” kullanılarak endositoz yoluyla gerçekleştirilir. Bu emme kapasitesi doğumdan 6 ila 12 saat sonra azalmaya başlar ve 48 saatte biter (Chase ve diğerleri, 2008).

Yenidoğan ruminantlarda doğumda tüm temel bağışıklık bileşenleri mevcut olmasına rağmen, bileşenlerin çoğu en az 2 ila 4 haftalık olana kadar işlevsel değildir ve ergenliğe kadar gelişmeye devam edebilir (Reber ve diğerleri, 2006). Gelişmekte olan ve yenidoğan ruminantlar çeşitli immunomodülatör etkilere maruz kalırlar. Plasenta, yakın dönemdeki fetüsü ve anneyi etkileyen ve hücre aracılı ve hafıza (TH1) yanıtlarını baskılayan progesteron, prostaglandin E2 ve sitokinler (örn. IL-4 ve IL-10) üretir. Tersine, bu aracılar TH2 yanıtlarını ve antikor üretimini teşvik eder. Gebeler ayrıca doğumdan önce immunosupresif etkileri olan östrojen ve kortizol üretirler (Chase ve diğerleri, 2008). Doğum sürecinin bir parçası olarak ruminantlar, yaşamın ilk haftasında yüksek seviyelerde kortizol üretir (Mao ve diğerleri, 1994).  Bu hormonların kümülatif etkisi, bağışıklık tepkilerini bastırmak ve özellikle TH1 tepkisinden uzaklaştırmaktır. Bu hormonlar ayrıca kısa vadeli TH2 bağışıklık tepkilerini, özellikle de IgM üretimini destekler (Chase ve diğerleri, 2008).

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminde humoral bileşenler sınırlı miktarda bulunur ve yetişkinlerdeki kadar iyi işlev görmez. Yenidoğan ruminantlarda dolaşımdaki kompleman seviyeleri kademeli olarak artar ve 1 aylıkken erişkinlerdeki düzeyin yaklaşık %50'sine ulaşır. Yenidoğanların epitel hücrelerindeki interferon aktivitesi normal görünür, ancak lökositler tarafından tip 1 interferon üretimi daha düşüktür (Firth ve diğerleri, 2005).

 Yenidoğanların nötrofilleri ve makrofajlarının fagositik yetenekleri azalır, ancak kolostrumun alınmasından sonra kapasiteleri artar. Nötrofil işlevi, 5 aylıkken kademeli olarak yetişkin seviyelerine yükselir. Yenidoğanlarda dendritik hücrelerin sayısı daha düşüktür ve edinilmiş bağışıklık sistemini aktive etmek için antijen sunma yetenekleri sınırlıdır (Chase ve diğerleri, 2008).

Monositler dokulara göç eder ve proinflamatuar stimülasyondan sonra dendritik hücrelere dönüşür. Dolaşımdaki doğal öldürücü hücrelerin sayısı da 1 haftalıkken (toplam lenfositlerin %3'ü) yetişkinlere göre daha düşüktür. Dolaşımdaki doğal öldürücü hücrelerin oranı 6 ila 8 haftalıkken %10 oranına yükselir (Kampen ve diğerleri, 2006).

Genç ruminantlarda aktif bir bağışıklık tepkisi geliştirmedeki en büyük zorluklardan biri, anne bağışıklığının müdahalesi olmuştur. Parenteral yolla uygulanan birçok aşının zamanlaması, maternal antikor seviyesi dikkate alınmadan uygulanırsa aktif bağışıklığı yeterince uyarmadığı bilinmektedir. Maternal antikorların çoğu 16 ila 28 günlük bir yarılanma ömrüne sahiptir (Fulton ve diğerleri, 2004). Aşılama zamanının belirlenmesinde maternal antikorların düzeylerinin bilinmesi ve belli bir düzeyin altına indikten sonra aşılamaların yapılması gerekmektedir. Aksi durumda maternal antikorlar aşı etkeni ile reaksiyona girerek aşıların etkisiz kalmasına neden olur. Ayrıca mevcut maternal antikorlar da azalacağı için maternal bağışıklık ta koruyucu düzeyin altına düşer (Şen, 2019).

Aktif immunizasyon ile uyarılan immun yanıtın koruyucu düzeye çıkması nispeten uzun bir zaman alır. Dolayısıyla, özellikle toksijenik mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda, hastalığın seyri immun yanıtın gelişiminden çok daha hızlı olur. Bu durumda, hastalığın zararlı etkilerini en aza indirmek için hayvanların acilen korunmaları gerekir. Bu amaçla, donör hayvanlarda aktif immunizasyon ile hazırlanan antikorlar, duyarlı hayvanlara acil koruma sağlamak üzere verilir. Bu koruma şeklinde, pasif yolla bağışıklanan hayvanın immun sistemi aktif olarak çalışmaz ve sağlanan bağışıklık kısa sürede sonlanır. Antikor içeren antiserum, çeşitli patojenlere karşı hazırlanabilir. Antiserumlar hazırlandığı hayvan türünden bir hayvana uygulandığında, serumda daha uzun süre kalır ve koruma sağlar. Pasif immunizasyon en çok *Clostridium tetani* veya *Clostridium perfringens* gibi toksijenik bakterilerden ileri gelen hastalıklarda uygulama alanı bulur. Böyle antiserumlar daha çok atlarda hazırlanır. *Clostridium* toksinleri protein yapısındadır ve formaldehit ile muamele edildiklerinde denatüre olarak toksijenitelerini kaybederler, fakat antijenik yapıları değişmez. Bu şekilde hazırlanan toksinlere toksoid denir. Antiserum üretmek amacıyla donör atlara önce toksoid verilir, antikorlar üretildikten sonra ise saf toksin verilmeye başlanır. Atların antikor düzeyi yeterince yükseldiğinde serumları elde edilir. Bu serumların globülin fraksiyonu ayrılır ve konsantre edilir. Bu şekilde hazırlanan antiserum, başka hayvanların pasif immunizasyonu amacıyla kullanılır.

İmmunglobulinler vücutta hızla katabolize olduklarından, pasif immunizasyon ile sağlanan koruma süresi kısadır. Antiserumlardaki immunglobulin konsantrasyonları koruma açısından önemli olduğu için antiserumların potensleri standardize edilir. Bunun için duyarlı hayvanlarda kontrollü koruma testleri yapılır ve internasyonel standartlar saptanır. Örneğin tetanoz antiserumunun bir internasyonel ünitesi (IU), internasyonel standartın 0.03384 gramındaki spesifik nötralizan aktivitedir. Tetanoz antiserumu tetanoz şüphesi olan veya tetanoz belirtileri başlamak üzere olan hayvanları acil olarak korumak amacıyla kullanılır. Bu amaçla sığır ve atlara en az 1.500 IU, buzağı ve koyunlara 500 IU, köpeklere ise 250 IU tetanoz immunglobulini verilmelidir. Tetanoz toksini eğer reseptörlere bağlanmış ve klinik belirtiler başlamış ise uygulanan antiserumun koruyucu bir etkisi yoktur. Ayrıca monoklonal antikorlar, pasif koruma sağlamak amacıyla başka bir potansiyel antiserum kaynağıdır. *E.coli*’nin K99 fimbria antijenine karşı hazırlanan fare monoklonal antikorları buzağılara oral yol ile verildiğinde, hayvanları etkenin sebep olduğu ishallere karşı korur (Diker, 2005).

## **Mikoplazma Kontaminasyonları**

[Mikoplazmalar biyolojik ürün](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3584481/#B13) ve hücre kültürü üretimlerinde ara ürünü ve son ürünü kontamine eden en önemli kontaminanttır (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012). Mikoplazmaların hücre yüzeyine yapışmalarının yanı sıra hücre duvarının bulunmaması tespit edilmelerini zorlaştırır. Geçmişte, hücre kültürlerinde hayvan serumlarının kullanımından dolayı, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma hyorhinis* ve *Acholaeplasma laylawii* türleri kontaminasyonun ana kaynağıydı. Daha önceleri ağızdan pipetleme uygulamasından dolayı *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma salyarium* ve *Mycoplasma pirum* da kontaminasyon nedeniydi (McGarrity ve diğerleri, 1985).

Kültür süpernatantları ve hücre zarları, mikoplazmanın büyümesi için uygun bir ortamdır. Mikoplazmalar genellikle yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere dirençlidir ve sıvının bulanıklığı ile tespit edilemezler. Tek mikoplazma kontaminasyonu insidansı dünya çapında %15-35 iken, iki veya daha fazla mikoplazma türüyle çoklu mikoplazma kontaminasyonunun insidansı %7 ile %60 arasındadır (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012). Mikoplazma kontaminasyonu kalıcı olabilir ve etkilenen çalışmalar için tespit edilmesi zordur (Uphoff ve Drexter, 2002). Hücre kültürlerinin %5 ila %35'i *A. laylawii*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis* ve *M. orale* türleri ile enfektedir (Hay ve diğerleri, 1989).

Dünyadaki hücre dizilerinin yaklaşık %5 ila %30'unun mikoplazmalarla kontamine olduğu tahmin edilmektedir. Mikoplazmal kontaminasyon, hücre kültürü sistemi içindeki hemen hemen her parametreyi etkiler (Markoullis ve diğerleri, 2008).

Kontamine hücrelerin kullanımı, hücre fizyolojisinin neredeyse tüm yönlerini tehlikeye sokar ve sıklıkla hatalı sonuçlara yol açar veya önemli hücre hatlarının kaybına neden olur (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012). Mikoplazma kontaminasyonu hücre metabolizmasını yavaşlatmasa da biyolojik ürünü (aşı vb.) kontamine edebilir ve bu da partinin kaybolmasına sebep olur (Wisher, 2002). Hücre kültürlerinin mikoplazma enfeksiyonu, fark edilebilir hücre hasarı olmaksızın genellikle uzun süre fark edilmeyebilir. Bu nedenle, mikoplazma kontaminasyonunu incelemek için etkili tespit yöntemlerinin kullanılması önemlidir. Genellikle, mikoplazmanın araştırılması, doğrudan ve dolaylı tespit yöntemleriyle gerçekleştirilir (Uphoff ve diğerleri, 1992). Doğrudan yöntem, agar üzerinde mikoplazmanın koloni büyümesini tespit eder; bununla birlikte, dolaylı tespit tekniği ise test edilecek üründe mikoplazmalara bağlı bir gen ürününün ölçülmesinden oluşur (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012).

Mikoplazmalar, özel uç organelleri kullanarak konakçı hücrelerine bağlanabilir. Bu uç organelleri, ökaryotik hücrelere bağlanmak ve konak hücreye nüfuz etmek için yüksek konsantrasyonda adhezinlere sahiptir.  Mikoplazmalarda hücre duvarının olmaması, onun konakçı hücrenin zarıyla kaynaşmasına ve hücre zarı ile sitoplazmik bileşenlerini değiştirmesine yardımcı olabilir (Razin ve Hayflick, 2010).

Mikoplazmalar hücre kültürü ortamının, serumların ve diğer reaktiflerin sterilize edilmesinde kullanılan filtre yapılarından hücre duvarının bulunmaması, çok küçük ve esnek olmalarından dolayı geçebilirler. Bu nedenle hücre kültürü ortamı ve hücre kültüründe kullanılan hayvansal ürünler, mikoplazma kontaminasyonu için ana yollar olarak düşünülmelidir. 1960 ve 1970'lerde, serum ürünleri %18- %40 arasında bildirilen kontaminasyon oranlarıyla çok önemli bir birincil enfeksiyon kaynağıydı. Günümüzde yoğun serum üretimi yapan firmalardan elde edilen serum ve besiyerlerinde nadiren mikoplazma kontaminasyonuna rastlanır. Ancak, satın aldıkları ürünlerin yeterince filtrelendiğini, test edildiğini ve mikoplazma içermediğinin onaylandığını doğrulamak yine de son kullanıcının sorumluluğundadır (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012).

Çoğu hücre kültürü laboratuvarında, besiyerlerini veya diğer çözeltileri filtrelemek için 0,2 µm gözenek boyutlu filtre membranları kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntem, düşük mikoplazma seviyelerine sahip solüsyonlar için nispeten güvenlidir. Mikoplazma kontaminasyonu potansiyel olarak yüksek olabileceğinden, ham hayvan kaynaklı serum veya ürünlerin filtrelenmesi önerilmez. Mikoplazmaları filtrasyon yöntemi ile elimine etmek için doğru filtreleme yöntemi uygulamak önemlidir. Düşük basınç farkının (5-10 psi), 20 psi veya daha yüksek basınç kullanan filtre sistemlerine kıyasla mikoplazmayı bir zardan geçirme olasılığı daha düşüktür. Şüpheli durumlarda 0,2 µm filtreler yerine 0,1µm gözenek boyutuna sahip filtreler kullanılmalıdır. Ayrıca mikoplazmaların ürediği ortamın içeriğine göre örneğin Tryptic Soy Broth (TSB) veya Mycoplasma Broth besiyerlerine %10 oranında at serumu takviye edilmiş ortamlarda 0.2 µm dereceli filtrelere aynı derecede nüfuz edemediği belirlenmiştir (Nikfarjam ve Farzaneh, 2011).

