

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AFYONKARAHİSAR VE ÇEVRESİNDE YETİŞTİRİLEN
TİCARİ TAVUKLARDA *MYCOPLASMA GALLİSEPTİCUM*'A
KARŞI OLUŞAN SERUM ANTİKOR DÜZEYLERİNİN LAM
AGLUTİNASYON TESTİ (LAT) VE ELISA İLE
KARŞILAŞTIRMASI**

Vet. Hek. Adil Ekrem HARMANDAR

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Beytullah KENAR

Tez No: 2012-019

2012-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

ÜNİVERSİTE

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma Tarihi: 11.09.2012

Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

Doç. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU

Yard. Doç. Dr. Beytullah KENAR

Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi olan Adil Ekrem HARMANDAR'ın "Afyonkarahisar ve Çevresinde Yetiştirilen Ticari Tavuklarda *Mycoplasma Gallisepticum*'a Karşı Oluşan Serum Antikor Düzeylerinin Lam Aglutinasyon Testi (LAT) ve ELISA ile Karşılaştırması." Başlıklı tezi 14/09/2012 günü saat 11:15 'de lisansüstü eğitim ve öğretim sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kağan ÜÇOK

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Afyon ve çevresindeki hızla büyümekte ve gelişmekte olan, ticari üretim yapan kanatlı çiftliklerinde, *Mycoplasma gallisepticum* yönünden ilk serolojik tarama çalışması olmasından dolayı önem arzeden bu çalışmada ilgi ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Yrd. Doç. Dr. Beytullah KENAR'a, Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU'na, ayrıca araştırmamın yapılmasında ve saha çalışmalarımda katkıda bulunan Vet. Hek. Celalettin ÇANKAYA'ya ve çalışma arkadaşlarıma, Eşim ve biricik kızım Elif'ime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	1
Önsöz.....	ii
İçindekiler.....	iii
Çizelgeler Listesi.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	2
3. MATERYAL VE METOT.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Serum Örnekleri.....	17
3.1.2. Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları.....	17
3.1.3. Boyalı Plate Test Antijeni.....	17
3.1.4. ELISA KİTİ.....	17
3.2. Metot.....	17
3.2.1. Serum Örnekleri.....	17
3.2.2. Lam Aglütinasyon Testi.....	18
3.2.3. ELISA Testi.....	18
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA.....	22
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	26
ÖZET.....	27
SUMMARY.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	29
KAYNAKLAR.....	30

ÇİZELGELER LİSTESİ

Tablo 1.	Yetiştirme yönünden tavukların bilgileri ve yapılan test sonuçları	20
Tablo 2.	Lam aglütinasyon testi (LAT) ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması	21

1. GİRİŞ

Kümes hayvanları yetiştiriciliği dünyada olduğu gibi yurdumuzda da her geçen gün hızla gelişmekte, değişen teknolojik yenilikler ve üretim tecrübeleri sayesinde kümes idare yönetiminin düzelmesi ile doğru orantılı olarak verimlerdeki artış ve üretimdeki kalite hızla artmaktadır. Kümes hayvanları yetiştiriciliğindeki bu gelişmeler ışığında özellikle sayıları bakımından fazla bulunan tavuk ve hindilerdeki hastalıklar, başta ekonomik kayıpları beraberinde getirmesi ile daha çok önem arz etmektedir.

Kanatlı hayvanların solunum yolu enfeksiyonlarından, tavuklarda Kronik Solunum Yolu Hastalığı/Chronic Respiratory Disease (CRD), hindilerde enfeksiyöz sinuzitis olarak bilinen ve etkeni mikoplazmozis olan bu hastalık sinsi ilerleyen ve ekonomik kayıplara sebep olan solunum yolu problemlerinden biridir (Güler, 1995).

Solunum kaynaklı olan Koliseptisemisi de diğer önemli bir hastalıktır. (Barnes ve ark, 2003)

Etkili bir aşılama programının olmadığı CRD enfeksiyonlarında hastalıktan korunmanın ilk koşulu, sağlıklı ve enfeksiyondan arı damızlık sürülerinin oluşturulmasıdır. Bu amaç ve ayrıca sürülerde bulunan gizli infekte ve portör hayvanların saptanmasıyla, sürülerin CRD durumunu ortaya koymak amacı ile serolojik testlerden yaygın olarak yararlanılmaktadır (Esendal, 1991).

Bu çalışmada Afyonkarahisar ve çevresindeki ticari broiler, broiler damızlık ve ticari yumurtacı işletmelerinden elde edilen serum örneklerinde *M. gallisepticum*'a karşı oluşan antikorların varlığının çeşitli serolojik testlerle Lam Aglutinasyon Testi / Rapid Serum Agglutination (LAT-RSA) ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) karşılaştırmalı olarak yapılması hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİ

Kanatlıların solunum sistemi hastalıklarından biri olan, etkeninin *Mycoplasma gallisepticum* (MG) olduğu belirtilen CRD enfeksiyonu; hırıltılı solunum, öksürük, sinüzit ve burun akıntısı ile karakterize ve bazı durumlarda tortikollis gibi sinirsel belirtilerle seyreden veya hiçbir klinik belirti göstermeksizin meydana gelen kronik seyirli bir hastalık olduğu bildirilmiştir (Eving ve ark, 1996; Kempf ve ark, 1997).

Nocard ve Roux tarafından, sığırların Pleuro Pneumonia Like Organism (PPLO) etkeni olarak mycoplasmalar izole edilerek, hakkındaki ilk çalışma 1898 yılında PPLO, *Asterococcus*, *Anulomyces* olarak bildirilmiştir, bunu 1905 yılında İngiltere’de Dodd tarafından hindilerde yapılan çalışmada ‘epizootik pnömoenteritis’ adı altında bildirilmiş ve aynı hastalık 1926 yılında Tyzzar tarafından ABD’de saptanmıştır. 1929 yılında *Mycoplasma* adı altında toplanmıştır. Tavuklarda *Mycoplasma* spp. etkeni izolasyonu ilk kez 1930’lu yıllarda Nelson tarafından yapılmış 1935 yılında Nelson nezleli tavukların, burun akıntularından hazırladığı preparatlarda mikroskopik incelemesi sonucu; kokobasil şeklinde mikroorganizmalar gözlediğini, bu mikroorganizmaların doku kültürü ve embriyolu yumurtalar ile besi yerlerinde üretilbilmesine karşın, agar üzerinde tipik üreme elde edilemediğini bildirmiştir. 1936’da yılında bu kokobasil formlu mikroorganizmaların 0,5 µ veya daha küçük çapta olduklarını, direk temasla tavuklarda kronik seyirli bir enfeksiyon oluşturduklarını lakin bu enfeksiyonun *Haemophilus gallinarum*’dan ileri gelen nezleden daha uzun süren bir inkübasyon süresi olduğunu bildirmiştir, ve bu kokobasili “Nelson kokobasili” olarak adlandırmıştır. Dickinson ve Hinshaw 1938’da hindilerde mortalitesi düşük, morbiditesi %10-90 arasında değişen hastalığı, vitamin A eksikliğinden kaynaklanan sinüs yangısından ayırt etmek için, “İnfeksiyöz Sinüzitiz” olarak adlandırmışlardır (Yoder ve ark, 1964; Kleven, 1987; Salami ve ark, 1992).

Kanatlı hayvanlarda gelişen vakalar 1943 yılında, Delaplane ve Stuart tarafından “Kronik Respiratorik Hastalık” olarak tanımlanmıştır. Hastalık etkenini

embriyolu tavuk yumurtalarında üretmişler, ancak, etkenin hücre dışı besiyerlerinde ürememesi ve enfekte sarı keselerinden hazırlanan boyalı preparatlarda görülebilmesi nedeniyle, bunun bir virüs olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Van Herick ve Eaton 1945 yılında embriyolu tavuk yumurtalarından izole ettikleri pleuropneumoni benzeri bir mikroorganizmayı *PPLO* besiyerlerinde üretmişler; fakat bunun, tavukların CRD'si ile ilişkisini ortaya koyamamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, kanatlı *PPLO*'larının tavuk eritrositlerini aglutine ettiklerini ve bu reaksiyonun enfekte tavuk serumları tarafından inhibe edilebildiğini bildirmişlerdir. Delaplane 1948 yılında CRD etkeni olarak bildirdiği virusun üretilmesi için 7 günlük embriyolu tavuk yumurtalarının en uygun ortam olduğunu, inokulasyon yapılan yumurtalarda embriyoların karaciğer, böbrek ve beyinlerinde hemorajilerle birlikte purulent bir yangı ve korioallantoik membranda da beyazımsı odakların şekillendiğini bildirmiştir. Etkenin hücre dışı besiyerlerinde de üreyebildiklerini *Chlamydia*, *Rickettsia* veya virus olmadığını açıklamak için 1952 yılında araştırmacılar, Markham ve Wong ile 1953 yılında Van Roekel ve Olesluk'un , besiyerlerinde ürettikleri *PPLO*' nun tavukların CRD ve hindilerin infeksiyöz sinüzitisi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Yoder ve ark, 1964; Delaplane ve ark, 1984) .

1953 yılında, tavuklarda CRD ve hindilerde infeksiyöz sinüzitis etkenlerinin streptomisin'e duyarlı ve kloromisetin'e dirençli olmaları nedeniyle *Rickettsia*'lardan; yine streptomisin'e duyarlı ve penisilin'e dirençli olmalarıyla da *Chlamydia*'lardan ayrıldıklarını bildirmişlerdir (Gross W.P. ve Johnson E.P., 1953)

Ülkemizde CRD enfeksiyonunun varlığı ilk kez Özkal tarafından 1956 yılında bildirilmiştir. Atılgan ve ark. (1967), inceledikleri 415 tavuk serumunun 130'unda (%31.3) pozitiflik saptadıklarını, Esenal (1991) Ankara çevresinde incelenen 900 tavuk serumunun LAT ile 182 (%20.22), Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) testi ile 128 (%14.22), Agar Jel Presipitasyon (AGP) testi ile 51 (%5.67), ELISA testi ile de 543 (%60.35) pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir. Bursa ve çevresinde incelenen 137 tavuğa ait örneklerden 15 (%11)'inde *M. gallisepticum* izole edilmiş, incelenen 499 kan serumundan, lam aglutinasyon testi ile 242 (%49)'si, HI testi ile 263 (%53)'ünde

pozitiflik saptadığını bildirmiştir (Ülgen, 1991). Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüleri'nde tanısı konan hastalıklar arasında yaklaşık %19'luk bir oranla CRD'nin ilk sırada olduğu, özellikle 33 işletmede yapılan serolojik incelemelerde LAT testi ile 20 (%60)'sinin HI testi ile ise 6 (%18)'sının pozitif sonuçla tespit edildiği bildirilmiştir (Güler, 1992).

