

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVUKLARDA MYCOPLASMA GALLISEPTICUM'A KARŞI OLUŞAN
ANTİKORLARIN ÇEŞİTLİ SEROLOJİK YÖNTEMLERLE (LAM AGLUTINASYON,
HEMAGLUTINASYON-İNHİBİSYON, AGAR-JEL PRESİPİTASYON, ELISA)
SAPTANMASI VE SONUÇLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Veteriner Hekim
Ömer M. ESENDAL

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BAKTERİYOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Müjgan İZGÖR

1991 - A N K A R A

1. İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Önsöz	1
Giriş	3
Materyal ve Metot	52
Bulgular	65
Tartışma ve Sonuç	75
Türkçe Özet	86
İngilizce özet (Summary)	88
Kaynaklar	90
Teşekkür	111
Özgeçmiş	112

2. ÖNSÖZ

CRD, tavuk yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan, oldukça bulaşıcı bakteriyel bir enfeksiyondur. Hastalık, solunum sistemi bozukluklarına ilaveten yumurtacı ve damızlık tavuklarda yumurta veriminde azalmalara ve embriyonik ölümlere, broylerlerde ise kilo kayıplarına neden olur. Hastalık etkeninin ilk olarak 1930'lu yıllarda belirlenmesinden sonra yapılan çalışmalarla enfeksiyonun tüm dünyada yaygın olduğu saptanmıştır. Yurdumuzda da etken izolasyon ve identifikasyonu ile birlikte, serolojik testlerle hastalığın varlığı ortaya konulmuştur.

Enfeksiyon, genç hayvanlarda özellikle, komplike olgularda ve predispoze faktörlerin varlığında yüksek düzeyde ölümler meydana getirir. Erişkin hayvanlarda kronik şekle dönüşen CRD enfeksiyonlarında vertikal bulaşma kadar horizontal bulaşma da büyük önem taşımakta ve tavukçuluk endüstrisini kanatlı tifosu kadar tehdit eden bir tehlike haline dönüştürmektedir. Çeşitli ülkelerde, özellikle damızlıkçı işletmeler için geliştirilen CRD'den korunma yöntemleri, Türkiye'de de Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı tarafından "Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerinin Sağlık Kontrol Yönetmeliği" adlı yönetmelik ile düzenlenmiştir.

Etkili bir aşılama programının bulunmadığı CRD

infeksiyonlarında hastalıktan korunmanın ilk koşulu, sağlıklı ve infeksiyondan arı damızlık sürülerin oluşturulmasıdır. Bu amaçla ve ayrıca sürülerde bulunan gizli infekte ve portör hayvanların saptanmasıyla, sürülerin CRD durumunu ortaya koymak amacı ile serolojik testlerden yaygın olarak yararlanılmaktadır.

Bu çalışmada damızlık, yumurtacı ve broyler yönünden yetiştiricilik yapılan ticari işletmelerden ve Ankara Sincan tavuk mezbahasından temin edilen tavuk serumlarının, CRD infeksiyonunun indirekt teşhisinde kullanılan serum lam aglutinasyon (SPA), hemaglutinasyon-inhibisyon (HI), agar-jel presipitasyon (AGP) testleri ve enzyeme-linked immunosorbent assay (ELISA) ile değerlendirilmesi, bu testlerin geçerliliğinin ortaya konulması ve sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

3. GİRİŞ

Kanatlı hayvanlarda *Mycoplasma gallisepticum* infeksiyonları, tavukların Kronik Solunum Sistemi Hastalığı (Chronic Respiratory Disease-CRD) ve hindilerin infeksiyöz Sinüsitis'i olarak bilinmektedir (19, 40, 129, 191, 217, 226). Tavuk ve hindilerde *M. gallisepticum* infeksiyonları hırıltılı soluma, burun akıntısı, aksırık-tıksırık, soluma güçlüğü, tortikollis, sinüsitis, konjunktivitis, hava kesesi yangısı ve bazen de sinirsel semptomların yanısıra yemden yararlanmada, vücut ağırlığında ve yumurta veriminde azalma ile karakterizedir (41, 121, 132, 175, 191, 203, 234).

Hindilerde *M. gallisepticum* infeksiyonu ilk olarak İngiltere'de 1905 yılında Dodd (56) tarafından "epizootik pnömoenteritis" adı altında bildirilmiş ve aynı hastalık 1926 yılında Tyzzer (199) tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde saptanmıştır. Dickinson ve Hinshaw (54), 1938 yılında mortalitesi düşük, morbidite oranı ise % 10-90 arasında değişen bu hastalığı, vitamin A noksanlığına bağlı olarak hindilerde şekillenen sinus yangısından ayırt etmek için, "infeksiyöz Sinüsitis" olarak adlandırılmışlardır. Tavuklarda ise *Mycoplasma* türlerinin varlığı ilk kez Nelson (135) tarafından 1930'lu yıllarda tespit edilmiş, hastalık 1943 yılında Delaplane ve Stuart (53) tarafından "Kronik Solunum Sistemi Hastalığı-CRD" olarak adlandırılmıştır. Bu tarihten sonra başta İngiltere (41) ve Avustralya (44) olmak

üzere dünyanın pek çok ülkesinde (226) etken izolasyon ve identifikasyonu yapılarak hastalığın tüm dünyada yaygın olduğu ortaya konulmuştur. Yurdumuzda hastalıkla ilgili fazla bir kayıt bulunmamasına rağmen etkenin izole ve identifiye edilmesiyle ve ayrıca hastalığın serolojik olarak tespit edilmesiyle ilgili son yıllarda yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (20, 22, 67, 197, 198, 201).

Nelson (135, 136), 1935 yılında nezleli tavukların burun akıntılarından hazırladığı preparatlarda kokobasil formu mikroorganizmaların varlığını saptamış, 1936 yılında bu kokobasil formu mikroorganizmaların 0.5 μ veya daha küçük çapta olduklarını, direkt temas ile tavuklarda yavaş başlayan ancak kronik seyirli bir solunum sistemi infeksiyonu (tip II nezle) oluşturduklarını ve oluşan bu infeksiyonun Haemophilus gallinarum'dan ileri gelen nezleye oranla daha uzun bir inkubasyon süresine sahip olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı, sonradan, hastalığın etiyolojik etkeni olduğunu sandığı bu kokobasil formu mikroorganizmaları embriyolu tavuk yumurtaları, tavuk embriyo doku kültürleri ve yapay besi yerlerinde üretmeyi başarmış ancak, hastalık etkeni Plöropnömoni grubu mikroorganizmaların birçok özelliğini göstermesine rağmen, agar üzerinde tipik üreme elde edemediğinden bu mikroorganizmayı bir kokobasil (Nelson kokobasili) olarak adlandırmıştır (137, 138). Delaplane ve Stuart (53), 1943 yılında tavuklarda görülen ve CRD olarak adlandırdıkları infeksiyonda hastalık etkenini embriyolu tavuk yumurtalarında