Veteriner aşıları ve biyolojik ürünlerde mikoplazma kontaminasyonu için Title 9 of the Code of Federal Regulations Bölüm 113.28 (9 CFR 113.28 2013) bildirilen kontaminasyon kontrol testi mikrobiyolojik kültür yöntemi ile tanımlanmaktadır. Bu kültür temelli tahliller "altın standart" olarak kabul edilir. Mikoplazma tespiti ve benzeri testler uluslararası olarak kullanılmaktadır. Mycoplasma broth/agar testi, düşük seviyelerde bile kontaminasyonu yakalayabildiği için oldukça hassastır. Fakat bu kontrol yönteminin dezavantajı ise çoğu zaman optimal koşullar sağlandığında bile, mikoplazmaların zor üreyen organizmalar olması sebebiyle büyümesinin zor ve yavaş olmasıdır. Bu sebeple agarda koloniler halinde saptanması için en az 1 haftalık bir süreye ihtiyaç vardır (Drexler ve Uphoff, 2002). Ayrıca kontaminasyon kaynağının türü, konsantrasyonu, inkübasyon koşulları ve süresine bağlı olarak mikoplazmanın tipik koloni görünümü büyük ölçüde değişiklik gösterebilir. Sonuçlar öznel olabileceğinden dolayı muayene için deneyimli teknik personel ihtiyacı kültüre dayalı sonuçların doğru yorumlanması için oldukça kritiktir (Uphoff ve diğerleri, 1992).

Test süresini kısaltma ve daha spesifik sonuç almak için kültür temelli yöntemlere alternatif yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Moleküler yöntem olarak hedef organizmanın DNA ve RNA dizilerinin biyolojik ürünlerde hassas tespiti amacıyla PCR yöntemi çalışılmaktadır. Bu yöntem aranılan baz dizisinin kolayca tasarlanarak laboratuvar ortamına uyarlanabilir. PCR yöntemi de deneyimli personel ve ekipman gerektirmektedir (Volokhov ve diğerleri, 2011).

Mikoplazma kontaminasyonu taraması yapılacak üründe bulunan antibiyotikler, koruyucular, adjuvantlar vb. PCR testi için inhibitörlerdir. Testin algılama yöntemindeki hassasiyetini büyük ölçüde etkileyebilir (Kong ve diğerleri, 2007).

Uygun metotlar seçilip inhibe edici faktörler elimine edildikten sonra PCR yöntemi hızı, duyarlılığı ve tür bazında algılama yapabilmesi sebebiyle daha spesifik bir testtir. 9 CFR’de açıklanan standart agar algılama modeline ek olarak PCR testi optimize edilerek klasik kültür testine paralel olarak kullanılabilir(Ingebritson ve diğerleri, 2014).

## **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) aranması amacıyla ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş, yüksek ölçüde duyarlı ve özgün bir teknik olarak tanımlanan bu tekniğin bulucusu, tanı ve araştırma imkanlarında evrime yol açan bu başarısı ile Nobel ödülünü almaya hak kazanmıştır (Kahya ve diğerleri, 2013). Bu evrimsel buluştan sonra diyagnostik mikrobiyoloji yeni bir sürece girmiş, nükleik asit amplifikasyon teknolojileri mikroorganizmaların fenotipik özelliklerinin tanımlanması temeline dayanan geleneksel tanı tekniklerinin yerini almaya, hatta bazı mikroorganizmaların tespit edilmesinde altın standart olmaya başlamıştır. PCR teknikleri hastalıkların teşhisi, özel amaçlar için hedef genlerin belirlenmesi, özel DNA parçalarının klonlanmasında önem kazanmış ve bakteri kontaminasyonu, genetiği değiştirilmiş DNA’nın varlığı ve gıda içeriklerinin özgünlüğünün ve saflığının kontrolü gibi yeni alanlarda da incelemelere olanak sağlamıştır (Arı, 2004).

Mikrobiyoloji alanında kullanılan, mikroskobik ve klasik kültürel teknikler, antijen tespitine yönelik metotlar ve serolojik testler klasik bulgulara dayanan mikrobiyolojik analizlerinin çoğunluğunu oluşturmaktadırlar. Bu tekniklerin kullanımlarını düşük özgünlük oranı, yavaş üreyen veya üremesinde hassas ortam ve besiyeri gerektiren ya da apatojen ve saprofitik mikroorganizmalar gibi zorlayıcı sebepler ile kısıtlanmaktadır. İmmunosupresyon etkiler, antimikrobiyal tedaviler veya spesifik olmayan çapraz reaksiyonlar da geleneksel diyagnostik mikrobiyolojik analizlerin önemli sorunlarındandır (Ahmed, 2002;Kahya ve diğerleri, 2013).

PCR analizi ile yakın türler arasında veya alt tipler arasında ayrım belirlenebilir ve klinik örnekler ön zenginleştirmeye gereksinim duymadan hızlı şekilde test edilebilirler. PCR’ın en büyük avantajlarından biri de çalışılacak örneğin taşınması esnasında ölmüş olduğundan kültürle üretilemeyecek durumlarda ve kronik persistent etkenlerde bile kullanılabilmesidir (Kahya ve diğerleri, 2013).

Genetik materyallerle yapılacak çalışmalarda moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanabilmesi için, PCR analizi öncesinde kullanılacak marazi maddelerin yüksek molekül ağırlıklı DNA ve Ribonükleik Asit (RNA) moleküllerinin, inhibe edici faktörleri de içereceği göz önünde bulundurularak, çalışılacak örneğin saf bir şekilde elde edilebilmesi gerekir (Saiki ve diğerleri, 1988).

Eğer DNA ve RNA ekstraksiyonu yapılmazsa, sonuçlar örnekteki taq polimeraz enzimi inhibitörleri tarafından maskelenebilir. PCR’da kullanılan temel bileşenler hedef DNA veya RNA (templeyt), taq DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksinükleotitler, tampon solüsyonu, pH, Mg+2 iyonlarıdır (Kahya ve diğerleri, 2013). Uygun olmayan primerlerin, zaman ve sıcaklık parametrelerinin kullanımı (özellikle annealing sıcaklığı), polimeraz enziminin kalitesi ve Mg+2 konsantrasyonu en önemli parametrelerdendir. Primerlerin üzerinde bulunan baz sıraları, sadece hedef DNA üzerinde bir bölgede bulunmalı, başka yerlerde veya başka hedef DNA sekanslarında bulunmamalıdır (Saiki ve diğerleri, 1989; Kahya ve diğerleri, 2013). Primer tasarımı yapılırken dört bazın da eşit oranda kullanımına özen gösterilmeli, primerler tekrarlı bölgeler içermemeli ve primer çiftlerinin 3’ uçları birbirlerine komplementer yapıda olmamalıdır (Arı, 2004). Primerlerin yapısında %50-60 oranında G+C bazları bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların oluşmasına yardımcı olur. Ayrıca böyle birleşmeler, yüksek sıcaklıkta oluşturulan reaksiyonlar sırasında görülebilecek nonspesifik bağlanmaları da azaltmaktadır (Roux, 1995; Saiki ve diğerleri, 1989; Kahya ve diğerleri, 2013).

PCR analizi, ön denatürasyon ve tekrarlanan sikluslardan, denatürasyon, annealing, ekstansiyon ve final ekstansiyon aşamalarından oluşur. RNA tespiti yapılacaksa, önce RNA, ön aşamalarla DNA’ya dönüştürülür ve reaksiyona yukarıda sayılan DNA çoğaltma aşamalarıyla devam edilir. Ön denatürasyon 5-10 dakika süresince 94-95oC’de gerçekleştirilir. Denatürasyon zamanı ve sıcaklığı, G+C oranına dolayısıyla da çoğaltılmak istenen bölgenin uzunluğuna bağlıdır. Primerlerin birleşme sıcaklığı (annealing) 55-72oC arasında değişmektedir ve optimize edilmesi gereken en önemli parametrelerden biri birleşme sıcaklığıdır.

Primer birleşmesi için gerekli zamanın uzunluğu ve uygulanacak sıcaklık, amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine ve büyüklüğüne bağlıdır (Kahya ve diğerleri, 2013).

Birleşme sıcaklığının, teorik olarak spesifik DNA eşleşmesinin sağlanması amacıyla, primerlerin erime sıcaklığının birkaç derece altında olması gerekir. Uzama (ekstensiyon) sıcaklığı ve zamanı, yine seçilen bölge ve bu bölgenin G+C oranına bağlı olarak taq polimeraz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 72-78oC’lerde gerçekleştirilir (Sambrook ve Russel, 2001).

PCR analizinin yapıldığı cihazlar temelde hava ısıtmalı ve blok ısıtmalı olmak üzere iki çeşittir. Bu iki sistem arasında önemli farklar mevcuttur. Öncelikle hava bloğa göre çok daha hızlı ısınıp soğuduğu için PCR zamanı minimum seviyeye inmektedir. Geleneksel blok ısıtmalı PCR makinelerinde aksesuarların sıcaklık geçirgenliğinin az olması, arzu edilen sıcaklığa uzun zamanlarda erişilebilmesi, dolayısıyla zamanın çoğunun denatürasyon, annealing ve ekstensiyon basamaklarına geçişte harcanması, bu aletlerin kullanımlarıyla ilgili büyük dezavantajlar getirmektedir. Günümüzde artık pek kullanılmayan blok ısıtmalı termal ısıl döngüleyici makinelerinde PCR süresi 2-4 saat almaktadır (Wittwer ve diğerleri, 1990; Kahya ve diğerleri, 2013). Devamlı geliştirilmekte olan cihazlar, malzemeler ve hazır olarak kullanılabilen kitler ile PCR tabanlı metotlar ilk olarak tanı amacıyla geliştirilmiş olsa da günümüzde birçok bilim dalı alanında farklı uygulama sahalarında kullanılmaktadır (Kahya ve diğerleri, 2013).

PCR analizi mikoplazmaların sebep olduğu hastalıklarda veya biyolojik ürün kontaminasyonlarında bakteriyi tespit etmek için kullanılır ve klasik kültür yöntemine kıyasla süreyi azaltır (Baird ve diğerleri, 1999). Mikoplazmalarla ilgili ilk gerçekleştirilen çalışmalarda 1995 yılında *M.bovis* ve *M.agalactiae* türlerinin 16S rRNA genleri kullanılarak moleküler primerler tasarlanmış ve ilk çalışma gerçekleştirilmiştir. 1996 yılında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada daha spesifik primerler tasarlanarak çalışılmış ve hassasiyet olarak klasik kültürde 60 koloni oluşturan birime denk gelen bir oran belirlenmiştir (Ayling ve diğerleri, 1997).

Özellikle günümüzde sıkça kullanılan hücre kültürlerinin mikoplazma kontaminasyonu tespitinde PCR çalışmaları oldukça sık gerçekleştirilmektedir. Hatta hücre kültürü kontaminasyonlarında FDA tarafından klasik kültüre paralel olarak PCR analizinin de gerçekleştirilmesi istenmektedir (Molla ve diğerleri, 2015).

## **Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)**

PCR analizinin 1980’lerde keşfedilmesi ve geliştirilmesinden bu yana gen amplifikasyon yöntemi klinik olgularda ve özellikle genetik testlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu analiz yöntemi hepatit ve tüberküloz gibi bulaşıcı hastalıklar ve kalıtsal hastalıkların teşhisinde belirleyici olarak kullanılmaktadır. PCR test aşamaları örneklerin nükleik asit ekstraksiyonu, gen amplifikasyonu ve algılama basamaklarını içermektedir. Bu basamaklar önemli ölçüde uygulayıcı tecrübesi, pahalı ekipman ve kimyasal malzeme gerektirmektedir. PCR analizinin zorluklarından ve laboratuvar ekipmanı ihtiyacından dolayı yeni bir gen amplifikasyon yöntemi geliştirilmiştir. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) reaksiyonu, hız ve basitliği birleştiren, yüksek özgünlüğe sahip bir analiz metodudur (Notomi ve diğerleri, 2000).