1954 yılında Yoder ve Hofstad ile White ve arkadaşları 1955 yılında Gianforte ve arkadaşları, kanatlılardaki solunum yolu enfeksiyonu ile ilişkili PPLO'ların tek bir patojenik serotip olarak tanımlanmadığını bildirmişlerdir. 1956 yılında Edward ve Freundt kanatlı orjinli PPLO'ların klasifikasyonu için yeni bir düzenleme yapılmasını, 1957 yılında Freundt "Bergeys Manuel of Determinative Bacteriology" nin 7. baskısında, Mycoplasmatales takımının Mycoplasmataceae familyasında sadece Mycoplasma cinsi bulunduğunu ve kanatlı orijinli tek türün Mycoplasma gallinarum olduğunu yayınlamıştır.

Yapılan araştırmalarda çeşitli serotiplerin olduğu bildirilmiştir. 1958 yılında Yamamoto ve Adler tarafından serotip I, II, III, IV ve V bildirilmiş, 1960 yılında Kleckner tarafından serotip sayısı; serotip A, B, C, D, E, F, G, ve H olarak 8 adet bildirilmiştir (Yoder HW. ve Hofstad MS., 1964). Tavuklarda CRD ve hindilerde infeksiyöz sinusitis'e sebep olan patojenik *M. gallisepticum* ve nonpatojenik olan *M. iners* Edward ve Kanarek tarafından 1960'da bildirilmiş, yine aynı yıl MG 'nin A serotipine *M. iners*'in G serotipine, *M. gallinarum* 'un B serotipine ait olduğu bildirilmiştir (Fabricant, 1960).

Chalquest ve Fabricant'ın infeksiyöz sinovitisli hayvanlardan izole ettikleri suşu; *M. synoviae* olarak Olson ve ark. (1965) tarafından adlandırılmıştır. N suşu olarak Adler'in bildirdiği izolata da *M. meleagridis* olarak adlandırılmıştır. 20 kadar kanatlı Mycoplasma serotipi izole ve identifiye edildiği bildirilmiştir (Kleckner, 1960; Stuart ve Bruins, 1963; Hofstad ve ark, 1984)

Genetik çalışmaların ilerlemesi ile MG suşlarının 3 grupta toplanılabileceğini; birinci grupta virulensleri farklılık gösteren, aşılarda kullanılan

F suşu ve eprüvasyon çalışmalarında kullanılan R suşu ve A5969 suşları. İkinci grupta, varyant M876, 503, Y5, Y9 gibi benzer protein bantları içeren suşların olduğunu ve üçüncü grupta da ördek, kaz, keklik gibi çeşitli konaklardan izole edilen suşların olduğu bildirilmiştir (Stipkovits ve Kempf, 1996).

Mycoplasma serotiplerinden, *Mycoplasma gallisepticum* (serotip-A), *Mycoplasma meleagridis* (serotip-H), *Mycoplasma synoviae* (serotip-S) ve son yıllarda da *Mycoplasma iowae*'nin kanatlı yetiştiriciliği bakımından önemli yer edindikleri araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Lauerma ve ark., 1995; Hartup ve ark, 2001).

“Bergeys Manuel of Determinative Bacteriology” nin 9. baskısında (1994) *Mycoplasma gallisepticum*, Mollicutes sınıfının Mycoplasmatales takımındaki Mycoplasmataceae familyasında bulunan Mycoplasma cinsine ait bir tür olarak yer almaktadır.

MG yaklaşık olarak 03-05 µm çap boyutlarında, hücre duvarı bulunmamasından ötürü oval, halka, yüzük, filamentöz, kokoid veya yıldız şeklinde, gram negatif, kapsülsüz, sporsuz, pleomorfik yapıda bir bakteridir (Yoder, 1988; Ley D.H. ve Yoder H.W., 1997). Gram negatif olan etkenin, Anilin boylarla güç boyanmasından dolayı; Stamp, Dienes, Giemsa, Castenada ve Macchiavello boyama yöntemleriyle boyandığı, özellikle Giemsa ile iyi boyanarak mavi mor renkte görüldüğü bildirilmiştir (Yoder, 1988; Esendal, 1991; Fritz ve ark., 1991).

Mycoplasmalar da hücre duvarı bulunmadığı halde 3 katmanlı kolesterol veya karatenoid yapıda bulunan sitoplazmik bir membranla çevrilidir. Stoplazmik membranlarında bakterilerde bulunan N-asetil muramik asit ve N-asetil glukozamin moleküllerinin olmaması ile hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotiklere karşı duyarsız olup özellikle mikoplasma besi yerlerine, penisilin ve talyum asetatın bakteriyel kontaminasyon olmaması için eklenebildikleri bildirilmiştir (Yoder, 1988, Boguslavsky ve ark, 2000).

M. gallisepticum'da diğerk mycoplazmalardan farklı ünitmembran üzerinde bulunan çıkıntılar sayesinde hemaglutinasyon oluşturabildikleri bildirilmiştir (Arda M., İzgür M., 1984; Quinn ve ark, 1994). *M. gallisepticum*'un kobay, tavuk ve hindi eritrositlerini aglutine edici etkisi olduğu, besi yerlerine eklenen at kanını ise tam hemoliz ettiği araştırmacılar tarafında bildirilmiştir (Timoney ve ark., 1988; Türkaslan ve Salihoğlu, 1989; Liu ve ark, 2001).

Besi yerlerinde, *M. gallisepticum* aerobik ve fakültatif anaerobik olduğu, üretilebilmesi için ortamda kolesterole ihtiyaç duyduğu ve besi yerlerine at, kanatlı ve donuz serumlarının ilave edilebileceği, PPLO buyyon, PPLO agar, fenol red maltoz buyyon, beyin-kalp infuzyon buyyonu, Brucella agar veya buyyonu gibi besi yerlerine %10-15 oranında serum ve çeşitli suplementlerden zenginleştiricilere ihtiyaç olduğu, ayrıca üremeyi güçlendirmek için, besi yerlerine maya otolizatu/ekstraktı gibi ürünlerin ilavesi gerektiği bildirilmiştir (Edward, 1947; Adler ve Yamamoto, 1956; Colusi, 1963; Ahmad ve ark., 1989). Besiyerlerine birtakım karbonhidratların eklenmesi ile üremeyi arttırıcı etkinin gözlendiği lakin fazla miktarda katılan karbonhidratların pH'yı olumsuz etkilediği bildirilip, izolasyon için uygun pH'nın 7.2-7.8 arasında olması gerektiğini, düşük pH'nın çok çabuk etkilediği ve bu yüzden sıvı besi yerlerinde renk değişiminin gözlendiğinde bekletilmeden pasajın yapılması gerektiği araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Snell, 1981; Kleven, 1989; Calnek ve ark, 1997). Klinik örneklerden izolasyon için ekim yapılmış örneklerin besi yerlerinin nemli bir ortamda, mikroaerobik koşullar altında 37°C de 3-5 gün bekletilmesi bu süre zarfında üremenin olmaması sonucu 7-14 güne kadar bekletilmesi gerektiği bildirilmiştir (Colusi, 1963; Rosenfeld, 1971; Salami ve ark, 1992; Quinn ve ark, 1994).

Besi yerlerindeki morfolojisi bakımından spesifik bir görüntüye sahip olan etken; katı besi yerlerinde, ortası koyu ve düğmeli görünüme sahip koloniler agarın içine gömülü ve granüler yapıda olduğu bu şekliyle "Sahanda Yumurta" görünümüne benzediği, morfolojik olarak bakterilerin L formuna benzetildiği; L

formları bakterilerin penisilin gibi maddelerce hücre duvarının sentezinin önlenildiği şekilsiz etkenlerin koloni formu olarak bildirilir ki, L formu koloniler Dienes boyamada 15 dakikada dekolore olurken mycoplasma kolonileri dekolore olmaz. Sıvı besi yerlerinde ise hafif veya orta derecede bulanıklık yaptıkları bildirilmektedir (Arda ve ark, 2002).

Etkenin biyolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından araştırmacılar tarafından incelendiğinde, glukoz ve maltozu gaz oluşturmada fermente edebildiği; arabinoz, sorbitol, laktoz, inulin, ksiloz, dulcitol ve salisisini fermente edemediğini ve diğer şekerlerde fermente özelliğinin değişken olduğunu bildirmişler, Barber ve Fabricant (1971) “glukozu fermente edenler” ve “glukozu fermente etmeyenler” olarak mycoplasmaların iki gruba ayrılabilceğini bildirirken, diğer araştırmacılar glukoz fermantasyon, tetrazolium redüksiyon, arjinin hidrolizi ve film-spot oluşturma testlerinin uygulanması gerektiğini bildirmişlerdir (Kleven, 1987; Erdağ ve Türkaslan, 1988; Ülgen, 1991).

M. gallisepticum belirli sıcaklıklarda farklılıklar göstermek üzere; burun ve kulak mukozasında 4-24 saat, insan saçında 8 saat-3 gün, giysilerde ve tavuk dışkısında 1-3 gün, yumurta sarısında 6-18 hafta, sıvı kültürlerde 2-4 yıl ve liyofilize suşlarında 4°C de en az 7 yıl canlılığını koruyabildiklerini araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Christensen ve ark., 1994; Ley ve Yoder, 1997) . Etkenin canlılığının uzun sürmesi kümeslerdeki ekipmanları ile çalışanların kontamine oranlarını yüksek tutmakla giriş çıkışların kontrol altına alınmasına dikkat çekmektedir.