Üretmişler, ancak, etkenin hücre dışı besiyerlerinde ürememesi ve infekte sarı keselerinden hazırlanan boyalı preparatlarda görülebilmesi nedeniyle, bunun bir virus olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Van Herick ve Eaton (202) 1945 yılında embriyolu tavuk yumurtalarından izole ettikleri Plöropnömoni-benzeri bir mikroorganizmayı (Pleuropneumonia-Like Organism-PPLO) besiyerlerinde üretmişler fakat bunun, tavukların CRD'si ile ilişkisini ortaya koyamamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, kanatlı PPLO'larının tavuk eritrositlerini aglutine ettiklerini ve bu reaksiyonun infekte tavuk serumları tarafından inhibe edilebildiğini bildirmişlerdir. Delaplane (52), 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 oluştuğunu ve korioallantoik membranda da beyazımsı odakların şekillendiğini bildirmiştir. Tavukların CRD ve hindilerin infeksiyöz Sinüsitis'inin etiyolojik etkenlerinin Chlamydia (86, 106), Rickettsia (93, 100) veya virus (85, 153, 154, 203, 204) olabileceği bildirilirken, söz konusu hastalıkların etkenleri ile ilgili gerçeğe en yakın bilgiler, etkenlerin hücre dışı besiyerlerinde de üreyebildiklerini gösteren ve bunların PPLO olabileceklerini ileri süren Markham ve Wong (129) tarafından verilmiştir. Araştırmacılar, CRD ve infeksiyöz Sinüsitis etkenleri inokule edilmiş embriyolu yumurtaların sarı keselerinden % 20 at serumu içeren et infüzyon

buyyonunda PPLO'ları üreterek besi yerlerinde yaptıkları 13 seri pasajdan sonra etkenlerin infra-orbital sinusa enjekte edilmeleriyle hindilerde tipik sinüsitis oluşturdıklarını, sinus içeriklerinden yapılan Giemsa boyamalarda Plöropnömoni gurubu mikroorganizmalara benzer mikroorganizmaların görüldüğünü bildirmişler ve etkenleri tanımlamak için PPLO terimini kullanmışlardır. Gross ve Johnson (84), 1953 yılında CRD ve infeksiyöz Sinüsitis etkenlerinin streptomisin'e duyarlı ve kloromisetin'e dirençli olmaları nedeniyle Rickettsia'lardan; yine streptomisin'e duyarlı ve penisilin'e dirençli olmaları nedeniyle de Chlamydia'lardan ayrıldıklarını bildirmişlerdir. Etkenleri % 20 at serumu ile zenginleştirilmiş sıvı besi yerlerinde üreten Wong ve James (217), bunların morfolojileri ve Macchiavello boyasıyla boyanma özelliklerine göre PPLO olduklarını ortaya koymuşlardır. Chute ve Cole (42), etkenin embriyolu tavuk yumurtalarında iyi ürediğini, amnion ve sarı keseleri ile birlikte embriyonun derisinde hemorajiler oluşturduğunu, embriyolarda bodurluğun yanısıra bacak, kanat ve çene eklemlerinde şişkinlikler saptadıklarını bildirmişlerdir. Adler (2), 1954 yılında CRD ve infeksiyöz Sinüsitis etkenleri ile infekte tavuk ve hindilerin serumlarında oluşan spesifik antikörlerin saptanmasında lam aglutinasyon testinin kullanılabilceğini belirtirken, Fahey ve Crawley (74), infeksiyonların serolojik teşhisinde hemaglutinasyon-inhibasyon (HI) testinin kullanılabilceğini bildirmişlerdir. Zander (234), 1954 yılında sinüsitis, göz akıntısı ve öksürü-

ğün yanısıra merkezi sinir sistemine ait bozuklukların da görüldüğü 8 haftalık hindilerin trachea, hava keseleri ve sinuslarının dışında sinirsel septomlar gösteren bir hindinin beyninden patojenik bir PPLO suşu izole ettiğini ve bunu S6 suşu olarak adlandırdığını bildirmiştir. CRD ve infeksiyöz Sinüsitis etkenlerinin civciv embriyolarında üreme, antibiyotiklere duyarlılık ve morfolojileri bakımından birbirlerinin aynısı oldukları (84, 209), değişik kanatlı türlerinden ve coğrafik bölgelerden izole edilmiş 7 PPLO suşunun da tek bir serotipi veya türü temsil ettikleri bildirilmiştir (80). Crawley ve Fahey (47), PPLO infeksiyonlarının bir nesilden diğerine geçmesinde, etkenin yumurta yoluyla bulaşmasının önemli olduğunu ve kanatlı hayvanlarda PPLO infeksiyonlarının kontrolünde HI testinin kullanabileceğini açıklamışlardır. Kanatlı hayvanlarda birden fazla Mycoplasma türünün bulunduğu ilk kez, sinüsitis'li bir hindiden birisi patojenik ve diğeri apatojenik olan iki farklı Mycoplasma suşu izole eden Adler ve Yamamoto (10) tarafından gösterilmiştir. Adler (3), sinüsitisli bir hindiden izole ve identifiye ettiği standart S6 suşundan serolojik olarak farklı özellikler gösteren bir PPLO suşunu N suşu olarak adlandırılmıştır. Aynı yıllarda Chalquest ve Fabricant (39), infeksiyöz Sinovitis'li tavuk ve hindilerden değişik bir Mycoplasma suşu izole etmişler, Yoder ve Hofstad (228) ise, hava kesesi yangısı bulunan bir hindiden Iowa 695 adını verdikleri bir suşu izole ve karakterize etmişlerdir. Edward ve Kanarek (66), 1960 yılında tavuklarda CRD ve hindi-

lerde de infeksiyöz Sinüsitis oluşturan patojenik Mycoplasma suşunu *M. gallisepticum* ve apatojenik olanları da *M. iners* olarak adlandırmışlardır. Chalquest ve Fabricant (39) tarafından infeksiyöz Sinovitis'li hayvanlardan izole edilen suş Olson ve ark. (144) tarafından *M. synoviae* olarak adlandırılırken, Adler'in (3) N suşu olarak bildirdiği izolat da *M. meleagridis* olarak adlandırılmıştır (65). Bugün için yaklaşık 20 kanatlı Mycoplasma serotipi izole ve identifiye edilmiştir (55, 113, 156, 177, 229). Adler ve Lamas DaSilva (7), *M. gallisepticum*'a karşı tavuklarda aşılama denemeleri yapmış ve inaktive *M. gallisepticum* ile i.v. olarak inokule edilen tavuklarda, abdominal hava kesesi yoluyla yapılan eprüvasyonlara karşı kısmî bir korunma oluştuğunu bildirmişlerdir. *M.gallisepticum* ile ilgili yapılan çalışmalar 1980 yılından sonra daha ziyade moleküller biyoloji düzeyinde sürdürülmüştür (23, 111, 112, 115, 123, 235).