LAMP’ı PCR’dan ayıran en önemli değişken farklı sıcaklık ve döngü basamaklarıyla reaksiyonun gerçekleştirilmesinin aksine, reaksiyonun sabit bir sıcaklıkta ve termal döngüleyiciye ihtiyaç duyulmadan gerçekleştirilmesidir. LAMP’de 2 veya 3 set primer ve tek bir polimeraz enzimi kullanılarak genellikle 60-65oC sabit sıcaklıkta ortalama 1 saatlik sürede reaksiyon gerçekleştirilir. Reaksiyonda özgünlüğü arttıran hedef gen üzerindeki 6 farklı bölgeyi amplifiye etmek için 4 farklı primer kullanılır. Ek olarak "döngü primerleri" çifti, reaksiyonu daha da hızlandırabilir. LAMP amplifikasyonunun hızlı ve sıralı ilerlemesi yüksek amplifikasyon verimliliğine katkıda bulunur. Kısa zaman aralığında çok az miktarda olan gen amplifiye edilir. Döngü primer tasarımları, amplifikasyon süresinin yarıya veya üçte bire düşürülmesini sağlar (Notomi ve diğerleri, 2015). Bulanıklık gibi basit algılama yöntemleri (Mori ve diğerleri, 2001) veya floresan saptama yöntemleri ile çalışılan örneklerin sonucu değerlendirilir (Tomita ve diğerleri, 2008).

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) analizi özellikle hücre kültürlerinin mikoplazma kontaminasyonu ve mikoplazmaların sebep olduğu hastalıkların tespitinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda mikoplazmanın amplifikasyonu için yüksek oranda özgüllük tespit edildiği ve LAMP yönteminde hedef diziyi tanımlayan dört farklı primer kullanmanın veBst polimeraz enziminin yüksek stabilitesi sonucunda yöntemin mikoplazmalar için oldukça spesifik olduğu bildirilmiştir (Soheily ve diğerleri, 2019).

# **GEREÇ VE YÖNTEM**

## **3.1. Gereç**

### **3.1.1. Besiyerleri**

Mikoplazma pasajları amacıyla içeriği aşağıda belirtilen mikoplazma selektif besiyeri kullanıldı.

**Mycoplasma Agar Base (Oxoid, CM0401)**

Bacterological peptone……………………………………………………..………….10.0 g/L;

‘Lab-Lemco powder’…………………………………………………………………...10.0g/L;

Sodium chloride…………………………………………………………………………5.0g/L;

Agar…………………………………………………………………………………….10.0g/L;

Dehidre besiyeri 35.5 g/L miktarında distile su içinde kaynatılarak çözdürüldü. Besiyerinin pH değeri 25 o C’de 7.8 ±0.2’ye ayarlandı ve 121 o C ‘de 15 dk süreyle otoklavda sterilize edildi.

 **Mycoplasma Culture Media Supplement (Oxoid)**

Horse serum……………………………………………………………………………..20.0 ml

Yeast Extract(25% w/v)…………………………………………………………………10.0 ml

Thallous acetate………………………………...………………………………………25.5 mg

Penicillin…………………………………………………………………………...…20.000 IU

Bir flakon içeriği yukarıda belirtilen liyoflize edilmiş 10 adet Mycoplasma supplement besiyeri 20’şer ml miktarında steril distile su ile aseptik koşullarda çözdürüldü. Ardından otoklav edilen agarlı besiyeri 50oC’ye geldiğinde steril koşullarda, çözdürülen Mycoplasma supplementleri ile birleştirilerek homojenize edildi ve steril petri kaplarına 20’şer ml miktarında döküldü. Hazırlanmış olan besiyeri berrak sarımsı renkte olup optimum mikoplazma cinslerinin üremesi için uygun, özellikle gram pozitif bakterilerin üremesini inhibe edici penisilin içermektedir.

### **3.1.2. PCR’da Kullanılan Solüsyonlar**

#### **3.1.2.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8,0) Buffer**

**10X TBE Stok Solusyonu**

Tris Base [tris (hydroxymethyl)aminomethane] ……….……………………….108 g

Borik Asit…………………………………………………………………………55 g

EDTA…………………………………………………………………………….. 7.5 g

İçeriği yukarda belirtilen kimyasallar 700 ml distile suda çözdürüldü ve 800 ml hacim 1000 ml’e tamamlandı. Solüsyonun pH’sı 8.0’e ayarlanıp 121oC’de 15 dk otoklav edildi. Oda ısısında kullanıma hazır olarak saklandı.

**0.5X TBE Kullanma Solusyonu**

10X TBE…………………………………………………………………… ………50 ml

Distile su……………………………………………………………………. ……..950 ml

Solüsyon hazırlığı için 10X TBE stok solüsyonundan 50 ml miktarında alındı, 950 ml distile su ile karıştırılarak solüsyon hazırlandı. Hazırlanan solüsyon hem agaroz jel hem de elektroforez tankı içerisinde kullanıldı.

#### **3.1.2.2. Gel Loading Buffer (6X)**

Bromfenol mavisi………………………………………………..............................25 mg

Sükroz………………………………………………………………………………4 g

H2O…………………………………………………………………………………10 ml

Solüsyon hazırlamak için 10 ml distile suda çözdürülerek solüsyon hazırlandı.

### **3.1.3. PCR ve LAMP Primerleri**

Tür ve cins düzeyinde identifikasyon amacıyla konvansiyonel PCR çalışmasında *Mycoplasma* sp. için 16S rDNA, *Mycoplasmopsis bovis* için ise uvrC gen hedef bölgelerini tanımlayan primerler kullanıldı (Tablo 1).

LAMP çalışmasında *Mycoplasma* sp. identifikasyonu için 16S rRNA gen dizilerini hedefleyen 2 adet iç astar primer, 2 adet dış astar primer ve 1 adet döngü primeri kullanıldı. (Tablo 2). *Mycoplasmopsis bovis* identifikasyonu için ise oppD gen dizilerini hedefleyen 2 adet iç astar primer, 2 adet dış astar primer ve 2 adet döngü primeri kullanıldı (Tablo 3).

**Tablo 1.**  Konvansiyonel PCR’da Mycoplasma sp. ve Mycoplasmopsis bovis genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Primer** | **Hedef Organizma**  | **Dizi (5'-3')** | **Tm (°C)** | **Ürün uzunluğu (bp)** | **Kaynak** |
| *Myco16SF772* | *Mycoplasma* sp. | GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT  | 57.68 | 269 | Gioia ve diğerleri, 2016 |
| *Myco16SR1041* | *Mycoplasma* sp. | TGCACCATCTGTCACTCTGTAACCT | 57.96 |
| *MycouvrCF364*  | *Mycoplasmopsis bovis* | TTACGCAAGAGAATGCTTCA  | 47.68 | 171 | Gioia ve diğerleri, 2016 |
| *MycouvrCR545* | *Mycoplasmopsis bovis* | TCATCCAAAAGCAAAATGTTAAA    | 46.36 |

**Tablo 2.** LAMP’da Mycoplasma sp. genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Primer** | **Hedef Organizma** | **Dizi (5'-3')** | **Tm (°C)** | **Kaynak** |
| *Myco-F3*  | *Mycoplasma* sp. | GCGATGGCTAACTATGTC CC | 53.83 | Soheily ve diğerleri, 2019 |
| *Myco-B3*  | *Mycoplasma* sp. | TCGCCTTTGGTGTTCTTCC | 51.09 | Soheily ve diğerleri, 2019 |
| *Myco-FIP*  | *Mycoplasma* sp. | AGCCTACGAACGCTTTACGCC CAGCCGTAATACATAGG | 68.78 | Soheily ve diğerleri, 2019 |
| *Myco-BIP*  | *Mycoplasma* sp. | AACCCTGGCTCGCTTTGGATA CGC ATT TCA CCG CTT CA | 68.78 | Soheily ve diğerleri, 2019 |
| *Loop-Myco* | *Mycoplasma* sp. | CAATAATTCCGGATAACGCTTGC | 53.49 | Soheily ve diğerleri, 2019 |

 DNA Polimeraz enzimi: Bst DNA Polimeraz

**Tablo 3**. LAMP’da Mycoplasmopsis bovis genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Primer** | **Hedef Organizma** | **Dizi (5'-3')** | **Tm (°C)** | **Konsantrasyon (nM)** | **Kaynak** |
| *Myco-F3*  | *Mycoplasmopsis bovis* | ACTAATCCAGCTCACCCTTA | 49.73 | 0.025 | Appelt ve diğerleri, 2018 |
| *Myco-B3*  | *Mycoplasmopsis bovis* | CGTTGCTGCTTTATGATGAC | 49.73 | 0.025 | Appelt ve diğerleri, 2018 |
| *Myco-FIP*  | *Mycoplasmopsis bovis* | TGGGGTTCCTTGAATTGAGAATAAT-TACATGAGCGCTTATCTCG | 66.39 | 0.20 | Appelt ve diğerleri, 2018 |
| *Myco-BIP*  | *Mycoplasmopsis bovis* | CAGATATGGCAAACTTACCTATCGG-GGTGGTTCTTTTTCATAGTCAA | 67.17 | 0.20 | Appelt ve diğerleri, 2018 |
| *Myco-LA*  | *Mycoplasmopsis bovis* | TCTCATCATCATTTTCAGGTATAGC | 52.76 | 0.075 | Appelt ve diğerleri, 2018 |
| *Myco-LB* | *Mycoplasmopsis bovis* | TGACCCTTTTGCACCTAGAA | 49.73 | 0.075 | Appelt ve diğerleri, 2018 |

 DNA Polimeraz enzimi: Bst DNA Polimeraz

### **3.1.4. DNA Polimeraz Enzimi ve Master Mix**

##### **3.1.4.1.** **Bst DNA Polimeraz Enzimi**

LAMP analizinde amplifikasyonu gerçekleştirmek amacıyla Bst DNA Polymerase Large Fragment kiti (NEB, M0275L) kullanıldı. Kullanılan kitin içeriğinde 10X buffer, 100 mM MgSO4, 8.000 U/mlBst enzimi bulunmaktadır.

##### **3.1.4.2.** **SYBR Green (Hibrigen, 2X SYBR Green)**

LAMP analizinde reaksiyonun sonucunu ultraviyole Transilluminatör cihazında gözle değerlendirmek için çalışma örneklerine amplfikasyon sonunda ilave edilerek kullanıldı.

### **3.1.5. Agaroz Jel**

|  |  |
| --- | --- |
| Agaroz (Sigma)……………….......................................................................... | 2 g |
| TBE (0.5X) ……………………………............................................................ | 100 ml |

Agaroz jel hazırlığı için 2 gr miktarında tartılan agaroz, steril cam şişe içerisine aktarıldı. Üzerine 100 ml miktarında 0.5X TBE buffer solüsyonu ilave edilerek karıştırıldı ve mikrodalga fırında 3-5 dk kaynatıldı. Homojenize halde olan karışım 50 oC’ye kadar soğuk su altında soğutuldu. Elektroforez işleminde kullanılacak olan agaroz jelin boyanmasında Safe View (ABM, Canada) boyası, 100 ml miktarında %1.5’lik agaroz jelin içerisine 7 μl miktarında eklenerek kullanıldı. Sıvı halde olan karışım agaroz jelin hazırlandığı kabın içerisine yavaşça ve kabarcık oluşturmadan döküldü. Jel kabının içerisine yükleme kuyucuklarının oluşmasını sağlayan taraklar yerleştirildi ve 15-20 dk oda ısısında solüsyon donmaya bırakıldı. Donmuş olan jel, kalıbından çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

### **3.1.6. Marker**

Oluşan DNA bantlarının belirlenmesinde marker olarak 100 bp'lik DNA Ladder (Fermentas) kullanıldı.

### **3.1.7. Kullanılan Cihazlar**

PCR 96 örnek kuyucuklu BioRad (USA) marka termal döngüleme cihazı, elektroforez VWR marka, 64 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankı ve görüntüleme Vilber Lourmat (Infinity VX2, Almanya) marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi. DNA yoğunluğunu ölçmek için ise Nanodrop (MaestroNano Micro-Volume Spektrofometre) cihazı kullanıldı. Serumların filtrasyon aşamasında ise uygun boyutlu filtreler kullanıldı.