M. gallisepticum'un bulaşmasında, yumurta yoluyla vertikal olarak veya direkt temas ile horizontal olarak şekillendiği bildirilip, Fahey ve Crawley (1954) etkeni infekte anaçlardan, kabuk altı ölü embriyolardan ve cılız civcivlerden izole ettiklerini, Van Roekel ve ark. (1958) ve Yoder ve Hofstad (1965) tarafından da embriyolardan etkeni izole ettiklerini bildirmişlerdir. MacMartin ve ark. (1987) kümeslerdeki havalandırmaların kontrolü ile lateral yolla bulaşmanın azalacağını

saptadıklarını bildirmişlerdir. Kontamine su ve yemler, ekipmanlar, bakıcı, ziyaretçi aracılığı ile de etkenin bulaştığı, uygun olmayan bakım koşulları ve yabani kuşlarla, haşere ve kemirgenlerin kontrol edilemediği kümeslerde de horizontal bulaşmanın yüksek olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Salami ve ark., 1992; Kojima ve ark., 1996–1997; Ley ve Yoder, 1997).

Ekstrasellüler parazit olarak atıfta bulunulan mycoplazmalar, solunum yolu, ürogenital sistem, meme bezi gibi doku ve organlarda bulunarak yüksek konakçı spesifitesi gösterdiği bildirilerek, MG'nin solunum yolu mukozasına kolonize olduktan sonra burun akıntısı, hırıltı ve öksürük gibi klinik semptomlar göstermeye başladığı, solunum sisteminin mukoz membranları ve epitelyum hücrelerinde oluşturduğu tahribat, solunum yolundaki silialara zarar vermeleri MG'nin burada yerleşerek vermiş olduğu tahribatın artması sonucu sekonder bakteriyel enfeksiyonlara davetiye çıkarması ve kompleks solunum yolu problemlerine sebebiyet verdiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Quinn ve ark, 1994; Frey J. ve Nicolet J., 1997; Kleven, 1998)

M. gallisepticum'un solunum kanalı yoluyla vücuda girmesinden sonra, etkenin stoplazmik yüzeyindeki polar kabarcıklar sayesinde, konakçı epitelyum hücrelerine tutunarak ve bu arada vücut dışında da canlı kalabilmesini sağlayan bu yapı sayesinde vakum benzeri bir fonksiyon göstererek, yapı hücrelerin sialik asit reseptör bölgelerine tutunduğu bildirilmiştir (Timms, 1989). Solunum kanalı yoluyla enfeksiyonu takiben bir septisemi dönemi olduğunu ve bu dönem de kandan etken izolasyonu yapılabileceği, septisemi sonucunda etkenin; hava keseleri, beyin, kloaka, yumurtalık ve testislere kadar ulaşarak bu organlarda lokalizasyon oluşturabileceği bildirilmiştir (Jordan, 1985)

Kronik solunum yolu hastalığının etkeninin kuluçka süresi 3-38 hafta arasında değiştiği, deneysel enfeksiyonlarda ise ortalama 6-21 gün arasında değiştiği, deneysel olarak infekte edilen hindilerde ise sinuzitis çoğunlukla 7-10 günde geliştiği bildirilmektedir. Klinik semptomlar 3-6 haftalar arasında görülmekle, 3 haftalıktan

küçük hayvanlarda fazla görülmediği bildirilmiştir. Tavuk ve hindi sürülerini çoğunda enfeksiyon klinik olarak yumurta üretiminin başlangıcına yakın ortaya çıkmaktadır. İnfekte tavuk ve hindi sürülerinde *M. gallisepticum* enfeksiyonunun kontrolü için yumurtaların antibiyotik solüsyonuna batırılma işleminden sonra bu yumurtalardan çıkan infekte palaz ve civcivlerde inkübasyon periyodunun uzadığı bildirilmiştir (Yoder, 1988; Stipkovits ve Kempf, 1996; Levisohn ve Kleven, 2000).

Kronik solunum yolu hastalığının oluşmasında, enfeksiyona katılan *M. gallisepticum* suşunun virulensi, bakteri sayısı, konakçının türü ve yaşı, diğer patojenlerle birlikte aynı anda oluşan enfeksiyonlar ve hayvanları güçsüz kılan faktörler etkili olmaktadır. Her yaştaki kanatlılar duyarlı olmasına rağmen, çok gençler ve özellikle büyüme çağındaki hayvanlar enfeksiyona daha çok yakalanırlar ve hindiler de tavuklardan daha duyarlıdırlar. Hastalık özellikle, Newcastle (ND), İnfeksiyöz Bronşitis (IB), Koriza gibi hastalıklarla birlikte seyrettiğinde daha ciddi klinik bulgular oluşturmakta ve enfeksiyonun seyri ve sağaltımı değişmekte ve de zorlaşmaktadır. Bunların dışında beslenme yetersizliği, havalandırma yetersizliğine bağlı olarak kümeste aşırı amonyak ve toz bulunması, ısıtma noksanlığı, aşırı kalabalık, kümes dezenfeksiyonları ve diğer stres faktörleri hayvanları duyarlı hale getirmekte olduğu bildirilmiştir (Arda ve ark, 2002).

Kronik solunum yolu hastalığının patognomonik semptomu olmamakla beraber hasta tavuklarda “nargile fokurtusu” benzetmesi ile hırıltılı solunum, burun akıntısı, öksürük, yem tüketiminde azalma ve buna bağlı kilo kayıpları ve nadir olarak tortikollis ile karakterize sinirsel belirtiler gözlendiği bildirilmiş, tüm semptomların horozlarda daha belirgin olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Ülgen ve ark., 1995; Levisohn ve Kleven, 2000).

Kronik solunum yolu hastalığını geçiren hayvanların nekropsi bulgularında; hava keselerinde donuklaşma ve kalınlaşma, akciğerlerde pneumonik bölgelerin

dikkat çektiği, peritonun şeffaflığını yitirdiği, *E. coli* ile kompleks haline geldiğinde fibroprulent perihepatitis ve perikarditis gözlemlendiği bildirilmiştir (Salami ve ark., 1992; Ley ve Yoder, 1997). Mikroskopik bulgularda, enfekte dokuların mukoz membranlarında, mononükleer hücre infiltrasyonu ve müköz bezlerin hiperplazisine bağlı olarak kalınlaşma şekillendiği, enfeksiyonun ilk aşamasında sinus mukozasında kataral bir yangı ve ilerleyen aşamalarda submukozada fibrozis, lenfollüküler hücre infiltrasyonu ve bunlardan hariç fokal lenfoid hiperplazi görülebileceği; hava keselerinde de perivasküler lenfositik hücre infiltrasyonu meydana geldiği bildirilmiştir (Osborn O.H. ve Pomeroy B.S., 1958).

Enfeksiyonu takiben hücrel ve humoral immunitenin geliştiğini, enfeksiyondan 1 hafta sonra hücrel yanıtın başlayıp yaklaşık 7. haftada pik düzeye ulaştığı; serumda hemaglutine edici antikorların 7. haftada, tracheal yıkıntılarda da 6. haftada pik düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Timoney ve ark., 1988; Mekkes ve ark., 2005)

Mycoplazmaları üretmek için özel besi yerlerinden (PPLO agar veya buyyon) yararlanılır. Bu amaçla, besi yerlerine %15-20 at serumu ve %10 maya özütü katılır. Ayrıca, bakteri kontaminasyonlarını önlemek için de 50-100 UI/ml penisilin ve 0.25 mg/ml thallium acetate ilave edilir. Kültürler inkübatörde 5-6 gün süre ile 37°C' de tutulduktan sonra petri kutuları stereoskopik mikroskop incelenerek üreyen koloniler mycoplazma yönünden değerlendirilir. PPLO agarda üreme meydana gelmemesi halinde, ekim yapılan materyelin *M. gallisepticum* yönünden negatif olarak değerlendirilmesi için kültürlerin en az 3-4 hafta süre ile inkübe edilmeleri gerekir. Katı besi yerinde üreme saptanırsa, üzerinde koloni bulunan agar blokları kesilerek PPLO buyyona pasaj edilir. Sıvı besi yerleri her gün kontrol edilerek renk değişikliğine göre üreme olup olmadığı saptanır. Etken izolasyonu yapıldığı takdirde, spesifik antiserumlar kullanılarak kültürlerin en kısa sürede immunofluoresans testi veya klonlamayı takiben üreme inhibisyon testi ile identifiye edilmeleri gerekir (Arda ve ark, 2002).

Noormohammadi ve ark (2002) aşılama da kullanılan canlı atenue ts-11 suşundan elde edilen aşının birçok ülkede MG kontrolünde kullanıldığını bildirmişlerdir. Biro ve ark (2005) ts-11 aşısı ile aşılanan sürülerde aşı reaksiyonu oluşmadığını ve aşı grubun MG ile eprüve edilmesi sonucunda MG enfeksiyonunun klinik bulgularını göstermediğini, ELISA testi ile az oranda LAT testi ile zayıf ve/veya hiç pozitif sonuç alamadıklarını gözlemlemişler ve ts-11 ile aşı sürülerin ts-11 pMGA ve S6 pMGA antijenleri ile kaplı ELISA testi ve LAT karşılaştırmalarında, ts-11 pMGA ELISA testinin S6 pMGA ELISA'dan ve LAT testinden daha hassas olduğunu da tespit etmişlerdir. Bildirilen bu aşlar dışında kullanılan diğer bir aşı da MG 6/85 aşısıdır (Collet, 2004; Shill ve ark., 2011). Branton ve ark (2002), MG R suşu ile eprüve yapılan MG 6/85 aşı sürülerde, eprüve yapılan etkenin yumurta büyüklüğü, yumurta verimi ve yumurta kanalı fonksiyonlarını etkilemediğini bildirmişlerdir (Gaunson ve ark, 2006., Evans ve ark, 2007).

Serolojik testler kullanılarak spesifik antikorların varlığı gösterilerek de CRD'nin teşhisi konulabilir. Bu amaçla en çok kullanılan testler arasında LAT, tüp aglutinasyon (TA) ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testleri bulunmaktadır. Ancak, bu testlerin spesifite ve/veya sensivite leri zayıftır ve bireysel infekte hayvanların teşhisinden ziyade sürü taramalarında kullanıldıkları zaman daha tatminkâr sonuçların alındığı bildirilmiştir. Bunların dışında radioimmunoassay, mikroimmunofluorescence ve indirekt IP gibi çeşitli testlerde bulunmaktadır (Erdağ O. ve Türkaslan J., 1988; Arda ve ark,2002) Günümüzde kanatlı işletmeleri fazla sayıdaki serumların taranmasında LAT ve ELISA teknolojisi kullanılır. Bu testlere detaylı olarak değinilmiştir, çünkü pek çok MG kiti ticari olarak temin edilebilir ve bireysel prosedürleri bulunmaktadır.