Mycoplasma gallisepticum, Bergey's Manual 1984'e göre, Yumuşakçalar (Mollicutes) sınıfının Mycoplasmatales takımındaki Mycoplasmataceae familyasında bulunan Mycoplasma cinsine ait bir türdür (152). *M. gallisepticum* yaklaşık 0.3-0.8 µm büyüklüğünde oval, halka, yüzük, kokoid, filamentöz veya yıldız şeklinde pleomorfik bir mikroorganizmadır (15,22, 41, 61, 63, 152, 209). Gram negatif olmalarına karşın anilin boya ile güç boyanırlar. Etkenin boyanması amacıyla Giemsa, Macchiavello ve Castaneda gibi boyama yöntemleri

kullanılır ve bilhassa Giemsa yöntemi ile iyi boyanarak mavi mor renkte görülür (22, 42, 61, 80, 129, 152, 226). Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz olan *M. gallisepticum*'un bazı patojenik suşlarında hücre yüzeyinin, ökaryotik hücrelerin polisakkarid glikokaliks yapısındaki polianyonlarını boyamada kullanılan ruthenium kırmızısı ile boyanabilen, etkenin trachea epiteline yapışmasını sağlayan, kapsüler bir materyalle kaplı olduğu (152, 180), benzer şekilde patojenik bazı suşların kayma şeklinde bir hareket gösterdikleri ve bu hareket sayesinde etkenin müköz membranlara ulaştığı ve makrofajların içine girerek komplementin zararlı etkinlerinden korunduğu bildirilmektedir (152, 191). Bilinen anlamda ekzotoksinleri yoktur. Tavuklarda oluşturduğu nörotoksik etkiler eriyebilir ekzotoksinlerinden ziyade, fazla miktarda canlı etkenin varlığı sonucu oluşur (149). Diğer *Mycoplasma*'larda olduğu gibi *M. gallisepticum*'da da hücre duvarı ve sert bir peptidoglikan polimeri bulunmaz. Bunun yerine hücrenin etrafında lipidlerden (fosfolipidler, glikolipidler, lipoglikanlar, steroller), karbonhidratlardan ve proteinlerden oluşan unit membran yapısında 3 katmanlı bir sitoplazmik membran vardır. Hücrenin bir veya iki ucunda plazma membranından kaynaklanan ve dışarıya doğru uzanan 800x1250 Å boyutlarında ve yarım ay şeklinde oldukça gelişmiş bir yapıya sahip olan polar kabarcıklar bulunur. Bazik proteinler yönünden zengin olan bu kabarcıklar etkenin epitel hücrelerine ve eritrositlerdeki glikoforin reseptörleri yardımıyla da eritrositlere tutunmalarına aracılık eder (22,

101, 152, 191, 195, 200). Ünit membrandaki karbonhidrat molekülleri komplemanın fikze edilmesinde ve nötralizan antikorların saptanmasında etkin rol oynarken, membran proteinleri de metabolik inhibisyon ve presipitasyonda rol alan antikorların sentezlenmelerini uyarırlar (108). Yapılan çalışmalar *M. gallisepticum*'un hem ortadan ikiye bölünerek hem de tomurcuklanma ile ürediğini göstermiştir (63, 152, 191, 226). Etkenin ince kesitleri incelendiğinde hücrelerde hücre membranı, ribozamlar ve yaklaşık 5×10^8 daltonluk tipik bir prokaryotik genom olmak üzere 3 esansiyel organelin bulunduğu, mezozomların ise bulunmadığı gözlenmiştir (101, 102, 152, 191, 200). *M. gallisepticum*, yaygın olarak kullanılan antimikrobiyel maddelere karşı duyarlıdır (226). Hücre duvarları olmaması ve peptidoglikan polimerlerinin bulunmaması nedeniyle penisilin ve 1/4000 gibi düşük konsantrasyonlarda talyum esastat'a karşı direnç göstermeleri, bu maddelerin bakteriyel kontaminasyonları önlemek amacı ile besi yerlerine katılmalarına olanak tanır (34, 37, 40, 139, 214, 229). Etken penisilin dışında polimiksin ve neomisin gibi antibiyotiklere karşı da direnç gösterir (191). *M. gallisepticum*, Berkefeld V, N, Mandler 6 ve 7 filtrelerinden geçebilir fakat Berkefeld W, Selas 0.3 veya Seitz EK filtrelerinden geçemez. Etken 45 °C de 1 saatte ve 50 °C de 20 dakikada inaktive olurken, -35 °C de dondurulduğunda ise 2 yıl boyunca canlılığını koruyabilir (147, 153, 209). Chandiramani ve ark. (40), etkenin tavuk dışkısında 20 °C de 1-3 gün, yumurta sarısında ise 37 °C de

18 hafta veya 20 °C de 6 hafta canlılığını koruyabildiğini bildirmişlerdir. Yoder (226), infektif korioallantoik membranın buyyon süspansiyonlarının 45 °C de 1 saat, 50 °C de 20 dakika veya 5 °C de 3 hafta içinde infeksiyon gücünü kaybederken infektif allantoik sıvının etüvde 4 gün, oda ısısında 6 gün, buzdolabında 32-60 gün süre ile infeksiyon gücünü koruyabileceğini bildirmiştir. Roberts (155) ve Yoder (225), besi yerlerine % 0.1 oranında katılan beta-propiolaktonun (BPL) *M. gallisepticum* kültürlerini inkative ettiğini bildirirlerken, Yoder (224), infekte kuluçkalık tavuk yumurtalarının ısı ile muamele prosedürü sırasında 12-14 saat süre ile 114 °F ye maruz bırakılmalarının yumurtalarda bulunan etkenlerin inaktivasyonu için yeterli olduğunu bildirmiştir. *M. gallisepticum*'un buyyon kültürleri -30 °C de saklandıklarında 2-4 yıl canlılıklarını koruyabilirler. Liyofilize halde ise etken 4 °C de 7 yıl canlılığını muafaza edebilir (229).