### **3.1.8. Hiperimmun Serum ve Çalışma Örnekleri**

 Çalışmada pasif immunizasyon amacıyla programlı olarak immunize edilen sığırlardan alınan serum örnekleri ve son ürün eldesi için belli proses basamakları uygulanan örnekler mikrobiyolojik yöntem olarak selektif besiyerine ekim, moleküler yöntem olarak ta PCR ve LAMP yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak çalışılması amacıyla toplandı. Pasif immunizasyon amacıyla elde edilen 24 adet ham sığır serumu (1 adet ham serum havuzu), 8 adet mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon aşamasında alınan serum havuzu örneği ve deneysel olarak ileri dilüsyonlarda kontamine edilen 6 adet serum örnekleri toplanarak üç identifikasyon yöntemi paralel olarak çalışıldı. Serumların kaba filtrasyon işlemlerinden ultrafiltrasyon işlemlerine kadar olan aşamalar boyutu belirlenen filtreler ile gerçekleştirilerek, serum örnekleri +4oC’de muhafaza edildi.

**3.1.9. Pozitif ve Negatif Kontrol**

*Mycoplasma bovis* NCTC 10131 kodlu suş pozitif kontrol, fizyolojik tuzlu su (FTS) ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

## **Yöntem**

### **3.2.1. Analiz Yöntemleri ve Örnekler**

Çalışma tasarlanırken öncelikle analiz yöntemlerinin uygulanabilirliği ve hassasiyetini belirlemek amacıyla deneysel kontamine edilen örnekler çalışıldı. Toplamda 6 adet deneysel kontamine edilen serum örnekleri bakteriyolojik kültür, DNA ekstraksiyon, PCR ve LAMP testleri çalışılarak optimize edildi. Test yöntemlerinin optimizasyonu ve hassasiyeti belirlendikten sonra 24 adet ham sığır serumu (1 adet ham serum havuzu), 8 adet mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon serum örnekleri çalışıldı.

**Tablo 4.** Bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile karşılaştırmalı olarak çalışılan tüm örnekler



**3.2.2. Deneysel Kontaminasyon**

*Mycoplasma bovis* NCTC 10131 suşu mikoplazma agar besiyerinde 3 gün süresince 37oC’de %5 CO2’li inkübatörde üretildi. Üreyen kolonilerden saflık kontrolü yapıldıktan sonra steril eküvyon çubuk ile koloniler toplanarak fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde süspanse edildi. Süspanse edilen kültürlerden logaritmik olarak toplam canlı sayımı yine mikoplazma agar besiyerinde uygulandı. Süspanse kültürün miktarı 1,3x106 cfu/ml olarak belirlendi. Toplam canlı miktarı belirlenen inokülanttan 10-5’e kadar ileri dilüsyonlar hazırlandı. Deneysel olarak kontamine edilen steril ultrafiltrasyon serum örneğinden 2’şer ml miktarında bölünerek hazırlanan serum örnekleri, inokülantın saf ve ileri dilüsyonlarından 0,1’er ml miktarında alınarak serumlar kontamine edildi.

**Tablo 5.** Deneysel olarak kontamine edilen örnekler

|  |  |
| --- | --- |
| **Örnek No** | **Açıklama** |
| 31 | Ultra Filtrasyon Serum - Süspanse Edilen *M.bovis* SAF Pozitif Kontrol |
| 32 | Ultra Filtrasyon Serum - Süspanse Edilen *M.bovis* 10-1 Pozitif Kontrol |
| 33 | Ultra Filtrasyon Serum - Süspanse Edilen *M.bovis* 10-2 Pozitif Kontrol |
| 34 | Ultra Filtrasyon Serum - Süspanse Edilen *M.bovis* 10-3 Pozitif Kontrol |
| 35 | Ultra Filtrasyon Serum - Süspanse Edilen *M.bovis* 10-4 Pozitif Kontrol |
| 36 | Ultra Filtrasyon Serum - Süspanse Edilen *M.bovis* 10-5 Pozitif Kontrol |

### **3.2.3. Bakteriyolojik Kültür ile İdentifikasyon**

Çalışma örnekleri ve süspanse kültürün ileri dilüsyonları ile deneysel kontamine edilen steril serum, pozitif kontrol ve negatif kontrol örneklerinden ekimler 0,1’er ml oranında mikoplazma agar besiyerine uygulandı ve 5 gün boyunca 37oC’de %5 oranında CO2’li etüve kaldırıldı.

### **3.2.4 Moleküler İdentifikasyon**

#### **3.2.4.1 PCR Optimizasyon Çalışmaları**

##### **3.2.4.1.1 DNA Ekstraksiyon Optimizasyon Çalışmaları**

PCR optimizasyon çalışmaları için çeşitli filtrasyon aşamalarında alınan steril 5 adet serum örneği seçilerek toplam canlı miktarı 1,3 x 106 olan *Mycoplasma bovis* (NCTC 10131) kültürü ile deneysel olarak kontamine edildi. Ardından serum örneklerinden 4 farklı DNA ekstraksiyon yöntemi çalışıldı. Her yöntem için örnekler 0,5’er ml miktarında ependorflara bölünerek çalışıldı.

1. **Yöntem: Mekanik Sonikasyon (ISO LAB)**

Örneklerden 500 µl alınarak 10 dakika boyunca 40.000 HZ şiddetinde sonikasyon cihazında sonike edildi. Süre sonunda süspansiyonlar 10 dk 13.500 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvıdan 3’er µl alınarak PCR reaksiyonunda kullanıldı (Sambrook ve Russel, 2001)

1. **Yöntem: İnstaGene Matrix Kit (Bio-Rad)**

Ekstraksiyon üretici firmanın önerdiği uygulama basamakları takip edilerek gerçekleştirildi. Örneklerden 300 µl alınarak 12.000 rpm’de 3 dakika süresince santrifüj edildikten sonra süpernatantı ayrılarak tüplerde kalan peletlerin üzerine 200 mikrolitre instagene matriks eklenerek homojen hale getirildi. Homojen örnekler 56oC’de 30 dakika inkübe edildikten sonra 10 saniye süresince vortekslendi. Sonrasında 100oC’de 8 dakika boyunca inkübe edildikten sonra tekrar 10 saniye vortekslendi.

1. **Yöntem: Fermantas Kit (ThermoFisher -K0512)**

 Ekstraksiyon üretici firmanın önerdiği uygulama basamakları takip edilerek gerçekleştirildi. Örneklerden 200 µl alınarak 400 µl lizis solüsyonu ile karıştırıldı ve 65oC'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından 600 µl kloroform eklendi ve 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant ayrılarak yeni bir tüpe aktarıldı. Ayrılmış olan süpernatantın üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu eklendi ve tekrar 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Geriye kalan pelet üzerine 100 µl NaCl eklenerek örnekler vortekslendi.

Çözünmüş olan örneklerin üzerine 300’er µl soğuk etanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Sonrasında örnekler 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant tekrar atıldı ve kalan peletlerin üzerine %70’lik etanol eklenerek tekrar 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ayrılarak kalan peletlerin üzerine 100’er µl steril saf su eklenip vortekslenerek peletler çözdürüldü.

1. **Yöntem: Fenol Kloroform Izoamilalkol**

Örneklerden 400µlalınarak 400µl denatürasyon solüsyonu ile karıştırılarak 15 saniye vortekslendi. Denatürasyon solüsyonu ile reaksiyona giren örneklerde faz oluşumu şekillendikten sonra yeni tüplere örneklerin alt katmanı ayrıldı ve 300 µl asit fenol + 300 µl kloroform/izoamilalkol +100 µl 3M Na acetate eklenerek 15 saniye vortekslendi. Karışımlar 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatanttan 700 µl alınarak yeni tüplere aktarıldı ve üzerine 700 µl miktarında -20oC’de soğutulmuş olan izopropil alkol eklenerek örnekler vortekslendi. Vorteks sonrasında örnekler 1 saat süresince -80oC’de bekletildi. 1 saat sonunda örnekler alınıp çözüldükten sonra 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak tüpün dibine çökmüş olan pelete 300 µl %70 oranında etanol eklenerek 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak örnekler 37oC’de kurumaya bırakıldı. Kuruyan örneklerin üzerine 20 µl steril distile su eklendi (Chomczynski ve Sacchi, 2006).

#### **3.2.4.2. DNA Ekstraksiyonu**

Her proses aşamasında alınan sığır serumları ve deneysel olarak kontamine edilen serum örnekleri DNA ekstraksiyon optimizasyonu çalışmalarında PCR ve DNA yoğunluk miktarı değerIendirildiğinde en iyi sonuç alınan fenol-kloroform- izoamilalkol yöntemi kullanılarak çalışıldı. Çalışılan yöntemde her bir örnekten 400µlalınarak 400µl denatürasyon solüsyonu ile karıştırıldı ve 15 saniye vortekslendi. Denatürasyon solüsyonu ile reaksiyona giren örneklerde faz oluşumu şekillendikten sonra yeni tüplere örneklerin alt katmanı ayrıldı ve 300 µl asit fenol + 300 µl kloroform/izoamilalkol +100 µl 3M Na acetate eklenerek 15 saniye vortekslendi. Karışımlar 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatanttan 700 µl alınarak yeni tüplere aktarıldı ve üzerine 700 µl miktarında -20oC’de soğutulmuş olan izopropil alkol eklenerek örnekler vortekslendi.

 Vorteks sonrasında örnekler 1 saat süresince -80oC’de bekletildi. 1 saat sonunda örnekler alınıp çözüldükten sonra 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak tüpün dibine çökmüş olan pelete 300 µl %70 oranında etanol eklenerek 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak örnekler 37oC’de kurumaya bırakıldı. Kuruyan örneklerin üzerine 20 µl steril distile su eklenerek DNA eldesi elde edildi.

#### **3.2.4.3. DNA’nın Elektroforezi ve Saflık Kontrolü**

İzole edilen DNA’ların saflığınınbelirlenmesi amacı ile agaroz jel elektoroforezi, %1 oranında agaroz içeren jelde gerçekleştirildi. Bunun için, 5 μl DNA, 1 μl yükleme solüsyonu ile homojenize edilerek 100 Voltta 45 dakika yürütüldü. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA’ların bütünlüğünün tam olduğunu gösterdi (Sambrook ve Russel, 2001).

Serum örneklerinden elde edilen genomik DNA’lar, agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri Nanodrop (Maestro) ile ölçüldü.

Nanodrop cihazında DNA’ların 260 nm ve 280 nm’deki absorbans değerleri hesaplandı (OD260 ve OD280) ve bu değerler arasındaki oran belirlenerek DNA’nın saflığı kontrol edildi. OD260/OD280 oranının 1,6-2,0 arasında olması DNA’nın saf olduğunu, bu aralıktan daha aşağıda olması RNA kontaminasyonunu, daha yukarıda olması ise protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (Turner ve diğerleri, 2007).

#### **3.2.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

PCR reaksiyonları amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme olmak üzere üç basamakta gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında kullanılan master miksler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlandı.

 Gerçekleştirilen reaksiyonlarda her bir çalışma örneği için PCR amplifikasyonu 25 μl final hacimde gerçekleştirilirken; reaksiyonda kullanılan 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, 25 mM MgCl**2** 2 mM, 10 mM dNTP 0.2 mM, 100 pmol primerlerden 0.4 pmol, 5U Taq DNA polimeraz 1.5 U son konsantrasyonu olarak hazırlandı.

*Amplifikasyon*: PCR reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra örnek adedi kadar numaralandırılan ependorf tüpleri içine 22’şer μl ilave edildi. Daha sonra üzerine 3’er μl DNA ekstrakları tek tek eklenerek ağızları sıkı bir şekilde kapatıldı. Hazırlanan tüpler termal döngüleme cihazlarına yüklenip, aşağıdaki şekilde programlandı (Tablo 6).

**Tablo 6.** PCR analizine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Basamak | Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süresi |
| Ön Denatürasyon | 1 | 95°C | 5 dk |
| Denatürasyon | 35 | 95°C | 30 sn |
| Bağlanma | 56°C | 30 sn |
| Uzama | 72°C | 1 dk |
| Son Uzama | 1 | 72°C | 10 dk |

*Elektroforez*: 6X DNA elektroforez boyasından 1 μl alınarak, 5 μl elde edilen amplikon ürünleriyle birleştirildi ve 6 μl olan karışım jeldeki kuyucuklara belirlenen sıraya göre yüklendi. Hazırlanan jele amplikon ve marker yükledikten sonra, elektroforez tankının kapağı kapatıldı. Elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 100 Voltta 45 dakika yürütüldü.

*Görüntüleme***:** Elektroforez uygulamasından sonra jel, bilgisayara bağlı konumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi ve UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra *Mycoplasma* sp. için 269 bp, *Mycoplasmopsis bovis* için ise 171 bp bandında PCR ürünleri elde edilip edilmediği gözlendi (Gioia ve diğerleri 2016).