Lam Aglutinasyon Testi-LAT; Sürülerden toplanan serum örnekleri derhal test edilmeyeceklerse +4°C de saklanmalı ve dondurulmamalıdır. Test edilecek

serum sayısı gerekli ve güvenli tespit yapılabilecek oranda olmalıdır. Toplanan serumlar oda sıcaklığında 72 saat içinde teste tabi tutulur. Bir miktar (yaklaşık 0.02 ml) serum beyaz fayans üzerine damlatılır takibinde aynı miktarda boyalı MG antijeni üzerine damlatılır. Fayans çevrilerek karıştırma sağlanır. Aglütinasyon 2 dakika içinde kümeleşmenin oluşmasıyla görülür. Bilinen pozitif ve negatif kontrol serumları da aynı şekilde test edilir. Kullanılan ticari antijenler üretici firmadan ve üretilen partiden partiye farklı özellik ve hassasiyette olabilir. Serum veya antijene bağlı birçok değişik faktör testin kesin sonuç vermesi üzerinde etkili olur ve en uygun koşullarda dahi, LAT bireysel hayvandaki enfeksiyondan ziyade sürü enfeksiyonunu ortaya koymada daha başarılı olmaktadır (Arda ve ark, 2002). Bir sürüde yüksek oranda (%10 ve fazlası) pozitif serum MG enfeksiyonunun işaretidir, özellikle sonuçlar ELISA veya HI ile teyit edilmişse. Kesin karar için sürü bir ay içinde tekrar test edilmelidir. Sonuçlar tatmin edici değilse organizmanın izolasyonunu yapmak gereklidir. Sonuçlar şüpheli olduğunda *M. synovia* antijeni ile test yapmak gereklidir, bu organizma ile enfeksiyonda bazen kros-reaksiyon olabilmektedir. Bu testler en az serumlarla olduğu kadar iyi bir şekilde yumurta sarısıyla da yapılabilir, ancak yumurta sarısını ilk önce sulandırmak gerekir (Özkaynak, 2004). TA testinin uygulanması LAT'dan daha uzun bir süre alır fakat bu test bazı araştırmacılar tarafından LAT'ya oranla daha kesin olarak değerlendirilmektedir. (Arda ve ark, 2002).

LAT ve TA'dan daha duyarlı olan HI testi, Newcastle hastalığının serolojik tanısında kullanılan tekniğe benzer bir şekilde mikro olarak uygulanır ve çoğunlukla da LAT'da pozitif reaksiyon veren serumların doğrulanması amacıyla kullanılır. Ancak, bazı *M. gallisepticum* izolatlarının hemaglutinasyon oluşturmadıklarını ve bazılarının da HI antikorlarının sentezini stimüle etmedikleri unutulmamalıdır. Ayrıca, testte suş spesifitesinin bulunmasından dolayı, heterolog antijen kullanılması durumunda yanlış negatif sonuçlar meydana gelebilir.

Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi (HI): MG'de, kanatlı kırmızı kan hücreleri (RBCs) hemaglutinasyon yeteneğine sahiptir ve serumdaki spesifik antikorlar inhibisyona neden olur. HI testinde gerekli olanlar güvenli MG hemaglutinasyon antijeni, yıkanmış taze tavuk veya hindi kırmızı kan hücresi ve test serumudur. Antijen ya taze broth kültürü içinde yada PBS içinde yıkanmış konsantre MG süspansiyonu halinde olmalıdır. Kültür antijende istenilen yüksek titreyi tutturmak zordur, bununla beraber konsantre antijende (genellikle %25-50 gliserol içerir ve -70°C de depolanır) nonspesifik reaksiyon olasılığını artırır. HI testi bilinen prosedürü aşağıdaki gibidir (Esendal, 1994) Antijenin HA titresini çift katlı sulandırma ile tespit edilir, çalışılan HA testinin tamamında en az miktarda antijen bulunan yer HA ünitesinin tanımlandığı yerdir. HI testi aşağıda anlatılan metotdaki gibi 4HA ünitesinde yapılmalıdır veya bilinen pozitif bir serum ile karşılaştırmalı test yaparak testin hassasiyeti tespit edilmelidir.

HI Test prosedürü: Tüm HA titrasyonları ve HI testleri en iyi çok kuyucuklu V tabanlı plastik mikroplyetlerde yapılır ve kullanılan sabit miktar 50µl dir. Bir pozitif ve negatif kontrol serum her testte kullanılır. Test edilecek her serum için sekiz kuyucuk olmalıdır. Her sıradaki ilk kuyucuğa 50µl PBS eklenir. Her sıradaki ikinci kuyucuğa 8HA ünitedeki antijenden 50µl eklenir ve üçten sekize kadar olan her kuyucuğada 4HA ünitedeki antijenden 50µl eklenir. Test edilecek serumlar 1/5 oranında dilue edilerek hazırlanır ve hazırlanan bu serumlardan ilk kuyucuklara 50µl eklenir, karıştırılır, 50µl ikinci kuyucuğa aktarılır, karıştırılır, aynı işlemler son kuyucuğa kadar tekrar edilir, son kuyudan 50µl atılır. İlk kuyucuk serum kontrol kuyucuğudur. Antijen kontrol için 6 kuyucuk gereklidir. 2 den 6. kuyucuğa kadar her kuyucuğa 50µl PBS eklenir ve 1 ve 2. kuyucuğa 8 HA üniteli antijenden 50µl eklenir. 2. kuyucuktaki içerik karıştırılır, 50µl si 3. kuyucuğa aktarılır, aynı işlem 6. kuyucuğa kadar tekrar edilir, 6. kuyucuktan 50µl atılır. Kırmızı kan hücrelerinin kontrolü için 2 kuyucuk gereklidir, her kuyucuğa 50µl PBS eklenir. Kuyucukların tamamına %0.5'lik kırmızı kan hücre (RBCs) solusyonundan (tavuklar için tavuk

kanından, hindiler için hindi kanından hazırlanmalı) eklenir. Pleyt, kuyucukların karışması için nazikçe çalkalanır, daha sonra oda sıcaklığında 50 dk beklemeye bırakılır. Okuma için, pleyt eğilir ve sadece RBCs solusyonu konulmuş gözlerle aynı zamanda çıkan gözler inhibe olmuş kabul edilir. Kontrol serumlarında RBC düğme şeklinde görülür ve diğer kontrollerinde aynı reaksiyonu vermesi beklenir. Serum dilasyonlarının HI titreleri çok yüksekse HA'nın tamamında inhibisyon görülür. HI testinde 1:40 ve 1:80 veya daha yüksek titreler pozitif olarak değerlendirilir (Esendal, 1994).

Antikorları saptamak amacı ile daha sonraları geliştirilen ELISA yöntemi ise, kullanılan spesifik IgG'ler nedeniyle MG antikorlarının saptanmasında diğer tüm testlere oranla çok daha spesifik bulunmuştur (Esendal ve ark, 1999).

CRD hastalığını en kesin kontrol yöntemi, enfeksiyonun eradike edilmesidir. Hastalığın kontrolü damızlık sürülerde başlar ve belirli noktaları kapsar: *M. gallisepticum*'un embriyo yolu ile yavrulara geçişinin önlenmesi için kuluçkalık yumurtaların sağaltımı, eradikasyon programı sürecinde, yumurtadan çıkan civcivlerin 200-300 hayvanlık küçük gruplar halinde tutulması, taramalar sırasında *M.gallisepticum* enfeksiyonu saptandığında tüm sürü imha edileceğinden, her bir grup birbirinden uzak tutulmalıdır. Yavruların *M.gallisepticum* enfeksiyonu yönünden sürekli kontrol edilmesi, yumurtaların kuluçkaya alınmadan önce antibiyotik, ısı veya her ikisi birden uygulanarak ön inkübasyona tabi tutulmaları ile kuluçkalık yumurtaların *M. gallisepticum* ile enfekte olmaları önenebilir.

Tarım ve Köyşleri Bakanlığının (T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının), Kuluçkahane ve damızlık İşletmelerinin Sağlık Kontrol Yönetmeliğince, Eradikasyon programı süresince yavru sürülerin *M.gallisepticum* yönünden taranması amacıyla kültürel muayene ve/veya serolojik yoklamalar

kullanılır. Serolojik muayene amacıyla, yumurtlama dönemi de dahil, hayvanların tüm yaşam sürelerinde belli aralıklarla serolojik testler uygulanır. Değişik yaş gruplarından hayvanların bir arada bulunduruldukları ve üretimin sürekli olduğu işletmelerde *M.gallisepticum* enfeksiyonunun kontrolündeki başarısızlıklar ve antibiyotik sağaltımının yüksek maliyeti, enfeksiyona karşı korunmada aşılama üzerinde yeniden durulmasına neden olmuştur. MG-free sürülerin korunmasının kontrolünde tercih edilen metod canlı ve inaktif aşıların her ikisinin birlikte kullanılmasıdır. Aşılama farklı yaş grubu hayvanların bulunduğu bölgedeki sürülerde enfeksiyonun kaçınılmaz olması göz önünde bulundurulmalıdır. Ticari yumurtacılar yumurta üretimindeki kayıpların önüne geçmek için aşılama yapılır (Arda ve ark., 2002; Collet, 2004; Shill ve ark., 2011).

MG'yi eradike etme amacıyla, damızlık sürülerde yumurtaya geçiş oranını düşürmek için aşılama yapılır. Sürülerin MG ile ilgili saha enfeksiyonuna maruz kalmadan önce hem canlı hem de inaktif aşı ile aşılama önemlidir. Mevcut canlı aşılar genellikle MG'nin F suşundan üretilirler, son zamanlarda ts-11 ve 6/85 suşları da kullanılmaya başlanmıştır. Bu suşlar güvenli karakteristik özellikleri geliştirilmiş apatojen suşlardır. F suşunun uygulanmasında intranasal veya göze damlatma yolları tercih edilir, fakat aerosol veya içme suyu ile uygulamada yapılabilir (Collet, 2004). Ts-11 suşu için göze damlatma metodu tavsiye edilirken, 6/85 için iyi bir spray önerilmektedir. Piliçler genellikle 12-16 haftalık yaşta aşılanır. Tek bir doz aşılama yeterlidir, aşılanmış sürüler sürekli taşıyıcı olarak kalırlar. Farklı yaşta gruplarda uzun süre F suşunun kullanılması sonucunda aşı suşu saha suşunun yerine geçer. F suşu 6/85 veya ts-11'den daha etkili bir şekilde virulent wild-type MG suşunun yerine geçer fakat ts-11 farklı yaşta ticari yumurtacılar MG'nin F suşunu eradike etmekte başarılı olmuştur. Farklı yaşta üretim gruplarında uzun süre 6/85 kullanıldıktan sonra serolojik testlerin MG yönünden negatif olduğu biliniyor. Bakterinler MG organizmasının yağlı emülsiyon içindeki konsantre suspansiyonlarından oluşur. Bunun olağan uygulaması yetiştirme dönemindeki 12-16 haftalık yaşta piliçlerdir. Parenteral yolla uygulanır, bu da genellikle boyundan

deri altına şeklidir. Çift doz yapılması arzu edilmesine rağmen fiyat ve işçilik de düşünül­düğünden tek doz verilmektedir. Bakterin solunum hastalığı ve yumurta üretimindeki düşüşten korumada etkilidir fakat wild-type MG ile enfeksiyondan korumaz (Biro ve ark., 2005; Javed ve ark., 2005; Shill ve ark., 2011).