Mycoplasma gallisepticum, aerobik veya fakültatif anaerobik (70) olup üretilmesi için kolesterol'e ihtiyaç duyan bir mikroorganizmadır. Bu nedenle etkenin üretilmesi için besi yerine at, domuz veya kanatlı serumu gibi kolesterol yönünden zengin serumlar ilave edilebilir (152). Edward (64), 1947 yılında, kaynatılmış bira mayası ekstraktında PPLO'ların at serumuyla zenginleştirilmiş buyyonda üremesini güçlendiren bir faktör bulunduğunu bildirmiştir. Adler ve Yamamoto (8), 4 farklı maya ürününün kanatlı PPLO'larının üretilmeleri

Üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve % 8 at serumlu besi yerine % 16 oranında ilave edilen maya otalizatının hem üremeyi güçlendirmesi hem de daha fazla miktarda antijen elde edilmesi için en uygun maya ürünü olduğu bildirmişleridir. Genel besi yerlerinde üreme göstermeyen *M. gallisepticum* 'un üretilmesi için PPLO buyyon veya agar (34, 48, 113, 118, 210, 222), beyin kalp infüzyonu (1, 18, 31, 79, 120, 121), *Brucella* agar veya buyyon (103, 139), fenol red buyyon (37, 74), tryptose fosfat buyyon (87), veya trypticase soy (4) gibi temel besi yerlerine üremeyi sağlamak amacı ile % 10-15 oranında at serumu (6, 7, 120, 133, 157, 193, 218), domuz serumu (117, 183, 184, 194, 211, 223) veya kanatlı serumu (27, 130, 218, 228, 229) ve üremeyi güçlendirmek amacı ile de maya otolizati (48, 63, 97, 161, 174, 229), maya ekstraktı (40, 116, 184, 194, 214) veya maya hidrolizati (3, 12, 79, 222) gibi maya ürünleri ilave edilmiş özel besi yerleri kullanılır. Besi yerlerine üremeyi sağlamak amacı ile serum fraksiyonu da katılabilir (13, 28, 113, 121, 214). Besi yerlerine glukoz (12, 34, 120, 139, 174, 184), dekstroz (6, 28, 48, 158, 192), maltoz (74, 87) veya laktoz (37) gibi karbonhidratların katılması üreme üzerinde olumlu etkide bulunur. Özellikle izolasyon amacı ile besi yerlerinin selektif hale getirilmesi için 100 IU/ml oranında penisilin ve 1/4000 oranında talyum asetat ilave edilir (34, 37, 40, 139, 214, 229). İzolasyon ve antijen üretimi amacıyla çok çeşitli besi yerleri denenmiş ve geliştirilmiştir (4, 13, 17, 78, 96, 182). Adler ve Berg (4), kanatlı *Mycoplasma*'larının

Üretilmesinde besi yerine, at serumu yerine yumurta sarısının, Ahmad ve ark. (17) da serum yerine, antijen hazırlanması sırasında sunî lipozomların besi yerlerine katılabileceklerini bildirmişlerdir. Adler ve ark. (13), CRD'li hayvanların trachea'larından etken izolasyonu çalışmaları sırasında trypticase soy besi yerini tryptose agar veya buyyona göre daha etkili bulmuşlardır. Adler ve Yamamoto (8), antijen üretimi sırasında sıvı kültürlerin belli aralıklarla çalkalanmasının *M. gallisepticum*'un üremesi üzerinde olumlu bir etkide bulunduğunu bildirmişlerdir. Frey ve ark. (78), *M. gallisepticum*'un, *M. synoviae*'nin ve *M. meleagridis*'in üremelerini ve izolasyonlarını kolaylaştıran, hemen her türlü besin maddelerini içeren ve French Medium adı verilen (FM1, -2, -3, -4 ve -5) besi yerlerini geliştirmişlerdir. Uygun şekilde hazırlanmış selektif agarda *M. gallisepticum*, 37 °C de ve oldukça rutubetli bir ortamda (70) 3-5 günlük inkubasyon sonunda üreme gösterir. İndirekt ışık altında ince, yuvarlak, kenarları düzgün ve agarın içine doğru üreme gösterdiğinden ortaları düğmeli tarzda tipik koloniler görülür (8, 15, 22, 40, 226). Genellikle, 0.2-0.3 mm çapında olan koloniler ekim hattı boyunca yanyana şekillenirler ve kolaylıkla birbirleriyle birleşebilirler (191, 226). Buyyonda ise optimal üremenin şekillenmesi için 1-3 günlük bir inkubasyona gereksinim vardır. Tekrarlanan pasajlar sonucunda laboratuvar koşullarına adapte olan suşlar daha kısa sürede daha yoğun bir bulanıklık oluşturarak ürerler (113, 229). At kanlı agarda *M. gallisepticum* suşları

hemoliz meydana getirir (152, 228, 229). *M. gallisepticum* glukoz, maltoz, sukroz, levüloz, trehaloz, galaktoz, nişasta, mannoz, dekstrin, sakkaroz ve ksiloz gibi karbonhidratları gaz oluşturmaksızın sadece asit oluşturarak fermente ederken laktoz, mannitol, dulcitol, salisin, adonitol, arabinoz, sellobioz, inositol, inülin, rafinoz, rhamnoz ve sorbitolü fermente edemez (22, 80, 113, 177, 222, 226). Fosfataz, arjinin ve jelatin hidroliz, koagüle serum ve kazein sindirim testleri negatiftir (152). Yoder ve Hofstad (229), etkenin 2,3,5-trifenil tetrazolium kloridi ve Yamamoto ve Adler (222) de, tetrazolium mavisini redükte ettiğini bildirmişlerdir. Yoder ve Hofstad (229), besi yerlerine katılan maya otolizatının, sukrozu daha çabuk fermente olabilen dekstroz ve fruktoza parçalayan sukraz enzimi içerdiğini ve bu nedenle sukroz fermentasyonu ile ilgili ilk çalışmalarında güvenilir sonuçlar alamadıklarını, maya otolizatının bu etkisini gidermek için izolatların en az 4 kez maya otolizatı içermeyen besi yerlerinde pasaj edilmelerinin gerekli olduğunu bildirmişler ve daha sonra yaptıkları çalışmalarda maya otolizatı bulunmayan besi yerlerinde üretilen kültürlerle fermentasyon oluşumunu gerçek pH değişikliklerine göre saptamışlardır. *M. gallisepticum*'un izole edilmesi ve üretilmesi için 6-8 günlük embriyolu tavuk yumurtalarının sarı keselerine inokulasyon yöntemi de çeşitli araştırmacılar tarafından uygulanmıştır (9, 15, 84, 106, 179, 217, 221). Adler ve Yamamoto (10), bu amaçla sarı kesesi dışında allantoik kese ve korioallantoik membran yollarıyla da