#### **3.2.4.5. Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)**

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) reaksiyonu diğer testlerde çalışılan örnekler ile paralel olarak gerçekleştirildi. Çalışma örneklerinde *Mycoplasma* sp. ve *Mycoplasmopsis bovis* tespiti için LAMP reaksiyonları amplifikasyon ve görüntüleme olmak üzere 2 aşamalı olarak çalışıldı.

Uygulanan reaksiyon Bstenziminin tedarik edildiği firmanın önerdiği tipik protokol adımları uygulanarak gerçekleştirildi. Reaksiyon gerçekleştirilirken primer karışımı belirtilen konsantrasyonlarda (iç astar primerler için 40 µM, dış astar primerler için 5 µM, döngü primerleri için 10 µM) kullanıldı. Ayrıca primerlerin sentezletilerek kullanıldığı literatür de örnek alınarak reaksiyon öncesi şablon DNA’lar 95oC’de 3 dakika denatüre edilerek 30 saniye buz üzerinde bekletildi.

**Tablo 7.** Tipik LAMP protokolü (NEB M0275)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bileşen** | **25 µl Reaksiyon** | **Son Konsantrasyon** |
| 10X ThermoPol Tampon | 2.5 ul | 1X (2 mM MgSO 4 içerir ) |
| MgS04 ( 100 mM) | 1.5 ul | 6 mM (toplam 8 mM) |
| dNTP Karışımı (10 mM) | 3.5 ul | her biri 1.4 mM |
| FIP/BIP Primerleri (25X) | 1 ul | 1,6 µM |
| F3/B3 Astarları (25X) | 1 ul | 0,2 µM |
| LoopF/B Primerleri (25X) | 1 ul | 0,4 µM |
| Bst DNA Polimeraz, Büyük Parça (8.000 U/ml) | 1 ul | 320 U/ml |
| DNA Örneği | değişken | > 10 kopya veya daha fazla |
| Nükleazsız Su | 25 µl'ye kadar |  |
| Toplam Reaksiyon Hacmi |  | 25 ul |

*Amplifikasyon:* Reaksiyon buz üzerinde kurulduktan sonra 58oC’de 1 saat amplifikasyon uygulandı. Amplifikasyonu sonlandırmak için literatürde de uygulanan yöntem örnek alınarak Bst enziminin inaktivasyonu amacıyla 95oC’de 3 dk denatüre edilerek reaksiyon sonlandırıldı (Appelt ve diğerleri, 2018).

*Görüntüleme:* Ultraviyole ışık kaynağının altında renk değişimini gözlemlemek için her örneğe 3’er µl SYBR Green ilave edildi. Ayrıca her çalışma örneği PCR analizinde olduğu gibi elektroforezi gerçekleştirilerek jeldeki görüntüler elde edildi ve örnek tüpler bilgisayara bağlı konumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilerek UV ışığı altında fotoğraflandı (Appelt ve diğerleri, 2018).

# **4.** **BULGULAR**

##  **Bakteriyolojik Kültür ile Kontaminasyon Tespiti**

Tüm örnekler 0,1 ml oranında mikoplazma agar besiyerine ekilerek 5 gün boyunca 37oC’de %5 oranında CO2’li etüve kaldırıldı. Çalışma örnekleri ve negatif kontrolde herhangi bir üreme görülmezken deneysel olarak kontamine edilen steril serum örneklerinde tabloda belirtilen üremeler görüldü (Tablo 9).

**Tablo 9.** Optimizasyon örnekleri bakteriyolojik kültür sonuç tablosu



Sonuçlar değerlendirildiğinde kontaminasyonda kullanılan süspanse kültürün toplam canlı sayımı 1,3x106 iken deneysel kontamine edilen çalışma örneklerinde en son 10-3 dilüsyonu ile kontamine edilen örnekte x103 cfu/ml oranında üreme görüldü. Sonuç olarak bu çalışmada Mycoplasma selektif besiyerinin oluşan kontaminasyonu yakalamadaki duyarlılığı yaklaşık 1000 koloni sayımına denk gelmektedir.

**Tablo 10.** Çalışma örnekleri bakteriyolojik kültür sonuç tablosu





**Resim 1.** Işık mikroskobunda 34 Numaralı örnekte (10-3 dilüsyonu ile deneysel kontaminasyon örneği) görülen tipik Mycoplasmopsis bovis kızarmış yumurta (fried egg) koloni görseli



**Resim 2.** Koloni mikroskobu altında 33 Numaralı örnekte (10-2 dilüsyonu ile deneysel kontaminasyon örneği) görülen tipik Mycoplasmopsis bovis kızarmış yumurta (fried egg) kolonilerinin görseli

## **DNA Ekstraksiyon Optimizasyon Çalışma Bulguları**

PCR ve LAMP çalışmasında kullanılacak örneklerin DNA ekstraksiyonunda en iyi metodu belirlemek için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında 4 farklı ekstraksiyon yöntemi çalışıldı. Çalışılan örneklerin DNA yoğunlukları ve görüntüleri aşağıdaki tablo ve görselde mevcuttur.

**Tablo 8.** Farklı DNA ekstraksiyon yöntemleri uygulanan örneklerin DNA yoğunluğu

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Örnek Kodu** | **Yöntem** | **Konsantrasyon** | **A260/280** | **A260/230** |
| 5 Sonikasyon | Sonikasyon | 2914.96 | 1,107 | 1,234 |
| 8 Sonikasyon | Sonikasyon | 1916,91 | 1,112 | 1,347 |
| 12 Sonikasyon | Sonikasyon | 1568,73 | 1,036 | 1,236 |
| 16 Sonikasyon | Sonikasyon | 1535,04 | 1,032 | 1,155 |
| 19 Sonikasyon | Sonikasyon | 743,18 | 0,983 | 0,893 |
|  |
| 5 Fermantas Kit | Fermantas Kit | 0,19 | 1,786 | 0,199 |
| 8 Fermantas Kit | Fermantas Kit | -9,52 | 2,552 | -0,803 |
| 12 Fermantas Kit | Fermantas Kit | 222,74 | 0,809 | 1,131 |
| 16 Fermantas Kit | Fermantas Kit | -116,16 | -0,689 | -0,600 |
| 19 Fermantas Kit | Fermantas Kit | 2,95 | 1,164 | 1,839 |
|  |
| 5 İnstagen Kit | İnstagen Kit | 3028,55 | 1,159 | 1,275 |
| 8 İnstagen Kit | İnstagen Kit | 510,25 | 0,989 | 0,759 |
| 12 İnstagen Kit | İnstagen Kit | 1815,84 | 1,209 | 1,162 |
| 16 İnstagen Kit | İnstagen Kit | 2332,76 | 1,194 | 1,234 |
| 19 İnstagen Kit | İnstagen Kit | 255,26 | 0,954 | 0,666 |
|  |
| 5 Fenol Kloroform | Fenol Kloroform | 52 | 1,635 | 0,276 |
| 8 Fenol Kloroform | Fenol Kloroform | 56 | 2,000 | 0,98 |
| 12 Fenol Kloroform | Fenol Kloroform | 64,53 | 1,552 | 0,200 |
| 16 Fenol Kloroform | Fenol Kloroform | 36,90 | 1,343 | 0,124 |
| 19 Fenol Kloroform | Fenol Kloroform | 57,24 | 1,806 | 0,178 |

5,8,12,16,19 numaraları örnek serum numaralarıdır

 **Sonikasyon Fermantas Kit**

 **M 5 8 12 16 19 5 8 12 16 19**

**Grup A Grup B**

 **İnstagene Kit Fenol Kloroform**

 **5 8 12 16 19 5**  **8 12 16 19**

****

*Mycoplasma* sp.

 (269 bp)

**Grup C Grup D**

**Resim 3.** Farklı DNA ekstraksiyon yöntemleri uygulanan örneklerin elektroforez jel görüntüsü Grup A: Sonikasyon ile DNA ekstraksiyon yöntemi, Grup B: Fermantas Kit ile DNA ekstraksiyon yöntemi, Grup C: İnstagene Kit ile DNA ekstraksiyon yöntemi, Grup D: Fenol-Kloroform-İzoamilalkol DNA ekstraksiyon yöntemi, M: Marker 100 bp (Fermantas)

DNA ekstraksiyonu optimizasyon çalışması sonucunda sonikasyon ve Fermantas kit ile yapılan uygulamada DNA elde edilemezken, en iyi DNA yoğunluğu ise Fenol-Kloroform- İzoamilalkol yöntemi ile elde edildi. Optimizasyon çalışması sonucunda tüm çalışma örnekleri bu yöntem kullanılarak ekstrakte edildi.

##  **Polimeraz Zincir Reaksiyon Bulguları**

PCR çalışması gerçekleştirilmeden önce deneysel kontamine edilen örneklerden ve çalışma örneklerinden DNA elde etmek amacıyla Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi uygulandı. Sonrasında tüm örneklere PCR çalışması için belirlenen döngü programı uygulandı. *Mycoplasma* sp. kontaminasyonunu belirlemek için optimizasyon ve çalışma örneklerine uygulanan analiz sonucu aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir.

**Tablo 11.** Optimizasyon örnekleri PCR analiz sonuç tablosu



PCR analiz sonucu değerlendirildiğinde testin hedef geni yakalama duyarlılığı süspanse kültürün 10-3 dilüsyonu ile deneysel olarak kontamine edilen serum örneğinde (34 numaralı örnek) belirlenmiştir.

Bu örneğin DNA yoğunluğu ise;

A260/280: 1,343 - A260/230: 0,307 - Conc:3,22’dir.

**Tablo 12.** Çalışma örnekleri PCR analiz sonuç tablosu



 **M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M**



*Mycoplasma* sp. (269 bp)

**Resim 4.** Çalışma örneklerinin (1-14 numara) elektroforez jel görüntüsü, M: Marker (100 bp, Fermantas)



 **M 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 M**



*Mycoplasma* sp. (269 bp)

**Resim 5.** Çalışma örneklerinin (15-28 numara) elektroforez jel görüntüsü, M: Marker (100 bp, Fermantas)

****

 **M 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 N P M**



*Mycoplasma* sp. (269 bp)



**Resim 6.** Çalışma örneklerinin (29-38 numara) ve negatif, pozitif kontrollerin elektroforez jel görüntüsü, N: Negatif Kontrol, P: Pozitif Kontrol, M: Marker (100 bp, Fermantas)

** M M.bovis M.sp. M.bovis M.sp. M**

****

****

*Mycoplasma* sp. (269 bp)

*Mycoplasmopsis bovis* (171 bp)

**Resim 7.**  PCR çalışmasında kullanılan Mycoplasma sp. ve Mycoplasmopsis bovis pozitif kontrollerinin elektroforez jel görüntüsü, M: Marker (100 bp, Fermantas)

## **Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) Analiz Bulguları**

LAMP çalışması gerçekleştirilmeden önce deneysel kontamine edilen örneklerden ve çalışma örneklerinden DNA elde etmek amacıyla Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi uygulandı. Sonrasında tüm örneklere LAMP çalışması için belirlenen döngü programı uygulandı. *Mycoplasma* sp. kontaminasyonunu belirlemek için optimizasyon ve çalışma örneklerine uygulanan analiz sonucu aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir.

**Tablo 13.** Optimizasyon örnekleri LAMP analiz sonuç tablosu



LAMP analiz sonucu değerlendirildiğinde testin hedef geni yakalama duyarlılığı süspanse kültürün 10-2 dilüsyonu ile deneysel olarak kontamine edilen serum örneğinde (34 numaralı örnek) belirlenmiştir.