Mycoplasma enfeksiyonlarının sağaltımı amacıyla tiamulin, doxycycline ve danofloxacin en uygun antibiyotikler olarak değerlendirilmektedir. Tylosin, tetrasiklinler ve flumequine'e karşı direnç gelişmiş ve enrofloxacin'e de sınırda bir direnç gelişmiştir (Jordan ve ark, 1998).

Kanatlılarda mikoplazmoziste hem ürün kaybından hem de uygulanan tedavilerden dolayı ekonomik kayıplar olmakta, bu ekonomik kayıpların en az düzeye indirmek için hastalığın kesin teşhisinin yapılması gerekmektedir. Hastalık teşhisinde geliştirilen kültür ve seroloji kesin teşhiste yetersiz kalmakta ve ucuz, hassas ve kolay uygulanabilen bir test ile desteklenmesi için geliştirilen PZR testinin kullanılabilirliği yapılan birçok araştırmada (Nascimento, 1991; Silveria, 1996; Wang, 1997; Salisch ve ark, 1998) incelenmiştir.

Bu çalışmada, Afyonkarahisar bölgesindeki tavukçuluk işletmelerinde CRD'nin serolojik olarak yaygınlığını ortaya koyabilmek için en çok kullanılan serolojik testler olan LAT ve ELISA testlerinin karşılaştırılmasının yapılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Serum Örnekleri

Bu çalışmada, Afyonkarahisar ili ve çevresindeki çeşitli kanatlı işletmelerinden temin edilen, 450 adet tavuk (broiler damızlık, yumurtacı tavuk ve ticari broiler) serum materyali kullanıldı. Tavuk serum örnekleri 28 farklı özel işletmelerden, her sürüden ortalama 9-39 serum örneği olacak şekilde alındı. Tavuklardan alınan örnek adetleri, haftalık yaş bilgileri ve yetiştirme bilgileri Tablo 1'de belirtilmiştir.

3.1.2. Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları

LAT Testi'nde antijen kontrolünde kullanılmak üzere pozitif ve negatif serumlar Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

3.1.3. Boyalı Lam Aglutinasyon Test Antijeni

LAT Testi'nde kullanılan boyalı CRD Lam aglutinasyon antijeni İntervet firmasından temin edildi.

3.1.4. ELISA Kiti

Serum örneklerinde *M. gallisepticum* 'a karşı antikor bulunup bulunmadığı ticari ELISA kiti (Biochek,UK) ile incelendi.

3.2. Metot

3.2.1. Serum Örnekleri

Kan örnekleri serum vermeleri için oda sıcaklığında 2-4 saat bekletildi, pıhtılaştıktan sonra etrafları çizilerek 37°C'lik etüvde serumları çıkartıldı. Serumların temiz ve berrak görünüşte olmaları sağlandı. Toplanan serum örneklerinin

bozulmaması, kontamine olmaması ve titrelerinde değişikliğin meydana gelmemesi için süratle LAT ve ELISA testleri uygulandı.

3.2.2. Lam Aglutinasyon Testi

Bu test Timms ve Cullen'ın (1972) bildirdiği yönteme göre temiz bir fayans üzerine 0.02 ml inaktive edilmemiş ve sulandırılmamış serum ve 0.02 ml boyalı *M. gallisepticum* test antijeni konularak cam baget ile karıştırıldı ve fayans dairesel hareketlerle karıştırmaya devam edilirken boyalı antijeni partiküller halinde ckmesi izlendi. İki dakika içinde antijen ve antikor bağlanması sonucu oluşan kümeleşme pozitif reaksiyon, ck zayıf kümeleşme ve ince partikül şüpheli reaksiyon, iki dakikadan sonra oluşan kümeleşme veya homojen kalan karışımlar negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Testin uygulanması sırasında her serum grubunu kontrol için negatif ve pozitif serumlarla da çalışılmıştır.

3.2.3. ELISA Testi

Serum rneklerinde *M. gallisepticum* ' a karşı antikor bulunup bulunmadığı, ticari ELISA kiti üreten firmanın (Biochek,UK) nerdiği şekilde araştırıldı, standart test işlemi üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Bunun için serum örnekleri 1/50 oranında dilüsyon ile sulandırılan dilüsyon pleyti olarak adlandırılan ön hazırlık pleyti hazırlanarak firmanın tavsiye ettiği prosedüre göre kit içerisinde hazır olarak bulunan enzim kaplı pleyti dilüsyon, konjugat, substrat, yıkama ve stop solüsyonları ile muamele edilerek bekleme sürelerine uyulmuştur. Birinci aşamada asıl pleytin ilk ikişer kuyucuğuna sırasıyla 100'er µl negatif, pozitif ve kontrol serumlarından konularak geri kalan her kuyucuğa 90 µl dilüsyon sıvısı ve üzerine 10 µl sulandırılmış serumlardan konularak karanlık ortamda yarım saat bekletildi. 30 dakika bekleme süresi arkasından her kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile üçer defa yıkanarak kurutuldu. İkinici aşamada, pozitif negatif ve kontrol gözleri dahil olmak üzere her kuyucuğa 100'er µl konjugat solüsyonu konularak yarım saat karanlık ortamda ikinci kez beklemeye alındı. 30 dakika bekleme sresinden sonra tekrar her kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile üçer defa yıkanarak kurutuldu. nc

aşamada tüm kuyucuklara 100'er µl subtrat reagent solusyonu konularak 15 dakika karanlık ortamda beklemeye alındı. Dördüncü aşama olarak onbeş dakika sürenin ardından boşaltma, kurutma ve yıkama yapılmadan her kuyucuğa subtrat solusyonu üzerine, 100'er µl olmak üzere stop solusyonu ilave edilerek okuma aşamasına hazır hale getirildi, prosedür aşamaları tamamlanmış oldu ve readerda okuma aşamasına geçildi.

Testte Optik Dansite (OD) 405 nm dalga boyuna ayarlı (Multiscan LabSystem- mod no: 1500) Reader cihazı kullanılarak yapıldı. Ticari ELISA kitinde sonuçlar, materyallerdeki pozitiflik oranının hesaplanması (S/P) ile belirlendi. İncelenen materyallerde sonuç S/P 1.0 veya daha yüksek ise pozitif, 0.2 ve 1.0 arası şüpheli ve 0.2'den daha düşük ise negatif olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Tablo 1. Yetiştirme yönünden tavukların bilgileri ve yapılan test sonuçları

Yapılan Test				LAT			ELISA		
NO:	Yetiştirme yönü	Haftalık Yaş	Serum sayısı	Negatif serum sayısı	Şüpheli serum sayısı	Pozitif serum sayısı	Negatif serum sayısı	Şüpheli serum sayısı	Pozitif serum sayısı
1	Broiler damızlık	16	16	6	1	9	10	-	6
2	Broiler damızlık	16	16	12	-	4	7	6	3
3	Broiler damızlık	20	21	21	-	-	21	-	-
4	Broiler damızlık	58	37	2	12	23	17	17	3
5	Yumurtacı tavuk	13	18	15	3	-	11	7	-
6	Yumurtacı tavuk	16	11	10	1	-	11	-	-
7	Yumurtacı tavuk	18	10	4	-	6	8	-	2
8	Yumurtacı tavuk	21	23	23	-	-	12	11	-
9	Yumurtacı tavuk	23	16	11	1	4	15	1	-
10	Yumurtacı tavuk	27	20	-	-	20	12	3	5
11	Yumurtacı tavuk	29	12	2	-	10	11	-	1
12	Yumurtacı tavuk	34	12	-	-	12	-	-	12
13	Yumurtacı tavuk	37	17	13	4	-	17	-	-
14	Yumurtacı tavuk	38	10	4	-	6	7	3	-
15	Yumurtacı tavuk	43	15	-	2	13	10	2	3
16	Yumurtacı tavuk	51	15	-	-	15	3	3	9
17	Yumurtacı tavuk	53	16	-	1	15	-	-	6
18	Yumurtacı tavuk	61	10	-	1	9	2	-	8
19	Yumurtacı tavuk	64	12	-	-	12	3	-	9
20	Yumurtacı tavuk	64	12	6	4	2	8	4	-
21	Yumurtacı tavuk	67	12	10	2	-	11	1	-
22	Yumurtacı tavuk	69	17	8	1	8	8	-	9
23	Yumurtacı tavuk	78	12	-	-	12	7	1	4
24	Broiler tavuk	2	19	11	2	6	10	5	4
25	Broiler tavuk	3	12	9	3	-	12	-	-
26	Broiler tavuk	5	22	7	4	11	14	3	5
27	Broiler tavuk	6	17	1	1	15	8	-	9
28	Broiler tavuk	6	20	-	2	18	15	1	4
Toplam			450	175	45	230	280	68	102

Tablo 2. Lam aglütinasyon testi (LAT) ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

	POZİTİF n (%)	ŞÜPHELİ n (%)	NEGATİF n (%)	TOPLAM
LAT	230 (51.1)	45 (10)	175 (38.9)	450
ELISA	102 (22.6)	68 (15.1)	280 (62.3)	450

Tablo 2’de görüldüğü üzere incelenen toplam 450 adet kanatlı serumunun ELISA ile 102 (%22.6)’si pozitif, 68 (%15.1)’i şüpheli, 280 (%62.3)’i negatif bulunurken; LAT ile 230 (%51.1)’u pozitif, 45 (%10)’i şüpheli, 175 (%38.9)’i negatif olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Kanatlı hayvan hastalıkları arasında önemli bir yere sahip olan CRD etkeni *M. gallisepticum*'un, izolasyon ve idenditifikasyonunun mümkün olması ve kesin sonuç alınması ile birlikte, izolasyonu engelleyen bir çok etkenin bulunması, zaman alıcı olması ve her vakada mümkün olmamasından dolayı etkenin varlığının tespiti için serolojik testlerin kullanılması gerektiği, teşhiste kolaylık, zaman ve gizli portör takibi gibi durumlardan önem arz etmektedir.