inokulasyonlar yapmışlardır. Araştırmacılar, denedikleri bu 3 inokulasyon yolundan, yumurta sarısı yoluyla inokulasyon yapılan embriyolarda düzenli bir ölüm seyrinin şekillendiğini açıklamışlardır. Chute ve Cole (42), sarı kesesi yolu ile inokule ettikleri 7 günlük embriyolarda oluşan patolojik değişiklikleri incelemişler, inkubasyonun 8-14. günlerinde ölen embriyolarda baş, boyun ve göğüs bölgelerinde ekimotik hemorajilerle birlikte seyrek tüylenme, genel bir ödem ve korioallantoik membranda da kalınlaşma ve matlaşma saptamışlardır. Öte yandan 14-21. günlerde ölen embriyolarda ise baş, boyun, dil altı ve göğüs bölgelerinde ödem, karaciğerde hiperemi ve nekrotik odaklar, böbreklerde hemorajiler ve eklemlerde ödemle birlikte, korioallantoik membranın kalınlaşmış, matlaşmış, kurumuş ve embriyoya yapışmış bir durumda olduğunu bildirmişlerdir. Embriyolarda bodurluk ve büyümede gecikme olguları Glavits ve ark. (81) tarafından bildirilmiştir. Hitchner (93), korioallantoik, amniotik ve allantoik yollarla inokule ettiği 11 günlük embriyolarda şiddetli lezyonlar görülmesine rağmen inokulasyondan sonraki 19-21. güne kadar embriyo ölümlerinin şekillenmediğini açıklamıştır. Moulton ve Adler (133), yumurta sarısı yoluyla inokule ettikleri 8 günlük embriyolarda şekillenen eklem lezyonlarının 5. günden itibaren görülmeye başladığını ve 6. günden sonra ölen bütün embriyolarda ise eklem lezyonları ile birlikte derilerinde şiddetli hemorajiler saptandığını bildirmişlerdir. M. gallisepticum ayrıca Hela, tavuk kalbi ve tavuk fibroblastı gibi hücre

kültürlerinde CPE'ler meydana getirerek üreyebilir (22).

Mycoplasma gallisepticum, doğal koşullarda tavuk ve hindilerde infeksiyon meydana getirmektedir (175). Hastalık her yaştaki tavuk ve hindide görülürken yüksek mortalite, yavaş büyüme ve kesim anında yüksek telefata gibi ağır kayıplar en çok 5-16 haftalık hayvanlarda gözlenir (203). Etken ayrıca sülünlerin (110, 147), keklıkların (110, 211, 228), tavus kuşlarının (196), bıldırcınların (127), ördeklerin (29, 72, 157), kazların (30) ve serçelerin (170) doğal infeksiyonlarından da izole edilmiştir. Winterfield (216) ve Gianforte ve ark. (80), güvercinlerde de *M.gallisepticum* infeksiyonunun oluşabileceğini bildirmişlerdir. Laboratuvar hayvanları arasında da İsviçre beyaz fareleri ve Norveç ratları deneysel infeksiyonlara karşı duyarlıdırlar (147).

Tavuk ve hindi sürülerinde *M.gallisepticum*'un bulaşması yumurta yoluyla vertikal olarak veya direkt temas ile horizontal olarak şekillenmektedir (46, 102, 141, 147, 165, 191, 226). CRD hastalığının infekte anaçlardan yumurta yoluyla civcivlere geçtiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Fahey ve Crawley (73), etkeni infekte anaçlardan, kabuk altında ölen embriyolardan ve yumurtadan çıkan cılız civcivlerden izole etmişler, ve yumurtayla bulaşmanın, hastalığın yayılmasında önemli olduğunu leri sürmüşlerdir. Osborn ve Pomeroy (147), etkenin dölsüz yumurtalardan da izole edilebileceğini bildirmişlerdir.

Van Roekel ve ark. (203), inceledikleri ticarî bir işletmeye ait 1588 embriyonun % 7.5'inde CRD lezyonları bulunduğunu ve ayırdıkları 10 grup yumurtanın ise 7'sinden etken izole edildiğini, Yoder ve Hofstad (230), izole ettikleri Iowa 695 serotipine ait 23 izolatu 7 günlük embriyolu tavuk yumurtalarına sarı kesesi yolu ile inokule ederek oluşturdukları deneysel infeksiyon sonucunda etken izolasyonu ile birlikte 17 izolatu embriyolarda tipik mortalite oluşturduklarını açıklamışlardır. Lin ve Kleven (124) ise, *M. gallisepticum* F suşunun tavuklara aerosol yolla verilmesinden 4-7 hafta sonra hayvanların yumurtalarından % 1.59 oranında ve aynı yolla R suşu verilen hayvanların yumurtalarından da % 3.19 oranında etken izole edildiğini bildirmişlerdir. Hastalığın yayılmasında etkenin yumurtayla bulaşmasının önemli bir rol oynadığını gösteren Yoder (224), deneysel olarak infekte ettiği yumurtaların inkubasyon öncesi ısıya maruz bırakılmalarının, yumurtalardaki etkenlerin inaktive edilmesinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Yoder ve Hofstad (229), infekte tavukların ovaryum ve oviduktlarından ve horozların da semenlerinden *M. gallisepticum* izole etmişler, Jordan ise (102), mekanizmasının tam olarak bilinmemesine rağmen bulaşmanın hematojen yolla ovaryumların veya oviduktların infekte olması ya da infekte hava keselerinden etkenin direkt olarak bu organlara ulaşması sonucu şekillenebileceğini bildirmiştir. Deneysel olarak oluşturdukları yumurtayla bulaşma denemeleri sonunda Calnek ve Levine (37), etkenin, 37 °C de tutulan dölsüz yumurtalarda 4-8 gün içinde öldüğünü,

etkenin canlılığını muhafaza edebilmesi için yumurtanın mutlak surette döllü olması gerektiğini bildirmiş, teze ve 5 günlük embriyolu yumurtalara sarı kesesi yoluyla yaptıkları inokulasyon sonunda yumurtalardan çıkan civcivlerin solunum kanallarında CRD lezyonları saptamışlardır. Yetişkin tavuklara periton içi, damar içi ve ovidukt içi yollarla yaptıkları inokulasyonlar sonunda ise araştırmacılar, yumurtayla bulaşma elde edememişlerdir. Cover ve Waller (45), büyük bir ticarî damızlık sürüden kaynaklanan yumurtaların % 72'sinden etken izole ettiklerini açıklamışlardır. Inkubasyon sırasında döllü yumurtalara giren *M. gallisepticum*'un, embriyoların ancak bir kısmını öldürebildiği, hayatta kalan embriyoların infekte bir halde yumurtalardan çıktıkları ve infeksiyonun yayılmasında önemli bir rol oynadıkları bildirilmektedir (73, 81). Hofstad (94) ve Osborn ve Pomeroy (147), hindilerde bulaşma yolları üzerinde araştırmalar yapmışlar ve bunlarda da yumurtayla bulaşmanın önemli olduğunu göstermişlerdir. Ördek ve kazlarda da *M. gallisepticum*'un yumurta yoluyla yavrulara geçtiği bildirilmiştir (29, 30). Hastalığın direkt temas veya mekanik yollarla bulaşabileceğini de bildiren araştırmacılar (75, 102, 147, 191, 226), sinus ve trachea da lokalize olan etkenlerin burun, göz akıntıları ve aksırık-tıksırık ile dışarı çıktığını ve özellikle entansif yataştırıcılık yapılan kalabalık kümeslerde, sıklıkla horizontal bulaşmaya neden olduğunu bildirmektedirler. Fahey ve Crawley (75), burun içi yolla infekte ettikleri 11 günlük piliçlerle aynı kümese