**Tablo 14.** Çalışma Örnekleri LAMP Analiz Sonuç Tablosu



**** M **1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15**

**Resim 8.** Çalışma örneklerinin (1-15 Numara) elektroforez jelde oluşturdukları merdiven benzeri görüntü, M: Marker (100 bp, Fermantas)

****** **M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30**

**Resim 9.** Çalışma örneklerinin (16-30 Numara) elektroforez jelde oluşturdukları merdiven benzeri görüntü, M: Marker (100 bp, Fermantas)

**

 **M 31 32 33 34 35 36 37 38 N P**

**Resim 10.** Çalışma örneklerinin (31-38 numara) elektroforez jelde oluşturdukları merdiven benzeri görüntü, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, M: Marker (100 bp, Fermantas)

 **31 32 33 34 35 36 37 38 N P**



**Resim 11.** Çalışma örnek tüplerine (31-38 Numara) SYBR Green eklendikten sonra UV Transilluminatör cihazında kaydedilen görüntü, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, M: Marker (100 bp, Fermantas)

 **31 32 33 34 35 36 37 38 N P**

**Resim 12.** Çalışma örnek tüplerine (31-38 Numara) SYBR Green eklendikten sonra UV ışık kaynağı altında kaydedilen görüntü, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol

  **P**  **N**

**Resim 13.** Pozitif ve negatif kontrole SYBR Green eklendikten sonra UV ışık kaynağı altında kaydedilen görüntü

**Tablo 15.** Deneysel olarak kontamine edilen örneklerde üç yöntemin kontaminasyonu yakalama hassasiyeti aşağıdaki tabloda belirtilmiştir

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Örnek** | **İnokulant** | **İnokulant Cfu/ml** | **İnokulant/Serum** | **Bakteriyolojik Kültür** | **PCR** | **LAMP** |
| 31 | *M.bovis* SAF Kültür | 1,3x106 | 0,1/2 ml | + | + | + |
| 32 | *M.bovis* 10-1 Dilüsyon | x105 | 0,1/2 ml | + | + | + |
| 33 | *M.bovis* 10-2 Dilüsyon | x 104 | 0,1/2 ml | + | + | + |
| 34 | *M.bovis* 10-3 Dilüsyon | x 103 | 0,1/2 ml | + | + | - |
| 35 | *M.bovis* 10-4 Dilüsyon | x 102 | 0,1/2 ml | - | - | - |
| 36 | *M.bovis* 10-5 Dilüsyon | x 10 | 0,1/2 ml | - | - | - |

**Tablo 16.** Çalışma örneklerinin genel sonuç tablosu

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Örnek** | **Açıklama** | **Bakteriyolojik Kültür Sonuç** | **PCR Sonuç** | **LAMP Sonuç** |
| 1 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 2 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | + |
| 3 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 4 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | - |
| 5 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | - |
| 6 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | + |
| 7 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 8 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | + |
| 9 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 10 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | + |
| 11 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 12 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 13 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | - |
| 14 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 15 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | - |
| 16 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | + | + |
| 17 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 18 | Serum Havuzu | Üreme görülmedi | + | + |
| 19 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 20 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 21 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 22 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 23 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 24 | Sığır Serumu | Üreme görülmedi | - | - |
| 25 | Filtre Edilen Serum **Filtre Proses 1** | Üreme görülmedi | - | - |
| 26 | Filtre Edilen Serum **Filtre Proses 2** | Üreme görülmedi | - | - |
| 27 | Filtre Edilen Serum **Filtre Proses 3** | Üreme görülmedi | - | - |
| 28 | Filtre Edilen Serum **Filtre Proses 4**  | Üreme görülmedi | - | - |
| 29 | Filtre Edilen Serum **Filtre Proses 5** | Üreme görülmedi | - | - |
| 30 | Ultra Filtrasyon Serum | Üreme görülmedi | - | - |
| 37 | Ultra Filtrasyon Serum 1/2X | Üreme görülmedi | - | - |
| 38 | Ultra Filtrasyon Serum +Kimyasal | Üreme görülmedi | - | - |
| 39 | Negatif Kontrol | Üreme görülmedi | - | - |
| 40 | Pozitif Kontrol – (*Mycoplasmopsis bovis)* | Sayılamayacak kadar fazla | + | + |

# **TARTIŞMA**

Günümüzde bilinen en küçük hücre dışı hücresel form mikoplazmalardır. Mikoplazmalar 1889 yılında Albert Bernhard Frank tarafından ‘mantarsı oluşum’ anlamında tanımlanmıştır (Krass ve diğerleri, 1973). Bu bakteriler ruminant grubu hayvanlarda mastitis, pnömoni, keratokonjonktivitis, arthritis vb. gibi birden fazla enfeksiyonun oluşmasında rol oynar. Mikoplazmaların meydana getirdiği enfeksiyonlar arasında en bilineni Bulaşıcı Sığır Plöropnömonisi’dir. Hastalık, Dünya Hayvan Sağlık Örgütü (OIE) tarafından acil salgın raporlaması gerektiren bakteriyel hastalık olarak sınıflandırılmıştır (Alhaji ve diğerleri, 2020). Patojen mikoplazma türleri dışında apatojen bazı mikoplazmalar sağlıklı ineklerin normal florasında bulunurlar. Laak ve diğerleri, (1992)’nin gerçekleştirmiş oldukları çalışmada sağlıklı ineklerin burun swaplarından *M.dispar* ve *M.bovirhinis* gibi türleri izole etmişlerdir. Mikoplazmaların mevcut mikrobiyotada yaygın olarak bulunmalarından dolayı hayvansal kaynaklı ürünlerde kontaminasyona sebep olmaları mümkündür.

[Mycoplasmataceae](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=2092&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock) familyasının sınıflandırılması ve adlandırılmasındaki büyük değişikliklerden sonra tür isimlendirilmesinde farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada genel bilgiler bölümünde kullanılan literatürlere atıfta bulunurken bakterilerin eski ismi, diğer bölümlerde ise bakterilerin güncel isimleri kullanılmıştır.

Mikoplazmalar serbest yaşayan mikroorganizmalar içinde kendini kopyalayabilen viruslardan sonra en küçük genoma sahip patojen mikroorganizmalardır. Mikoplazmaların hücre duvarının bulunmaması onları diğer bakterilerden ayıran en önemli özelliğidir. Hücre duvarının yokluğu günümüzde yoğun olarak kullanılan peptidoglikan sentezini inhibe eden antibiyotiklerin mikoplazmalar üzerinde etkisiz olmasına neden olur (Nicholas ve diğerleri, 2008). Mikoplazmaların hücre duvarının bulunmaması ve diğer bakterilere göre daha küçük olup filtrelerden geçebilmelerinden dolayı çeşitli ortamlarda kontaminat olarak bulunmalarını sağlar. Mikoplazma türleri hücre hatları, hücre hatlarını zenginleştirmek amacıyla ilave edilen hayvan serumları ve süt örneklerini enfekte eden önemli kontaminantlar arasında yer almaktadır. Drexler ve Upphof, (2002)’un Almanya’da yapmış oldukları çalışmada hücre hatlarındaki kontaminasyonun %15-35 oranında mikoplazmalardan kaynaklandığını tespit etmişlerdir.

Mikoplazma kontaminasyon sıklığı diğer ürünlere kıyasla hücre hatlarında daha fazla görülmektedir. Bu sebeple kontaminasyonu belirlemek amacıyla firmalar ticari kitler üretmeye başlamıştır. Hücre hatları ile çalışan birçok bilim insanı çalışma öncesinde hücre hatlarını ve hayvan serumlarını mikoplazma kontaminasyonu yönünden test ederek ürünlerin sterilitesini kontrol eder. Aynı durum özellikle viral aşılar ve hiperimmun serumlar için de geçerlidir. Biyolojik ürünler öncesinde veya proses aşamasında mikoplazma türleri ile kontamine olabilir. Eğer bakterinin eliminasyonu proseste sağlanamazsa biyolojik ürünler değerlendirilemeyecek hale gelir. Ülkemizde de hayvansal kaynaklı birçok biyolojik ürün üretildiği için mikoplazma kontaminasyonu açısından ürünlerin kontrolü oldukça önemlidir. Biyolojik ürünlerde mikoplazma türlerinin kontaminasyon kontrolü genellikle bakteriyolojik kültür ile belirlenmektedir. Testin ortalama 10-14 gün gibi uzun sürede sonlanması ve ölü veya kültürlenemeyen mikroorganizmaları tespit edememesinden dolayı bu yönteme alternatif daha kısa sürede sonuçlanan ve daha spesifik olan yöntemler geliştirilmelidir.

Patojen ve apatojen olan birçok mikoplazma türü çiğ süt örneklerinden identifiye edilmektedir. Gioia ve diğerleri, (2016)’nin New York’taki 95 çiftlikte gerçekleştirmiş oldukları çalışmada toplam 845 mikoplazma izolatını çalışmışlardır. Bakteriyolojik kültür ve PCR yöntemi paralel uygulanan çalışmada 16S, uvrC, MITS ve AITS gen bölgelerini kullanarak *Mycoplasma* ve *Acheloplasma* türleri arasındaki dağılımı tespit etmişlerdir. Çalışılan çiftliklerin bir kısmında birden fazla mikoplazma türü belirlenmiş olup bu oran tüm çiftliklerin %14'ünü temsil etmektedir. Ortaya çıkan analitik sonuçlar değerlendirildiğinde PCR yönteminin güvenilir ve duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bakteriyolojik kültürün uzun ve zahmetli olmasından dolayı PCR yönteminin alternatif olarak kullanılması çalışmada belirtilmiştir. Bizim uygulamış olduğumuz çalışmada Gioia ve diğerleri, (2016)’nin kullanmış olduğu 16S ve uvrC gen bölgelerini temsil eden primerler seçilerek sentezletilmiştir. Çalışılan primerler pozitif kontrollerde mevcut bp aralığındaki bantlanmayı göstermiş, çalışmada herhangi bir yanlış pozitiflik görülmemiştir.

LAMP yönteminde hayvansal materyallerdeki mikoplazma kontaminasyonunu belirlemede en çok çalışılan ürünlerden birisi süttür. Appelt ve diğerleri, (2018)’nin Kaliforniya’daki çiğ süt örneklerinde *M. bovis* kontaminasyonunu tespit etmek için qPCR ve LAMP analiz yöntemlerini kıyaslamalı olarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada LAMP tahlili gelişimi için uygun hedef gen olarak oppD geni çalışılmıştır. İncelenen genler arasında nükleotid korunumu (%100 nükleotid dizi özdeşliği) uygunluğundan dolayı LAMP tahlili için primer tasarımında bu gen kullanılmıştır.

Farklı oppD primer konsantrasyonları karşılaştırıldığında 0.025 μM dış primer (MycoF3; MycoB3), 0.2 μM iç primer (MycoFIP; MycoBIP) ve 0.075 μM döngü primeri (MycoLA; MycoLB) en fazla verimi verdiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Çalışmada LAMP analizi izotermal sıcaklıkta 15,25,35 ve 55 dakika amplifikasyon süreleri denenmiş ve analitik özgüllüğe erişmek için en iyi sonucun 55 dakikada olduğu gözlemlenmiştir. Farklı DNA ekstraksiyon kitleri kullanılarak karşılaştırılan analiz yöntemleri çiğ sütteki *M.bovis* kontaminasyonunu belirlemede qPCR analiz yönteminin LAMP analizine göre daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir. En iyi sonuç alınan ekstraksiyon kiti belirlenerek gerçekleştirilen çalışmada qPCR analizinin %96,5 oranında hassasiyete sahip olduğu Appelt ve diğerleri, (2018) tarafından rapor edilmiştir. Bizim gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada ise 4 farklı DNA ekstraksiyon yöntemi arasında ticari kitlere kıyasla en verimli olan yöntem Fenol- Kloroform-İzoamilalkol yöntemi olarak belirlenmiştir. Amplifikasyon için ise 58oC izotermal sıcaklıkta 60 dakikada en iyi sonuç alınmıştır.

LAMP analizinin mikoplazma kontaminasyonunu belirlemede çalışılan bir diğer ürün de hücre kültürüdür. Soheily ve diğerleri, (2019)’nin İran’da gerçekleştirdikleri çalışmada hücre kültürlerinde *Mycoplasma* sp. kontaminasyonunu belirlemek için LAMP ve PCR yöntemlerini kıyaslamalı olarak uygulamışlardır. Yapılan çalışmada *Mycoplasma* sp. 16S rRNA geninin tespiti için 2 adet dış primer (Myco-F3, Myco-B3), 2 adet iç primer (Myco-FIB, Myco-BIP) ve bir adet döngü primeri (Loop-Myco) kullanılmıştır. Araştırmacılar sonuçları türbidimetrede oluşan yoğunluğa ve %2 agaroz jeldeki merdiven benzeri çoklu bant görüntüsüne göre değerlendirdiklerini bildirmişlerdir. Çalışmadaki sonuçlar değerlendirildiğinde LAMP’ın spesifik olduğu çünkü 8 adet *Mycoplasma* sp. olmayan çalışma örneğinin negatif sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca alternatif olarak çalışılan PCR yönteminde Myco F3 ve Myco B3 primerlerini kullanarak LAMP testinde pozitif çıkan örneklerde 219 bp aralığında bant görüntüsünü saptayarak doğrulamışlardır.

LAMP analizinde diğer moleküler teşhis yöntemlerinde olduğu gibi primer seçimi oldukça önemlidir. Çalışma modelimizi oluştururken PCR ve LAMP analiz yöntemleri için literatürlerde *Mycoplasma* sp. mevcut olan primerlere odaklandık. PCR çalışmasında sentezletmiş olduğumuz primerlerde herhangi bir sorun yaşamamışken LAMP için Soheily ve diğerleri, (2019)’nin kullanmış olduğu 5 adet *Mycoplasma* sp. primerlerini sentezleterek çalıştık. Fakat pozitif kontrollerimizde merdiven benzeri bantlanma görüntüsünü göremedik.