Mikoplazma enfeksiyonlarının teşhisinde bildirilen metotların bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Kültür; çok işçilik gerektirmesi, kültür sırasında kontaminasyon olma ihtimali ve örnekteki etkenin canlılığını korumamış olması gibi sonucu etkileyecek dezavantajları olmasına rağmen teşhis için “altın standart” olarak değerlendirilmektedir. Kültürde pozitif sonuçlar genelde 4–7 gün arasında alınmasına rağmen negatif sonuçlar için 30 günlük bir sürenin geçmesi gerekmektedir (Salisch ve ark., 1998).

Kanatlı hayvanlarda Mycoplasma enfeksiyonları başta solunum sistemi bozuklukları olmak üzere çeşitli klinik semptomlara ve bunların yanında yumurta verim düşüklüğü, büyümede gecikme ve karkas telefati sonucunda tavukçuluk endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olur (Arda ve ark., 2002). Kanatlı kaynaklarından elde edilen, isimlendirilmiş 22 *Mycoplasma* türü mevcuttur, ancak bunlardan yalnızca dördü yerel tavukçuluk açısından belirlenmiş olan patojenlerdir. Tavuklar ve hindilerde *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ve *M. synoviae* (MS) yine hindilerde *M. meleagridis* (MM) ve *M. iowae* (MI) dir (Ley ve Yoder, 1997).

Mycoplasma gallisepticum enfeksiyonlarının kanatlı hayvan sürülerinde kontrol ve eradikasyon programlarının başarılı bir şekilde yürütülebilmesi için

periyodik olarak uygulanan serolojik muayenelere gereksinim vardır. Kanatlı hayvanlarda MG'ye karşı oluşan spesifik antikorlar serum lam aglutinasyon (LAT), hemaglutinasyon-inhibisyon (HI), Agar jel presipitasyon (AGP) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gibi serolojik yöntemlerle saptanabilir (Esendal, 1999).

Bir sürü tarama testi olarak kullanılan ve IgM grubu antikorları saptayan LAT testi çabuk, duyarlı ve kolay okunan bir testtir. Ancak LAT, kontamine serumlar (*M. synoviae*, *S. aureus* veya *S. faecalis* ile infekte), dondurulmuş-çözdürülmüş serumlar, ile *Erysipelas* bakterini veya kombine inaktif viral aşı verilmiş hayvanlarda non-spesifik reaksiyonlar meydana getirir (Timms ve Cullen, 1972; Bradbury J.M. ve Jordan F.T.W., 1973). Daha çok bir doğrulama testi olarak kullanılan ve IgG 3 yapısındaki antikorları saptayan HI testi ise, LAT'a oranla daha zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olmasına karşın, bir sürünün MG durumunu ortaya koymada ve MG ve MS ile infekte hayvanların ayırt edilmesinde oldukça duyarlı ve spesifik bulunmuştur. Antikorları saptamak amacı ile daha sonraları geliştirilen ELISA yöntemi ise, kullanılan spesifik IgG'ler nedeniyle MG antikorlarının saptanmasında diğer tüm testlere oranla çok daha spesifik bulunmuştur (Özkaynak, 2004). Glisson (1983) lam aglutinasyon testinde bulunan pozitif sonuçların nonspesifik reaksiyonlardan da kaynaklanabileceğini, kültür ve HI testi ile doğrulanması gerektiğini bildirmiştir. Avakian ve ark (1988) kanatlı sürülerinde uygulanan MG dışındaki inaktif bakterin ve viral aşuların ELISA ve LAT testlerinde yanlış pozitifliklere neden olabileceğini fakat LAT'ın ELISA testinden daha sensitiv ve spesifik bir test olduğunu bildirmişlerdir.

Lam aglutinasyon testi IgM yapısında olan antikorları saptamaya yarayan duyarlı ve kolay okunan bir test olmasıyla mycoplasmosis'de bir sürü tarama testi olarak kullanılmaktadır (Timms ve Cullen, 1972). Roberts (1969), etçi piliçleri intranazal sinus yolu ile deneysel olarak infekte ettikten sonra hayvanların antikor yanıtlarını incelemiş, eprüvasyon suşuyla (S6 suşu) yaptığı LAT testinde 1. hafta

sonunda hayvanların tümünün (% 100) pozitif reaksiyon verdiğini, heterolog suşlardan hazırladığı antijenlerle de % 8 (F antijeni) ve % 25 (WS7 antijeni) pozitif sonuç aldığını bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca, 3. haftada ise hayvanların tümünün her 3 antijenle de pozitif reaksiyon verdiğini açıklamıştır. Olson ve ark. (1963) inceledikleri 68 tavuk serumundan 33'ünü (%48.53) SPA testi ile pozitif bulduklarını bildirmişlerdir.

Mycoplasma enfeksiyonlarının teşhisi amacıyla kullanılan ELISA çeşitli araştırmacılar tarafından diğer tüm testlere oranla daha duyarlı ve spesifik bulunmuştur (Esendal, 1999). Opitz ve ark. (1983) MG ve MS enfeksiyonlarında oluşan antikoları ELISA, LAT ve HI testleriyle inceleyerek, ELISA ile % 100, LAT ile % 98 ve HI ile de % 80 oranlarında pozitiflik belirleyerek antikoları saptamada ELISA tekniğinin LAT ve HI testlerinden daha duyarlı olduğunu ayrıca, ELISA ile LAT testine göre daha az non-spesifik reaksiyon oluştuğunu bildirmişlerdir.

Patten ve ark. (1984) ELISA tekniğinin LAT ve HI testlerine oranla daha duyarlı ve spesifik olduğunu açıklamışlar ve inceledikleri 99 serum örneğinden 74 adedini (% 74.75) ELISA ve LAT ile pozitif bulduklarını, enfeksiyonun saptanmasında HI testinden daha kısa sürede ELISA ile antikoları saptadıklarını açıklamışlardır. Tavuklarda *M.gallisepticum*'a karşı oluşan humoral yanıtın ölçülmesinde LAT, HI ve ELISA testlerini karşılaştırmalı olarak denemişler ve deneysel olarak infekte ettikleri tavuklarda inokulasyondan sonraki 5.güne kadar LAT testinin negatif kaldığını, 7. günde hayvanların %94'ünün ve 10. günden 35. güne kadar da hayvanların tümünün bu test ile pozitif saptandığını açıklamışlardır. Araştırmacılar, HI testinde 10. güne kadar pozitif reaksiyon belirleyemediklerini, 14.günde hayvanların % 83'ünün ve 21. günden 35. güne kadar da tümünün pozitif HI titreleri gösterdiklerini; ELISA'da ise 7. güne kadar hayvanlarda % 4.55-5.26 oranında, 7. günde % 79 ve 35. günde de % 100 oranında pozitiflik saptadıklarını, bu sonuçlara göre MG için, ELISA testinin LAT testinden daha az hassas ancak daha spesifik ve HI testinden de daha hassas olduğunu rapor etmişlerdir. ELISA ve LAT

ile enfeksiyon sonrası 7. günden itibaren antikorların saptanabildiğini, HI testinde ise ancak 10. günden sonra antikorların diagnostik bir düzeye gelebildiklerini açıklamışlardır.

Avakian ve arkadaşları (1988) ELISA, LAT ve HI testleri ile MG yönünden incelediklerini ve sonuçta kontrol edilen toplam 90 serumdan LAT testinde 12 (%13.3)'sinin, 2 farklı ELISA test kitinde sırasıyla 26 (%28.9) ve 49 (%54.4)'unun ve HI testinde de 9 (%10)'unun pozitif sonuç verdiğini ve LAT testinin spesifite ve sensitivitesinin ELISA testinden daha iyi çıktığını bildirmiştir. Gürbüz (2008) Toplam 15 kümeden alınan 300 serum örneğinin 127'si (%43) MG yönünden LAT ile pozitif, 173'u (%57) negatif, 165'i (%55) MS yönünden LAT ile pozitif, 235'i (%45) negatif olarak değerlendirildi. Aynı 300 örneğin 243'ü (%80) MG yönünden ELISA ile pozitif, 57'si (%20) negatif olarak sonuç verdiği belirtilmiştir.

Bu çalışmada ise, broiler tavuk, broiler damızlık ve ticari yumurta üretimi yapan 28 farklı ticari işletmeye ait 450 serum LAT ve ELISA ile *M. gallisepticum* yönünden incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda Tablo-1 de detayları verilen ELISA ile 102'si pozitif, 68'i şüpheli, 280'i negatif bulunurken; LAT ile 230'u pozitif, 45'i şüpheli, 175'i negatif olarak bulunmuştur. LAT ile pozitif bulunan 230 serum ELISA ile incelendiğinde 65'i pozitif , 47'si şüpheli ve 118'i de negatif bulunmuştur. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda ise ELISA tekniğinin LAT testine göre spesifitesi % 70.1 ve sensitivitesi %59.06 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalarla (Opitz, 1983; Özkaynak 2004) karşılaştırıldığında birbirine uyumlu bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak ilk bakışta etken izolasyonunun zor ve zaman alıcı, PCR testinin de laboratuvar imkânları ve biraz da pahalı olması sebebiyle, sürülerin MG yönünden izlenmesi/monitoring'i öncelikle primer tarama testlerinde olan LAT ve ELISA ile yapılmalıdır.

LAT'ın çabuk, duyarlı ve kolay okunan bir test olması nedeniyle bir tarama testi olarak kullanılmaktadır. Ancak LAT testinin non-spesifik antikorlardan fazlasıyla etkilendiğinden dolayı tek başına yetersiz kaldığı ve gerçek değerlerin saptanması amacı ile diğer serolojik testlerden ELISA gibi daha duyarlı en az biri ile teyid edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Daha sonra pozitif çıkan sürüler PCR veya bakteriyolojik testlerle doğrulanmalıdır.