konan, aynı yaştaki normal piliçlerde 11 gün içinde aksırık tıksırık ve burun akıntısı gibi solunum sistemi bozuklukları ile birlikte 19. günde HI antikör titreleri saptadıklarını ileri sürmüşlerdir. Yine entansif yetiştiricilik yapılan kümeslerde asemptomatik taşıyıcı hayvanlardan kaynaklanan damlacık infeksiyonu ile de bir kümes içinde veya nadiren de kümesler arasında infeksiyonun yayılması gerçekleşebilir (102, 147, 226). Ayrıca, kontamine ekipmanlarla temas sonucunda (226) veya işletmelerde uygulanan cinsiyet tayini, suni tohumlama veya aşılama işlemleri sırasında (191), ve bakıcılar ve ziyaretçiler aracılığı ile (102) de mekanik bulaşma şekillenir. Etkenin konakçılar dışında çevre koşullarında uzun süre canlı kalamaması, direkt veya indirekt horizontal bulaşma riskini azalttığı gibi değişik yaş gruplarından hayvanları bir arada bulunduran büyük işletmeler, kalabalık kümesler ve uygun olmayan bakım ve beslenme koşulları ile birlikte insektler ve yabani kuşlar horizontal bulaşma riskini artırırlar (101, 102, 191). Benton ve ark. (31), ticarî bir infeksiyöz Laringotracheitis aşısından *M. gallisepticum* izole etmişler fakat bunun aşılanan hayvanlarda bulaşmaya neden olup olmadığını belirleyememişlerdir.

Mycoplasma gallisepticum infeksiyonunun oluşmasında etkenin vücuda giriş yolu büyük bir önem taşır ve doğal koşullar altında etken, genellikle vücuda solunum kanalından girer. *Mycoplasma*'lar genelde müköz membranlara kolonize olan ve epitel hücrelerine affinite gösteren yüzey parazitleri

olup (102, 175, 191), vücutta en çok buldukları yer solunum kanalıdır (158, 175). Bazı suşlar beyine (234) ve kloakaya (102) da affinite gösterirler. Solunum kanalıyla vücuda giren etken, solunum kanalının herhangi bir yerinde lokalize olabilir. Etkenin canlılığını sürdürebilmesi ve patojenite gösterebilmesi için büyük önem taşıyan bu lokalizasyonda, etkende bulunan ve sitoplazmadan dışarıya doğru uzanan polipeptid yapıdaki polar kabarcıklar büyük rol oynarlar (102, 191). *M. gallisepticum* bu kabarcıklar sayesinde epitel hücrelerinin sialik asit reseptör bölgelerine tutunur. Bu kabarcıklar vakum benzeri bir fonksiyon göstererek etkenin konakçı hücrelerine sıkıca tutunmasına ve bu arada hücre dışındada, canlı olarak kalmasına olanak tanır (191). Solunum sistemi viruslarının (NDV, IBV, ILTV) müköz membranlarda ve epitel hücrelerinde meydana getirdikleri tahribatlar, *M. gallisepticum*'un buralara yerleşerek üremesini güçlendirir (43). Konakçı hücrelerine tutunmayı takiben etken çoğalarak epitel üzerinde bir yayılım gösterir. Solunum kanalı yoluyla oluşan enfeksiyonu takiben bir septisemi dönemi olur ve bu dönemde kandan etken izolasyonu yapılabilir. Septisemi sonucunda etken abdominal ve torakal hava keselerine, beyine, kloakaya, yumurtalıklara ve testislere ulaşarak bu organlarda da lokalizasyon oluşturabilir (102). Başlangıçta epitel altındaki dokularda bir invazyon şekillenmez. Konakçı hücrelerine tutunmayı takiben *M. gallisepticum* hücrelerde silier hareketin kaybolması (ciliostasis) ve mitokondriaların genişlemesi gibi çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler oluştu-

rur. Etken ayrıca, endotel hücrelerinin şişkinlesmesine ve permeabilitelerinin artmasına yol açan toksik ürünler salgı- lar. Konakçı dokularındaki tahribat, direkt olarak Mycoplasma'ların etkisiyle veya onlara karşı oluşan spesifik immün yanıtın sonucu şekillenir. Gerçek anlamda ekzo- ve endotoksinleri olmayan M. gallisepticum, hücresele besin maddelerini kullanma veya yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi metabolik ürünler sentezlemek suretiyle direkt doku tahribatına neden olur. Salgılanan H_2O_2 direkt olarak konakçı hücrelerinin hücre membranlarını tahrib eder. İnfeksiyon oluştuktan sonra sub-epitelyal dokularda meydana gelen değişiklikler öncelikle yangısel bir yanıtı izleyen ve lenfositik germinal merkezlerin oluşması ile karakterize olan spesifik bir immün yanıttır. M. gallisepticum'a bağlı oluşan solunum sistemi infeksiyonlarında, konakçının savunma mekanizması sonucunda lenfoid hücre proliferasyonu ile birlikte makrofaj ve uzun süre bir nötrofil birikimi şekillenir. Şekillenen lezyonların şiddeti diğer patojenlerin veya olumsuz çevre koşullarının varlığından büyük ölçüde etkilenir. Özellikle solunum sistemi viruslarının ve E. coli'nin salgıladıkları lizozomal enzimler Mycoplasma'ların penetrasyonunu güçlendirir ve hücre tahribatında artmaya neden olurlar. Embriyolu tavuk yumurtalarında, embriyonal dönemdeki konakçının infeksiyona karşı oldukça duyarlı olması, etkenin embriyo dokularında kolaylıkla üreyebilmesini ve embriyonun bütün dokularına yayılmasını sağlar (102, 191).

Doğal CRD olgularında hayvanların *M.gallisepticum* ile ne zaman infekte olduklarının belirlenebilmesi çok zordur ve birçok faktörün, infeksiyonun klinik olarak başlaması ve seyri üzerinde etkili olmasından dolayı, kesin bir inkubasyon süresinin saptanması olanaksızdır. Tavuk ve hindi sürülerinde doğal CRD ve infeksiyöz Sinüsitis olgularının büyük bir çoğunluğu, yumurtlama periyodunun hemen başlangıcında şekillenir (226). Tavuk ve hindi sürülerinde oluşturulan deneysel infeksiyonlar sonucunda inkubasyon süresi genellikle 1-3 hafta olarak saptanmıştır (75, 135, 139, 158, 176, 192, 204). Kanatlı hayvanlarda *Mycoplasma* türlerinin varlığını ilk olarak ortaya koyan Nelson (135), CRD etkeni inokule edilmiş 72 hayvanın % 88'inde 12 gün veya daha uzun bir inkubasyon süresinden sonra burun akıntısı şekillendiğini (tip II koriza) bildirmiştir. Van Roekel ve ark. (204), deneysel olarak infekte ettikleri piliçlerin % 50'sinde inokulasyondan 4-8 gün sonra başlayan ve 14-21 gün süren hırıltılı soluma saptadıklarını, Markham ve Wong (129), infra-orbital sinus yolu ile infekte ettikleri hindilerde inokulasyondan 7-9 gün sonra sinüsitis gözlediklerini, Fahey ve Crawley (75), eprüvasyondan 19 gün sonra ilk HI titrelerinin saptandığını ve 32. günde tüm hayvanların pozitif reaksiyon verdiklerini ve hastalığın klinik seyrinin 12-20 hafta arasında değiştiiğini, aynı araştırmacılar (77), tavuklardaki PPLO infeksiyonu ile 1936 yılında Nelson'un (135) bildirdiği tip II korizanın aynı olduğunu ve infeksiyonun 8-31 günlük bir inkubasyon süresine ve en az 8 hafta süren uzun bir seyir süresine sahip