Sonrasında F3 ve B3 primerlerini kullanarak PCR analizini gerçekleştirdik ve o çalışmada da belirlenen bp aralığında bantlanma oluşmadı. *Mycoplasma* sp.primerleri ile olumsuz sonuç alınca Appelt ve diğerleri, (2018)’nin LAMP analizinde kullanmış oldukları 6 adet *M.bovis* primerlerini sentezleterek çalışmamızı tekrar dizayn ettik. Uygulanan çalışmada pozitif kontroller ve diğer çalışma örneklerinde %2 agaroz jelde merdiven benzeri görüntü ve örneklere SYBR Green eklendikten sonra UV ışık kaynağı altında renklenmeyi saptadık.

Moleküler teşhis yöntemleri çalışılırken paralel olarak bakteriyolojik kültür ve serolojik testler ile de sonuçlar desteklenmektedir. Dvorakova ve diğerleri, (2005)’nin Çek Cumhuriyeti’nde yapmış oldukları çalışmada hücre hatları ve hücre hatlarını zenginleştirmek amacıyla kullanılan sığır serumlarındaki mikoplazma kontaminasyonunu PCR, bakteriyolojik kültür ve ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. Uygulanan çalışmada iki hücre hattında, PCR yöntemi ile kontaminasyonun tespit edildiği, diğer hücre hatlarında sonucun negatif olduğu bildirilmiştir. PCR ile test edilen tüm serum örneklerinin mikoplazma negatif olduğu bildirilmiştir. Hücre hatları ve serumların PCR ile test edilmesinin sonuçları, ELISA ve bakteriyolojik kültür yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada mikoplazma kontaminasyonunun belirlenmesi için poliklonal antikor içeren ELISA ticari kit kullanılmıştır. Yöntem diğer yöntemlerde pozitif çıkan hücre hatlarının kontaminasyonunu doğrulayarak türe özgü olması nedeniyle hücre hatlarının sırasıyla *M.arginini* ve *M. orale* türleri ile kontamine olduğu uygulayıcılar tarafından tespit edilmiştir. Mikoplazma pozitif çıkan hücre hatlarının kontaminasyonu, katı besiyeri üzerinde tipik mikoplazma kolonileri tespit edildiği için kültür yöntemiyle de aynı şekilde doğrulanmış ve diğer hücre dizileri ve serumdaki negatif sonuç da bakteriyolojik kültür yöntemi ile teyit edilerek diğer yöntemlerle paralel bulunmuştur. Japonnya’da yapılan başka bir çalışmada insanlarda *M.pneumoniae* teşhisinde LAMP ve PCR testleri arasındaki paralellik serolojik olarak desteklenerek ortaya konmuştur (Gotoh ve diğerleri, 2012).

 Birçok hastalığa karşı bağışıklığın yeterli olmadığı veya gelişmediği durumlarda hiperimmun serumlar kullanılmaktadır. Bilinçli olarak aktif şekilde immunize edilen donör canlının serumu veya hastalığı geçirmiş olup doğal aktif bağışıklığı yüksek olan canlının serumu yüksek dozda antikor içerdiği için hastalıklara karşı koruma ve tedavide kullanılmaktadır. Birçok hastalığa karşı ticari biyolojik ürün olarak hiperimmun serum mevcuttur.

Bu ürünler koruma ve tedavide kullanılan diğer biyolojik ürünlere kıyasla daha çabuk ve özgü yanıt oluşturmaktadır. Ruminant grubu hayvanlarda çok katmanlı sindesmokoryal plasenta yapısı olduğundan anneden yavruya plasenta yolu ile antikor geçişi sağlanamaz. Yenidoğan ruminant grubu hayvanlara yalnızca ağız sütü ile mevcut oranda maternal antikor geçişi olur. Ruminantlarda *C. perfringens* ve *E. coli* bakterilerinin sebep olduğu enterotoksemiye karşı yeterli ve kaliteli ağız sütü alınmadığı takdirde ölüm meydana gelir. Bu sebeple çoğu zaman yenidoğan hayvanlara immunize edilmiş, yüksek antikor titresine sahip, toksini nötralize edebilen, steril hiperimmun serum uygulanmaktadır. Bu uygulama ağız sütü ile yeterli miktarda antikor alamayan veya alsa bile çevredeki mikroorganizmalara fazla maruz kalan yenidoğan ruminantlarda hayat kurtarıcı bir uygulamadır. Hiperimmun serumların içerik açısından oldukça zengin oluşu ürünü kontaminasyona daha açık hale getirir. Bu sebeple hiperimmun serumların sterilitesi, aşılar ve diğer biyolojik ürünlerde olduğu gibi oldukça önemlidir. Kontaminasyonu tespit etmede serolojik testlerin genellikle tercih edilmemesinin sebebi maliyetli oluşu ve indirekt sonuç vermesidir. Bu çalışma planlanmadan önce ve sonrasında yapılan literatür taramalarında hiperimmun serumlarda *Mycoplasma* sp. kontaminasyonunu hem moleküler hem de bakteriyolojik kültür yöntemleri ile kıyaslamalı olarak gerçekleştiren başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmada amaç hiperimmun serumların *Mycoplasma* sp. cins yönünden belirlenmesini üç farklı yöntem ile kıyaslamak ve yöntemlerin uygulanabilirlik yönünü ve hassasiyetini belirlemekti. Title 9 of the Code of Federal Regulations (9 CFR) tarafından altın standart olarak belirlenen bakteriyolojik kültür ile teşhis yöntemi şu an kabul görülen ve rutinde uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemin ölü veya kültürlenemeyen mikroorganizmaları tespit edememesi ve sonuçlanması için daha uzun sürelere ihtiyaç duyulması pratiklik ve özgüllük açısından uygun bulunmamıştır. Moleküler yöntem olarak çalışılan LAMP yöntemi ise diğer yöntemlere kıyasla daha kısa sürede sonuç vermesine rağmen fazla sayıda primer kullanımı, amplifikasyonun oluşması için yoğun miktarda dNTP’ye ihtiyaç duyması, çok sık kullanılmayan DNA polimeraz Bstenziminin kullanılması gibi sebeplerden uygulanabilirliği zor olarak kabul edilmiştir. Ayrıca tüm pozitif örnekleri tespit edememesinden dolayı yeterince duyarlı bulunmamıştır.

 Bir diğer moleküler teşhis yöntemi olarak çalışılan PCR ise ortalama 4-6 saatlik bir sürede sonuç vererek diğer yöntemlere kıyasla daha pratik ve uygulanabilir olduğu tecrübe edilmiştir. PCR yöntemi diğer yöntemlerin belirleyemediği ölmüş veya çok az miktarda olan mikoplazma kontaminasyonunu saptaması nedeniyle diğer yöntemlere kıyasla daha spesifik, duyarlı ve güvenilir olduğu belirlenmiştir.

Serumların biyolojik materyal olarak çeşitli ortamlara ara ürün olarak katılması, koruma ve tedavi amacıyla üretilerek direkt canlıya uygulanması ve içerik olarak oldukça zengin olması gibi çeşitli sebeplerden dolayı bu ürünlerin mikoplazma kontaminasyonu açısından kontrol edilmesi gerekmektedir.

Bu sebeple serumlarda meydana gelen kontaminasyonu, kontaminasyon kaynağını ve prosesin etkeni eliminasyonda başarılı olup olmadığını tespit etmek için hem moleküler hem de bakteriyolojik kültür yöntemlerinin paralel olarak çalışılması oldukça önemlidir.

# **SONUÇ**

Bu araştırmada sığırların aktif immunizasyonu ile elde edilen hiperimmun serumlarda mikoplazma kontaminasyonunun belirlenmesinde bakteriyolojik kültür, PCR ve LAMP analiz yöntemleri işlem görmemiş serumlar, final ürün aşaması için proses edilmiş serum ve deneysel olarak mikoplazma ile kontamine edilen serumlar kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelendi.

Kontrollü koşularda deneysel kontamine örneklerle yapılan çalışmalarda altın standart olarak kabul edilen bakteriyolojik kültürün 103 hücreye kadar canlı mikoplazmayı tespit edebildiği saptanırken PCR’ın aynı düzeyde teşhis değeri olduğu belirlendi. LAMP’ın duyarlılığı ise bu iki yöntemden bir logaritma daha düşük olduğu bulundu. Ayrıca araştırma boyunca yapılan denemeler LAMP tekniğinin tekrarlanabilirliğinin düşük olduğunu ve aynı örnekte bile pozitiflik düzeylerinin değişebildiğini gösterdi. Moleküler teşhis amacıyla kullanılan testler için yapılan DNA ekstraksiyonlarında en yüksek ve saf DNA içeriği klasik Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi ile elde edildi. Farklı sığırlardan elde edilmiş hiperimmun serumlar optimize edilen yöntemlerle incelendiğinde en yüksek oranda mikoplazma teşhisini PCR’ın saptadığı ve LAMP’ın ise yaklaşık yarısında pozitif sonuç verdiği belirlendi. Bakteriyolojik kültür ile hiçbir örnekten izolasyon yapılmamıştır.

Bu bulgular ticari amaçla kullanılan hiperimmun sığır serumlarında mikoplazma kontaminasyonunu belirlemek için en uygun yöntemin PCR olduğunu gösterdi. Ayrıca hiperimmun serumlarda muhtemelen latent mikoplazma varlığından kaynaklanan kontaminasyonun sıkça oluştuğu ancak bunun final ürün eldesi aşamasında uygulanan işlemlerle giderildiği belirlendi.

**KAYNAKLAR**

Ahmed, F.E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20, 215-223.

Alhaji, N.B., Ankeli, P. I., Ikpa, L.T., Babalobi, O.O. (2020). Contagious bovine pleuropneumonia: challenges and prospects regarding diagnosis and control strategies in Africa. *Veterinary Medicine*, 11, 71-85. doi:10.2147/vmrr.s180025

Andrea, E.L., Rebanta, K.C., Anthony, L.P.S. (2022). *Mycoplasma Infections*. Treasure Island: StatPearls Publishing.

Appelt, S., Aly, S.S., Tonooka, K., Glenn, K., Xue, Z., Lehenbauer, T.W., Marco, M.L. (2018). Development and comparison of loop-mediated isothermal amplification and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Journal of Dairy Science*, 102, 1-12. doi.org/10.3168/jds.2018-15306

Arı, Ş. (2004). DNA’ nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması. G. Temizkan, N. Arda (Ed.), *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler* içinde (ss.101-120). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Ayling, R. D., Nicholas, R. A. J., Johansson, K. E. (1997). Application of the polymerase chain reaction for the routine identification of *Mycoplasma bovis. Veterinary Record*,141, 307-308. doi:10.1136/vr.141.12.307

Baird, S.C., Carman, J., Dinsmore, R.P., Walker, R.L., Collins, J.K. (1999). Detection and identification of mycoplasma from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*,11, 432-435. doi:10.1177/104063879901100507

Baron, S. (1996). *Medical Microbiology* (4th Ed.). Galveston: University of Texas Medical Branch.

Barrington, G.M. (2001). Bovine neonatal immunology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17, 463-76.

Barragry, T.B. (1994). *Veterinary Drug Therapy*. Philadelphia: Lea and Febinger.

Bergonier, D., Berthelot, X., Poumarat, F. (1997). Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Revue Scientifique et Technique*, 16, 848-873.

Chase, C.C.L., Hurley, D. J., Reber, A. J. (2008). Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccines response. *Veterinary* *Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24, 87-104.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1, 581-5. doi: 10.1038/nprot.2006.83

[Clover, C.K](https://europepmc.org/search?query=AUTH%3A%22Clover%20CK%22)., [Zarkower, A](https://europepmc.org/search?query=AUTH%3A%22Zarkower%20A%22). (1980). Immunologic responses in colostrum-fed and colostrum deprived calves. *American Journal of Veterinary Research*, 4, 1002-1007.

Cooper, A.C., Fuller, J.R., Fuller, M.K., Whittlestone, P. and Wise, D.R. (1993). In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance. *Research in Veterinary Science*, 54, 329-334.

Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (2015). *Immunologicals*. EMA/CVMP/IWP/206555/2010-Rev.1 3. European Medicines Agency’s comittee.

Diker, K. S. (2005). *İmmunoloji* (2.baskı). Ankara: Medisan.

Done, S. H., Nicholas R. A. J., Palmer, N. (1995). Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP): an emerging disease in Europe. *Cattle Practice*, 2, 1-8.