ÖZET

Afyonkarahisar ve Çevresinde Yetiştirilen Ticari Tavuklarda *Mycoplasma Gallisepticum*'a Karşı Oluşan Serum Antikor Düzeylerinin Lam Aglutinasyon Testi (Lat) ve ELISA İle Karşılaştırması

Afyonkarahisar ve çevresinde ticari broiler, broiler damızlık ve ticari yumurtacı tavuk yetiştiriciliği yapılan çiftliklerden elde edilen serum örnekleri, *Mycoplasma gallisepticum*'a (MG) karşı oluşturdukları antikorlar yönünden, Lam Aglutinasyon Testi (LAT) ve Enzim - linked immunosorbent assay (ELISA) testleri ile tarandı. Bu amaçla toplam 28 farklı işletmeden elde edilen 450 adet serum örneği kullanıldı.

Serolojik olarak yapılan bu tarama testlerinin sonucunda LAT ile 230 (%51.1)'u pozitif, 45 (%10)'i şüpheli ve 175 (%38.9)'i de negatif olarak değerlendirilirken, ELISA ile 102 (%22.6)'si pozitif, 68 (%15.1)'i şüpheli ve 280 (%62.3)'i de negatif olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak ;sürülerin *M.gallisepticum* yönünden izlenmesi ,diğer serolojik testlerin hem zaman alıcı hem de pahalı olması sebebiyle, öncelikle primer tarama testlerinden olan ve sahada sıklıkla kullanılan LAT'ın ELISA gibi daha duyarlı bir test ile teyit edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Mycoplasma, ELISA, Lam Aglutinasyon Testi

SUMMARY

Grown in and around Afyonkarahisar The resulting serum antibody levels in commercial chickens against *Mycoplasma Gallisepticum* Slide Agglutination Test (RSA) and Comparison with ELISA.

Afyonkarahisar in and around the commercial broilers, broiler breeders and commercial egg production farms obtained from the serum samples for antibodies formed against *M.Gallisepticum*, Slide Agglutination Test (LAT) and were screened by Enzim - linked immunosorbent assay (ELISA) tests. For this purpose a total of 450 units of serum samples obtained from 28 different farms were used.

As a result of this screening tests in serological; 230 (51.1%) positive, 45 (10%) suspicious and 175 (38.9%) were considered negative by Lat; 68 (15.1%), 102 (% 22.6) positive and 280 (62,3%) negative assessed by Elisa .

As a result, the herds *M.gallisepticum* monitoring demands in term of, the other serological tests for reasons of both time consuming and expensive ; first the primary screening tests and often used LAT's ,as Elisa by a more sensitive test should be confirmed it reveals.

Key Words : Mycoplasma, ELISA, RSA

ÖZGEÇMİŞ

2002 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesine başladım, 2005 yılında Afyon merkezde bulunan Yağmur Veteriner Kliniği bünyesine stajyer öğrenci olarak katıldım. 2007 yılında Veteriner Hekim olarak mezun oldum. Aynı klinikte Veteriner Hekimlik mesleğini icra etmekteyim.

KAYNAKLAR

- ATILGAN, T. (1964). Kumes Hayvanlarının “PPLO” Enfeksiyonları (Süregen Solunum Sistemi Hastalığı İle Hindilerin Enfeksiyöz Sinüzitis'i). *Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **5(9)**: 51-64.
- ARDA, M., İZGÜR, M. (1984). Kanatlılarda Mikoplasma İnfeksiyonları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi*, **5(6-7)**: 124-137.
- AVAKIAN, A.P., KLEVEN, S.H. and GLISSON, J.R. (1988) Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial Enzyme-Linked Immunosorbant Assay kits, the serum plate agglutination test, and the hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*, *Avian Diseases*. **32**:262-272
- AHMAD, I., KLEVEN, S.H., GLISSON, J.R., AVAIKAN, A.P. (1989). Further studies of *Mycoplasma gallisepticum* Serum Plate Agglutination Antigen Grown in Medium with Artificial Liposomes Substituting for. Serum. *Avian Diseases*. **33(1)**: 519-526.
- ARDA, M., MİMBAY, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., YARDIMCI, H., ESENDAL, Ö. M., ERDEĞER, J. ve AKAN, M. (2002). *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*. Ed. İZGÜR, M. ve AKAN, M., MEDİSAN Yayın No:50, 1.Baskı. Sy. 79-95.
- BARNES H.J., VAILLANCOURT J.P. and GROSS W.P. (2003). Colibacillosis In “Disease of Poultry” SAIF, S.M., BARNES H.J., FADLY, A.M., GLISSON, L.R., McDOUGLAD, L.R., SWAYNE, D.E., 11rd Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. Pp. 631-646.
- BRADBURY, J.M., and JORDAN, F.T.W. (1973). Non-specific agglutination of *Mycoplasma gallisepticum*. *Vet. Rec.* **92**: 591-592.
- BOGUSLAVSKY, S., MENAKER, D., LYSNYANSKY, I., LIU T., LEVISOHN, S., ROSENGARTEN, R., GARCIA, M., YOGEV, D. (2000). Molecular Characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* *pvpA* Gene Which Encodes a Putative Variable Cytadhesin Protein. *Infection and Immunity*. **68(7)**: 3956–3964
- BIRO, J., POVAZSAN, J., KOROSI, L., GLAVITS, R., HUFNAGEL L., STIPKOITS L. (2005): Safety and efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* TS-11 vaccine for the protection of layer pullets against challenge with virulent *M. gallisepticum* R-strain. *Avian Pathology*. **34(4)**: 341-347.
- COLUSI, A. (1963). Microbiologic Study of Strains of *Mycoplasma gallisepticum* Isolated in Argentina. *Avian Diseases*. **7(4)**: 369-375.
- CHRISTENSEN, N.H., YAVARI, C.A., MCBAIN, A.J., BRADBURY, J.M. (1994). Investigation into the Survival Of *Mycoplasma gallisepticum* , *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on Materials Found in the Poultry House Environment. *Avian Pathology* **23**: 127-143.
- COLLET, S.R. (2004). Monitoring Broiler Breeder Flocks for *Mycoplasma gallisepticum* Infection after Vaccination with ts-11. Universty of PRETORIA Etd.

- EDWARD, D.G.J. Gen. Microbiol. (1947). 1:238-243. In: ADLER, H.E., YAMAMOTO, R. (1956) Preparation of a New Pleuropneumonia-Like Organism Antigen for the Diagnosis of Chronic Respiratory Disease by the Agglutination Test. *Am. J. Vet. Res.* **17**: 290-293.
- EDWARD, D.G., KANAREK, A.D. (1960). Organisms of the Pleuropneumonia Group of Avian Origin: their Classification into Species. *Ann New York Acad Sci.* **79**: 696-702.
- ESENDAL, Ö.M., (1994). Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum*'a Karşı Oluşan Antikorların Çeşitli Serolojik Yöntemlerle Saptanması, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **41**(1): 18-47
- ESENDAL, Ö.M., YARDIMCI, H., AYDIN N. (1999). Kanatlılarda *Mycoplasma Gallisepticum* ve *Mycoplasma Synoviae*'ya Karşı Oluşan Antikorların Tespiti. *Çiftlik Dergisi.* **206**: 56-65.
- EWING, M.L., KLEVEN, S.H., BROWN, M.B. (1996). Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Hemagglutination-Inhibition for Detection of Antibody to *Mycoplasma gallisepticum* in Commercial Broiler, Fair and Exhibition, and Experimentally Infected Birds. *Avian Diseases.* **40**:13-22.
- ERDAĞ, O. ve TÜRKASLAN, J. (1988). Kanatlı Mikoplazmalarında laboratuvar teşhis yöntemleri. *Pendik Hayvan Hastalıkları Merkezi Araştırma Enstitüsü Dergisi.* **19**: 85-97.
- EVANS, J.D., LEIGH, S.A., BRANTON, S.L., COLLIER, S.D. (2007) Effects of increased dosages of the *Mycoplasma gallisepticum* vaccine MYCOVAC-L in layer chickens subsequently challenged with virulent *M. gallisepticum*: egg production and serologic response. *Avian Diseases.* **51**(4):912-917.
- FABRICANT, J. (1960). Serological Studies of Avian Pleuropneumonia-like organisms (PPLO) with Edward's technique. *Avian Disease.* **4**: 505-514.
- FRITZ, B.A., THOMAS, C.B., VAN ESS, P., YUILL, T.M. (1991). Coparison of a Modified Edward-type Medium and a Modified SP4-type Medium for Primary Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from Chickens Vaccinated with the F Strain of MG. *Avian Diseases.* **35**: 591-598.
- FAHEY, J.E. and CRAWLEY, J.F. (1954). Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. III. Egg Transmission of a Pleuropneumonia-Like Organism. *Can. J. Comp. Med.* **18**: 67-75.
- FREY, J. and NICOLET J. (1997). Molecular Identification and Epidemiology of Animal Mycoplasmas. *Wien Klin Wochenscher.* **109** (14-15): 600-603.
- FEBERWEE, A., LANDMAN, W. J. M., VON BANNISEHT-WYSMULLER, T.H., KLINKENBERG, D., VERNOOIJ, J. C. M., GIELKENS, A. L. J., STEGEMAN J. A. (2006). The Effect of a Live Vaccine on the Horizontal Transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathology.* **35**(5): 359-366.
- GAUNSON, J.E., PHILIP, C.J., WHITHEAR, K.G., BROWNING, G.F. (2006). The cellular immune response in the tracheal mucosa to *Mycoplasma gallisepticum* in vaccinated and unvaccinated chickens in the acute and chronic stages of disease. *Vaccine.* **24**(14): 2627-2633