olduğunu açıklamışlardır. Adler ve Yamamoto (9), Haemophilus gallinarum ve PLO karışımı verilmiş piliçlerin tümünde 2-4 günlük bir inkubasyondan sonra 36 gün boyunca süren bir nezle ile birlikte kanda aglutininleri saptadıklarını, Olson ve ark. (143), inokulasyon yapılmamış sağlıklı piliçlerde, infekte tavuklarla direkt temas sonucunda 6-8 hafta içinde infeksiyonun şekillendiğini, trachea'dan etken izolasyon oranında artma görüldüğünü, 8. haftadan sonra ise izolasyon oranında ani bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Roberts (158), intranasal sinus, trachea ve abdominal hava kesesi yolları ile infekte ettiği 4 haftalık piliçlerden, inokulasyonu takip eden 1-8 hafta boyunca, inokulasyon yolu ne olursa olsun, adı geçen organların tümünden etken izolasyonu yaptığını açıklamıştır. Timms ve Cullen (192), 6 ve 16 haftalık piliçleri burun içi ve infra-orbital sinus yolları ile infekte etmişler, hayvanlarda 2. haftadan itibaren serolojik yanıt saptamalarına ve 28. haftaya kadar sinuslarından etken izole etmenlerine rağmen, hayvanlarda 28. hafta sonunda herhangi bir solunum semptomu gözleyememişlerdir. Newnham (139) ise, burun içi yolla epruve ettiği 10 haftalık 6 horozdan 2'sinde 2. haftadan itibaren burun akıntısı ve 5'inde de 1/10 - 1/20 arasında HI titreleri saptamış, horozlardan 2'sinin 8 haftalık deneme süresi boyunca klinik belirti göstermediklerini fakat 1/1280 gibi oldukça yüksek HI titreleri verdiklerini ve 6 horozdan 3'ünden de etken izole edilebildiğini bildirmiştir. Chu (41), CRD'de inkubasyon süresinin 5-7 gün olduğunu ve hastalığın

aylarca sürebildiğini, serolojik açıdan da Roberts (161), intranazal sinus yolu ile infekte ettiği 6 haftalık broiler piliçlerde 1. haftada çabuk lam aglutinasyon ve 2. haftada da HI antikörlerinin saptanabileceğini, Kuniyasu ve ark. (120) ise, infekte bir sürü ile temas sonucunda hayvanların 2 ay içinde pozitif lam aglutinasyon reaksiyonları göstereceklerini açıklamışlardır. Embriyolar üzerindeki çalışmalar sonucunda ise Moulton ve Adler (133), 8 günlük embriyolu tavuk yumurtalarına sarı kesesi yolu ile, tavuk embriyosunda pasaj edilmiş PPLO verildiğinde, inokulasyondan sonraki 5. günde eklem lezyonları saptandığını, Roberts ve Olesiuk (163) ise buyyonda 34 kez pasaj edilmiş F suşunun embriyolar için çok virulent olduğunu, 10^{-3} - 10^{-5} sulandırma- larla yapılan inokulasyondan 4-8 gün sonra embriyoların öldüğünü, 10^{-6} - 10^{-8} sulandırmalarda ise embriyo ölümlerinin 6-8. günden sonra başladığını ve 21 gün boyunca ölümlerin sporadik olarak sürdüğünü bildirmişlerdir. Deneysel infeksiyon oluşturma çalışmaları sırasında Barber (25), 12 haftalıkken etken inokule edilen hindilerde, inokulasyondan 6 hafta sonra alınan kesitlerde lenfofoliküler nodüller ve sinüsitis saptandığını, sinüsitis gösteren tüm hayvanların 2 hafta içinde kanlarında aglutininlere rastlandığını, Domermuth (58), 1 günlük Beyaz Leghorn civcivlere M. gallisepticum S6 suşunun göbek bölgesinde deri altı yolla verilmesiyle, 2.5 hafta içinde hayvanların % 80'inde ve 10 hafta içinde de hayvanların % 70'inde göğüs etinde kabarcıklanma oluştuğunu ve Domermuth ve Gross (60), 1 günlük

civcivlerin göbek deliğinden içeri inokulasyon yapıldığında, 2 hafta içinde salpingitis şekillendiğini ve hayvanların kanlarında aglutininlerin varlığını bildirmişlerdir.

CRD infeksiyonu her yaştaki tavukta görülebilir (41, 102, 203, 225, 226), fakat infeksiyona bağlı ölümlerle birlikte kilo kaybına, yumurta verimindeki azalmaya ve kesim anındaki telefata bağlı ağır kayıplar en çok 5-16 haftalık hayvanlarda şekillenir (203, 204). İnfeksiyon, yumurtacı tavuklarda yumurtlama periyoduna girmeden hemen önce (203), broylerlerde ise 4-8. haftalarda görülür (226). Hastalığa bağlı klinik belirtiler en çok 3-8 haftalık genç hayvanlarda şekillenir ve kış aylarında özellikle rutubetli ortamlarda bu belirtiler oldukça şiddetlenir (176, 191, 226, 231). Yetişkin hayvanlarda tipik olarak hırıltılı soluma, burun akıntısı, aksırık-tıksırık, soluma güçlüğü, sinüsitis ve konjunktivis (41, 101, 165, 176, 191, 204, 226) ile birlikte bazı hayvanlarda da başın sallanması (torticollis) ile karakterize sinirsel belirtiler (73, 77, 147, 221, 234), gözlenir. Görülen bu semptomların yanısıra hayvanların yem tüketimleri, vücut ağırlıkları ve yumurtacı tavukların da yumurta verimlerinde azalma olur (160, 191, 204, 226). Hindilerin infra-orbital sinuslarında görülen sinüsitis'e bağlı olarak aşırı derecede şişen sinuslar görmeyi kısmen veya tamamen engelleyebilir. Görebildikleri sürece hayvanların iştahları yerindedir. Fakat kilo tutmaları ve yumurta verimleri azalır (147). Hastalık, uzun süreli bir seyir gösterdiği tavuklarda,