Dvorakova, H., Valicek, L., Reichelova, M. (2005). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. *Journal of Veterinary Medicine*, 50, 262-8.

Drexler, H.G., Uphoff, C.C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39, 75-90.

Firth, M. A., Shewen, P. E., Hodgins, D. C. (2005). Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Animal Health Research Reviews*, 6,143-158. doi:10.1079/ahr2005107

Fisher, S.G., Lerman, L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with theory. *Proceedings* *of the National Academy of Sciences*,80, 1579-1583.

Fulton, R. W., Briggs, R. E., Payton, M. E., Confer, A. W., Saliki, J. T., Ridpath, J. F., … (2004). Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine*,22, 643-649. doi:10.1016/j.vaccine.2003.08.033

Gioia, G., Werner, B., Nydam, D. V., Moroni, P. (2016). Validation of a mycoplasma molecular diagnostic test and distribution of *Mycoplasma* species in bovine milk among New York State dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 99, 4668-4677. doi:10.3168/jds.2015-10724

Gotoh, K., Nishimura, N., Ohshima, Y., Arakawa, Y., Hosono, H., Yamamoto, … (2012). Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and serology in pediatric community-acquired pneumonia. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18, 662-667. doi:10.1007/s10156-012-0388-5

Hagiwara, K., Kataoka, S., Yamanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H. (2000). Detection of cytokines in bovine colostrum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76, 183-190. doi:10.1016/s0165-2427(00)00213-0

Hale, H.H., Helmboldt, C.F., Plastridge, W.N., Stula, E.F. (1962). Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Veterinary*,52, 582-591.

Hannan, P.C.T. (2000). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibition concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species. *Veterinary* *Research*,31, 373-395.

Hay, R. J., Macy, M. L., Chen, T. R. (1989). *Mycoplasma* infection of cultured cells. *Nature*,339, 487-488. doi:10.1038/339487a0

Husband, A. J., Lascelles, A. K. (1975). Antibody responses to neonatal immunisation in calves. *Research in Veterinary Science*, 18, 201-207. doi:10.1016/s0034-5288(18)33614-2

Ingebritson, A. L., Gibbs, C. P., Tong, C., Srinivas, G. B. (2014). A PCR detection method for testing mycoplasma contamination of veterinary vaccines and biological products. *Letters in Applied Microbiology*, 60, 174-180. doi:10.1111/lam.12355

Jaÿ, M., Tardy, F. (2019). Contagious agalactia in sheep and goats: Current Perspectives. *Veterinary Medicine*, 10, 229-247. doi:10.2147/vmrr.s201847

Kahya, S., Büyükcangaz, E., Carlı, K. T. (2013). Polimeraz zincir reaksiyonu optimizasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32, 31-38.

Kampen, A. H., Olsen, I., Tollersrud, T., Storset, A. K., Lund, A. (2006). Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113, 53-63*.* doi:10.1016/j.vetimm.2006.04.001

Kirby, F.D., Nicholas, R.A.J. (1996). Isolation of *Mycoplasma bovis* from bullocks’ eyes. *Veterinary Record*,138, 552.

Kong, H., Volokhov, D.V., George, J., Ikonomi, P., Chandler, D., Anderson, C. and Chizhikov, V. (2007). Application of cell culture enrichment for improving the sensitivity of mycoplasma detection methods based on nucleic acid amplification technology (NAT). *Applied Microbiology and Biotechnology*,77, 223-232.

Krass, C. J., Gardner, M. W. (1973). Etymology of the term *Mycoplasma*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23, 62-64. doi:10.1099/00207713-23-1-62

Kreusel, S., Bocklisch, H., Pfützner, H., Brys, A., Leirer, R., Ziegenhals, U. (1989). Experimentelle infektionen von bullen mit *Mycoplasma bovis* und *Mycoplasma bovigenitalium*. *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin*,43, 705-712.

Laak, E. A., Noordergraaf, J. H., Boomsluiter, E. (1992). The nasal Mycoplasmal flora of healthy calves and cows. *Journal of Veterinary Medicine*,Series B,39, 610-616*.* doi:10.1111/j.1439-0450.1992.tb01212.x

Lee, C.-S., Wooding, F. B. P., Kemp, P. (1980). Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *Journal of Dairy Research*,47, 39. doi:10.1017/s0022029900020860

Lerman, L.S., Beldjord, C. (1999). Comprehensive mutation detection with denaturing gradient gel electrophoresis. In: R.G.H. Cotton, E. Edkins, S. Forrest (Eds.), *Mutation* *Detection* (pp. 35-61). New York: Oxford University Press.

Mao, X. Z., Li, S. Z., Zhu, Z. K., Qin, W. L. (1994). The development changes and correlations of some blood hormone levels and immune indexes during the postnatal period in neonatal calves. *Journal of Veterinary Medicine*,Series A, 41, 405-412. doi:10.1111/j.1439-0442.1994.tb00107.x

Markoullis, K., Bulian, D., Hölzlwimmer, G., Quintanilla-Martinez, L., Heiliger, K.-J., Zitzelsberger, H., …. (2008). *Mycoplasma* contamination of murine embryonic stem cells affects cell parameters, germline transmission and chimeric progeny. *Transgenic Research*, 18, 71-87*.* doi:10.1007/s11248-008-9218-z

Masiga, W.N., Domenech, J., Windsor, R.S. (1996). Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Revue Scientifique et Technique*, 15, 1283-1303. doi:10.20506/rst.15.4.980

McAuliffe, L., Ellis, R.J., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J. (2003). Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresisfingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4844-4847.

McAuliffe, L., Ellis, R.J., Miles, K., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J. (2006). Biofilm formation by *Mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*,152, 913-922.

McGarrity GJ, Kotani H. (1985). Cell culture mycoplasmas. In: S. Razin, M.F. Barile (Eds.), *The Mycoplasmas*, *Vol. IV* (pp. 353-390). New York: Academic Press.

Migliore, S., Puleio, R., Nicholas, R. A. J., Loria, G. R. (2021). *Mycoplasma agalactiae:* The sole cause of classical contagious agalactia? *Animals*, 11, 1782. doi:10.3390/ani11061782

Miles, R.J. (1992). Catabolism in *Mollicutes*. *Journal of General Microbiology*,138*,* 1773- 1783.

Kazemiha, V.H., Bonakdar, S., Amanzadeh, A., Azari, S., Memarnejadian, A., Shahbazi, S., Shokrgozar, M.A., Mahdian, R. (2015). Real-time PCR assay is superior to other methods for the detection of mycoplasma contamination in the cell lines of the national cell bank of Iran. *Cytotechnology*, 68, 1063-1080*.* doi:10.1007/s10616-015-9862-0

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T. (2001). Detectionof loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*,289, 150-154.

Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinions in Microbiology*,2, 317-322.

 National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2020). NCBI Taxonomy: a compherensive update on curation, resources and tools. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=2092&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> adresinden erişildi.

Newton, L.G., Norris, R. (2000). *Clearing a Continent: The Eradication of Bovine Pleuropneumonia From Australia.* Collingwood, Australia: CSIRO Publishing.

Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D. (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis and control. *Research in Veterinary Science*,74, 105-112.

Nicholas, R., Ayling, R., McAuliffe, L. (2008). Mycoplasma Diseases of Ruminants. *Centre for Agriculture and Bioscience International* (CABI), Wallingford, UK.

Nicholas, R.A.J., Fox, L.K., Lysnyansky, I. (2016). Mycoplasma mastitis in cattle: to cull or not to cull. *The Veterinary Journal*, 216, 142-147. doi:10.1016/j.tvjl.2016.08.001

Nikfarjam, L., Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of *Mycoplasma* contamination in cell culture. [*Cell Journal*,](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3584481/) 13, 203-212.

Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., Kanda, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53, 1-5.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, 7.

OIE (2004). Contagious caprine pleuropneumonia. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. (pp. 503-514). Paris: Office International des Epizooties.

Pfützner, H. (1990). Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, 20, (*Supplement)* 394-399.

Pfützner, H., Sachse, K. (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders. *Revue Scientifique et Technique*,15, 1477-1494.

Razin, S. (1978). The mycoplasmas. *Microbiological Review*,42, 414-470.

Razin, S. (1991). The genera *Mycoplasma, Ureaplasma, Acholeplasma, Anaeroplasma*, and *Asteroplasma.* In: A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes*, *Vol. 2*, (2nd Ed.). (pp. 1937-1959). New York: Springer-Verlag.

Razin, S., Yogev, D., Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,62*,* 1094-1156.

Razin, S., Hermann, R. (2002). *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Razin, S., Hayflick L. (2010). Highlights of mycoplasma research an historical perspective. *Biologicals*,38, 183-190.

Reber, A. J., Hippen, A. R., Hurley, D. J. (2005). Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures. *American Journal of Veterinary Research*,66, 1854-1860. doi:10.2460/ajvr.2005.66.1854

Reber, A. J., Lockwood, A., Hippen, A. R., Hurley, D. J. (2006). Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Veterinary Immunology and Immunopathology*,109, 139-150. doi:10.1016/j.vetimm.2005.08.014

Rodwell, A.W., Mitchell, A. (1979). Nutrition, growth and reproduction. In M.F. Barile, S. Razin (Eds.), *The Mycoplasmas, Vol. 1.* (pp. 103-113). New York: Academic Press,

Roux, K.H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research*, 4, 185-194.

Saiki, K.R., Gelfand, H.D., Stoffi, S., Scharf, J.S., Higuchi, R., Horn, T.G. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

Saiki, K.R., Walsh, P.S., Leverson, C.H., Erlich, H.A. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-spesific oligonucleotide probes. *Proceedings of National Academic Sciences*, 86, 6230-6234.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed.), *Vol. 1.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sladek, T.L. (1986). A hypothesis for the mechanism of mycoplasma evolution. *Journal of Theoretical Biology*,120, 457-465*.* doi:10.1016/s0022-5193(86)80039-x

Soheily, Z., Soleimani, M., Majidzadeh, A. K. (2019). Detection of mycoplasma contamination of cell culture by a loop-mediated isothermalamplification method. *Cell Journal*, 21, 43-48. doi: 10.22074/cellj.2019.5624.

Şen, A. (2019). *Veteriner İmmunoloji* (2. Baskı). Bursa: Dora Yayınevi.

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3, 877-882.

Turner, P., Mclennan, A., Bates, A., White, M. (2007). *BIOS* *Instant Notes in Molecular Biology*. Taylor & Francis e-Library.

Uphoff, C.C., Gignac, S.M., Drexler, H.G. (1992). Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. *Journal of Immunological Methods*,149, 43-53.

Uphoff, C.C., Brauer, S., Grunicke, D., Gignac, S.M., Macleod, R.A.F., Quentmeier, H., Steube, K., … (1992). Sensitivity and sensitivity of five different mycoplasma detection assays. *Leukemia*, 6, 335-341

Uphoff CC, Drexler HG. (2002). Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal*, 38, 79-85.

Uphoff, C. C., Drexter, H. G. (2011). Detecting *Mycoplasma* contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Cancer Cell Culture*, 731,93-103. doi:10.1007/978-1-61779-080-5\_8

Uphoff, C. C., Drexter, H. G. (2014). Detection of *Mycoplasma* Contamination in Cell Cultures. *Current Protocols in Molecular Biology*, 106, 28.4.1-28.4.14. doi:10.1002/0471142727.mb2804s106

Volokhov, D.V., Graham, L.J., Brorson, K.A., Chizhikov, V.E. (2011). Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: review of alternative non-microbiological techniques. *Molecular and Cellular Probes*, 25, 69-77.

Wisher, M. (2002). Biosafety and product release testing issues relevant to replication-competent oncolytic viruses. *Cancer Gene Therapy*, 9, 1056-1061. doi:10.1038/sj.cgt.7700536

Wittwer, C.T., Fillmore. G.C., Garling, D.J. (1990). Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Analytical Biochemistry*, 186, 328-331.

**ÖZGEÇMİŞ**

**Soyadı, Adı** : YAVUZ, Ufuk

**Uyruk** : T.C.

**Doğum yeri ve tarihi** : Osmangazi/BURSA -1994

**Telefon** : 05455742995

**E-mail** : yvz.ufuk11@gmail.com

**Yabancı Dil** : İngilizce

**EĞİTİM**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Derece** | **Kurum** |  **Mezuniyet Tarihi** |  |
| **Y. Lisans** | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ABD  |  Devam |  |
| **Lisans** | Yakın Doğu Üniversitesi Veteriner Fakültesi |  2018 |  |

**İŞ DENEYİMİ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Yıl** | **Yer/Kurum** | **Ünvan** |

2018-Devam Ediyor İZMİR/ATAFEN Veteriner Hekim