- GÜLER, L. (1995). Konya Bölgesinde Kanatlıların Kronik Solunum Sistemi Hastalığı (Chronic Respiratory Disease-CRD)'nın Serolojik ve Etken İzolasyonu ile Karşılaştırmalı Teşhisi Üzerine Çalışmalar. *Veterinarium*. **6 (1-2)**: 7-14.
- GROSS, W.B. And JOHSON, E.P.(1953). Effect of Drugs on the Agents Causing Infectious Sinusitis of Turkeys and CRD (Air-Sac Infection) of Chickens. *Poultry Science*. **32**: 260-263.
- GÜRBÜZ, E., (2008) Tavuklarda Mycoplasma gallisepticum ve Mycoplasma synoviae'nın tanısında PZR kullanımı Selçuk Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya
- HARTUP, B.K., DHONDT, A.A., SYDENSTRICKER, K.V., HOCHACHKA, W.M., KOLLIAS G.V. (2001). Host Range and Dynamics of Mycoplasmal Conjunctivitis Among Birds in North America. *Journal of Wildlife Diseases*. **37 (1)**: 72-81.
- JAVED, M.A., FRASCA, JR.S., ROOD,D., CECCHINI, K., GLADD,M., GEARY, S.J., SILBART, L.K. (2005). Correlates of immune protection in chickens vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* strain gt5 following challenge With pathogenic *M. gallisepticum* strain Rlow. *Infection and Immunity*. **73(9)**: 5410–5419.
- JORDAN, F.T.W. (1981). Mycoplasmosis in Poultry. *Isr J Med Science* **17**: 540-547.
- JORDAN, F.T.W. (1985). Gordon Memorial Lecture: People, Poultry and Pathogenic Mycoplasmas. *British Poultry Science* **26**: 1-5.
- JORDAN, F.T.W., FORRESTER, C.A., RIPLEY, P.H., BURCH, D.G.S. (1998). In Vitro and In Vivo Comparisons of Valnemulin, Tiamulin, Tylosin, Enrofloxacin. And Lincomycin/Spectinomycin Against *Mycoplasma gallisepticum*. *World Poult. Special Mycoplasma*. Pp. 10-12.
- KLECKNER, A.L. (1960). Serotypes of Avian Pleuropneumonia-Like Organisms. *Am. J. Vet. Res.* **21**: 274-280.
- KLEVEN, S.H. (1987). Biochemical characterization of avian Mycoplasmosis. Avian Virus Diseases (AM 805) *Laboratory Manual*. Pp. 53-62.
- KLEVEN, S.H. (1989). Mycoplasmosis. A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th Ed. SWAYNE, D.E., GLISSON, J.R., JACKWOOD, M.W., PEARSON, J.E. & REED, W.M. (eds). American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania. Pp. 74-80.
- KOJIMA, A., TAKAHASHI, T., KIJIMA, M., OGIKUBA, Y., TAMURA, Y. (1996). Detection Of Mycoplasma DNA in veterinary Like Virus Vaccines by the Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. Sci.* **58 (10)**: 1045-1048.
- KOJIMA, A., TAKAHASHI, T., KIJIMA, M., OGIKUBA, Y., NISHIMURA, M., NISHIMURA, S., HARASAWA, R., TAMURA, Y. (1997). Detection Of Mycoplasma in Avian Like Virus Vaccines by the Polymerase Chain Reaction Biologicals. **25**: 365-371.

- KEMPF, I., GESBERT, F., GUITTET, M. (1997). Experimental infection of chickens with an atypical *Mycoplasma gallisepticum* strain: comparison of diagnostic methods. *Research in Veterinary Science*. **63**:211-213.
- KLEVEN, S.H. (1998). Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. *Poultry Science*. **77**: 1146-1149.
- LAUERMAN, L.H., CHILINA, A.R., CLOSSER J.A., JOHANSEN, D. (1995). Avian Mycoplasma Identification Using Polymerase Chain Reaction Amplicon and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis . *Avian Diseases*. **39**: 804-811.
- LEY, D.H., YODER, H.W. (1997). Mycoplasma gallisepticum Infection in: CALNEK, B.W., BARNES, H.J., BEARD, C.W., MCDOUGALD L.R., SAIF, Y.M. (eds). *Diseases of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, Iowa. Pp. 194-207.
- LEVISOHN, S., KLEVEN, S.H. (2000) Avian Mycoplasmosis. *Rev. Sci. Tech. Off Epiz.* **19 (2)**: 425-442.
- LIU, T., GARCIA, M., LEVISOHN, S., YOGEV, D., KLEVEN S.H. (2001). Molecular Variability of the Adhesin-Encoding Gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* Strains and Its Application in Diagnosis. *Journal Of Clinical Microbiology*. **39(5)**: 1882–1888.
- MCMARTIN, D.A., KHAN, M.I., FARVER, T.B., CHRISTIE, G. (1987). Delineation of the Lateral Spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection in Chickens. *Avian Diseases*. **31**: 814-819.
- MEKKES, D.R., FEBERWEE, A. (2005). Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathology*. **34(4)**: 348-354.
- OSBORN, O.H. and POMEROY, B.S. (1958). Symposium on Chronic Respiratory Disease of Poultry. V. Infectious Sinusitis of Turkeys. *American Journal of Veterinary Research* **19**: 468-472.
- OLSON N.O., KERR K.M. and CAMPBELL A. (1963) Control of infectious synovitis, 12. Preparation of an agglutination test antigen. *Avian Disease*. **7**:310-317.
- OLSON, N.O., YAMAMOTO, R., ORTMAYER, H. (1965). Antigenic Relationship Between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum*. *American Journal of Veterinary Research* **26(110)**: 195-198.
- OPITZ H.M., DUPLESSTIS J.B. and CYR M.J.(1983) Indirect micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *M. gallisepticum*. *Avian Disease*. **27**:773-786.
- ÖZKAYNAK, G. (2004). Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum*'a Karşı Oluşan Antikorların Çeşitli Serolojik Yöntemlerle Saptanması ve Sonuçlarının Karşılaştırılması. Adnan menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, AYDIN.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.K., CARTER G.R. (1994). The Mycoplasmas (Class: Mollicutes). *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing. Pp. 320-326.

- PATTEN B.E., HIGGINS P.A. and JHITHEAR K.G. (1984) A urease-ELISA for the detection of mycoplasma infections in poultry. *Aust Vet. J.* 81:151-155.
- ROBERTS, D.H. (1969). *Serological Response Produced in Chickens by Three Strains of Mycoplasma gallisepticum*. *J. Appl. Bact.*, **32** :395-401.
- ROSENFELD, LE. (1971). Isolation and Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* from a fowl. *Aust Vet Journal.* **47**: 492-495.
- RAVIV, Z., CALLISON, S.A., FERGUSON, N., NOEL, N., KLEVEN, S.H. (2008). Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. *Veterinary Microbiology.* **129(1-2)**:179-187
- STUART, E.E. and BRUINS, H.W. (1963). Pre-incubation Immersion of Eggs in Erythromycin to Control Chronic Respiratory Disease. *Avian Diseases.* **7**: 287-293.
- SALAMI, J.O., ADDO, P., UMOH, J.U., ADEBOYE, D.S. (1992). Chicken mycoplasmosis: a review with special reference to *Mycoplasma gallisepticum* and *M.synoviae*. *Veterinary Bulletin.* **62(6)**: 511-520.
- SALISCH, H., HINZ, K.H., GRAACK, H.D. and RYLL, M. (1998) A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in concurrently infected chickens, *Avian Pathology*, **27**, 142-147.
- STIPKOVITS, L. and KEMPF, I. (1996). Myoplasmoses In Poultry. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.* **15(4)**: 1495-1525.
- SNELL, G.C. (1981). The Effects of Growth in Broth Containing Different Concentration of Glucose and Horse Serum on *Mycoplasma gallisepticum* Rapid Serum Agglutination Antigens. *Journal of Biological Standardization.* **9**: 287-292.
- SHIL P.K., KANCI A., BROWNING G.F., MARKHAM, P.F. (2011). Development and immunogenicity of recombinant GapA⁺*Mycoplasma gallisepticum* vaccine strain ts-11 expressing infectious bronchitis virus-S1 glycoprotein and chicken interleukin. *Vaccine.* **29(17)**: 3197-3205.
- TIMMS, L. and CULLEN, G.A. (1972). Comparative efficiency of four *Mycoplasma gallisepticum* strains as antigens in detecting heterologous infection. *Research in Veterinary Science* **13**: 523-528.
- TIMMS, L. (1989) Avian Mycoplasmosis. Training Course FOR Laboratory Veterinarians Conducted at the Bornova Institute, İzmir, TURKEY.
- TIMONEY, J.F., GILLESPIE, J.H., SCOOTT, F.W., BARLOUGH, J.E. (1988). The Genera *Mycoplasma* and *Ureoplasma*. Hagan and Bruner's *Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. 8th Ed. Cornell University Press. Pp. 295-315.

- TÜRKASLAN, J. ve SALİHOĞLU, H. (1989). Çeşitli Besiyerleri Kullanılarak *Mycoplasma gallisepticum* 'un Bakteriyolojik Yöntemlerle İzolasyon ve İdentifikasyonu. *Pendik Hayvan Hastalıkları Merkezi Araştırma Enstitüsü Dergisi*. **XX (2)** : 53-59.
- ÜLGEN, M. (1991) Kanatlıların kronik solunum yolu infeksiyonu (Chronic Respiratory Disease-CRD) üzerinde karşılaştırmalı bakteriyolojik ve serolojik araştırmalar, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bursa.
- ÜLGEN, M., ŞEN, A., ÇARLI, T. (1995). Tavuklardan İzole Edilen *Mycoplasma* Suşlarının Tracheal Organ Kültürlerinde Patogenitelerinin İncelenmesi. Proje no: VHAG-1084/APD, Ankara.
- VAN Roekel, H., OLESIUK, O.M. and BENINATO, L.P. (1958). Symposium on Chronic Respiratory Disease of Poultry. III. Epizootiology of Chronic Respiratory Diseases in Chickens. *Am.J. Vet. Res.* **19**: 453-463.
- YODER, H.W., HOFSTAD, M.S. (1964). Characterization of Avian Mycoplasma. *Avian Diseases*. **8**: 481-512.
- YODER H.W.JR. and HOFSTAD M.S. (1965) Evaluation of Tylosin İn Preventing Egg Transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in Chickens. *Avian Diseases*. **9**: 291-301.
- YODER, H.W., Avian Mycoplasmosis İn: HOFSTAD, M.S., BARNES, H.J., CALNEK, B.W., REID, W.M. and YODER, H.W.Jr. (1984). *Diseases of Poutry*. 8rd Ed., Iowa State Univ. Pres, Ames, Iowa. Pp. 187-220.
- YODER, H.W.JR. (1988). *Avian Mycoplasmosis, Disease of Poultry*, HOFSTAD, M.S., CALNEK, B.W., HELMBOLDT, .C.F.(1988). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. Pp. 187-200.