oluşturduğu genel düşkünlük ve iştah kaybı sonucunda; hayvanlarda büyüme, vücut ağırlığı ve yumurta verimi üzerine olumsuz etkilerde bulunur. Hayvanların vücut ağırlıkları % 5-19, yumurtacı tavuklarda ise yumurta verimi % 10-40 oranında azalır (41, 147, 175, 176, 204). Enfeksiyon ayrıca damızlık tavuklarda kuluçkalanabilme oranında da % 10-15 azalmaya neden olur (175, 202). CRD enfeksiyonu çoğunlukla E. coli, P. multocida, H. paragallinarum gibi bakteriyel, ND, IB, Inf. A, Reovirus, Adenovirus ve ILT virusları gibi viral ve A. fumigatus gibi fungal etkenlerle komplike hale gelebilir (41, 101, 175). Genellikle % 10-50 arasında morbidite gösteren komplike olmamış CRD olgularında mortalite % 5-10 arasında değişirken (176), enfeksiyonun başta sıklıkla E. coli, IB ve ND virusları gibi etkenlerle komplike olması sonucunda mortalite % 30'a kadar çıkabilir (41, 160, 175, 187, 190, 202, 225). Komplike olmamış CRD enfeksiyonlarında morbidite yüksek, mortalite ise düşüktür (176, 190, 202, 212). Hayvanlarda semptomlar belirgin değildir veya çok hafif seyreder ve hayvanların vücut ağırlıklarında ve yumurta verimlerinde hafif bir azalma şekillenir (41, 190). Komplike enfeksiyonlarda mortalite ile birlikte klinik belirtiler ve patolojik lezyonlarda da bir artma görülür (9, 69, 83, 107, 144, 189). Jungherr (107), yaptığı deneysel bir çalışmada trachea içi yolla M. gallisepticum inokule edilen 5 haftalık piliçlere, 11 hafta sonra aynı yolla IB virusu (Massachusetts suşu) verildiğinde başta trachea olmak üzere tüm üst solunum sisteminde şiddetli bir enfeksiyon oluştuğunu açıklamıştır.

Yaptığı benzer bir çalışmada ise Timms (189) tek başına *M. gallisepticum* inokule edilen 6 haftalık piliçlerin hiç birisinde solunum bozukluğu veya burun akıntısı oluşmadığını ancak etkenin IB ile birlikte verilmesi sonucunda hayvanlarda inokulasyon sonrası 11. güne kadar süren hırıltılı soluma ve 22. güne kadar süren solunum güçlüğü saptandığını ayrıca, yumurta veriminde azalma ile birlikte arasına yumuşak kabuklu ve düzensiz şekilli yumurtaların yumurtlandığını bildirmiştir. Klinik olarak sağlıklı fakat *M. gallisepticum* ile latent infekte hayvanlarda da et ve yumurta verimlerinde % 5-7 oranında bir azalma meydana gelir (175). Sadece hava keseleri infekte olduğunda ise hayvanlarda tipik klinik semptomlar görülmez (190).

Ölen hayvanların otopsilerinde nazal türbinatlarda, trachea, bronşlar ve hava keselerinde kataral bir eksudat gözlenir (106, 190, 191, 226). Nadiren de olsa tavuklarda şekillenen sinüsitis olgularında infra-orbital sinuslardaki şişkinlik ile birlikte sinus membranlarında kalınlaşma ve peteşiyel kanamalar bulunur (147, 165, 226). Hava keseleri kalınlaşarak şeffaflıklarını kaybeder ve kazeöz bir eksudat içerirler (101, 165, 176, 191, 204, 213, 221). Hasta hayvanların akciğerlerinde ise pnömoni şekillenebilir (106). Tavuklardaki miks infeksiyonlara bağlı olarak şekillenen şiddetli hava kesesi yangısı ile birlikte perikarditis ve perihepatitis de görülür (69, 83, 132, 191, 226). Mikroskopik olarak ise, monoküleer hücre infiltrasyonuna ve müköz bezlerin

hiperplazisine bağlı olarak infekte dokuların müköz membranlarında belirgin bir kalınlaşma şekillenir. Hastalığın ilk dönemlerinde sinus mukozasında kataral bir yangı ve sonraları ise sinus submukozasında fibrozis ve lenfofoliküler hücre infiltrasyonu oluşur. Submukozada bunların dışında fokal lenfoid hiperplazi alanları da görülebilir. Akciğerlerde pnömonik alanların ve lenfofoliküler değişikliklerin yanısıra granüloamatöz lezyonlar, hava keselerinde de perivasküler lenfositik hücre infiltrasyonu meydana gelir (165, 191, 226).

CRD hastalığının klinik ve otopsi bulgularına göre teşhis etmek oldukça zordur. Hastalık koriza, kronik kolera, kolibasillozis, Newcastle hastalığı, infeksiyöz Bronşitis ve infeksiyöz Laringotracheitis gibi çeşitli bakteriyel ve viral hastalıklarla karışabilir. Kesin teşhis amacıyla dokulardan ve eksudatlardan etken izolasyon ve identifikasyonu için laboratuvar muayenelerine gereksinim vardır (22, 41, 43, 147, 188, 204).

Hasta veya yeni ölmüş şüpheli tavuklardan etken izolasyonu için trachea eksudatları, türbinatlar, akciğerler, torakal ve abdominal hava keseleri ile birlikte infra-orbital sinus eksudatları ve eklem sıvıları kullanılır (191, 226). Lecce ve Sperling (121), 1954 yılında klinik olarak CRD'li tavukların trachea, akciğer ve hava keselerinden etken izolasyonuna çalışmışlar ve etkenin en çok trachea'da lokalize olduğunu ortaya koyarak CRD'nin teşhisi için etken

izolasyonun gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Jordan ve ark. (104), infekte tavukların özofaguslarından da etken izolasyonu yapılabileceğini ortaya koymuşlardır. Roberts (158), ise 1964 yılında deneysel olarak intra-nazal sinus, trachea ve abdominal hava keseleri yolları ile infekte ettiği 4 haftalık piliçlerin sinusları, trachea'ları ve abdominal hava keselerinden etken izolasyonuna çalışmış, inokulasyon yolu ne olursa olsun, inokulasyondan sonraki 9. haftaya kadar tavukların sinus, trachea ve abdominal hava keselerinden etkenin yeniden izole edilebildiğini bildirmiştir. Dokulardan hazırlanan inokulumlar ve doku eksudatları uygun selektif katı ve sıvı besi yerlerine ekilerek 37 °C de, rutubetli bir ortamda en az 5-7 gün inkube edilirler (70, 188, 191). Kültürlerde ilk ekim sonucunda belirgin bir üreme olmayabilir fakat 3-5 gün aralıklarla sıvı besi yerlerinde yapılan 2 veya 3 seri pasaj izolasyon şansını arttırır. Besi yerlerine tri-fenil tetrazolyum veya fenol red ile birlikte uygun miktarda dekstroz ilave edilmesi üremenin anlaşılması için iyi bir indikatör sistem oluşturur. *M. gallisepticum*, tri-fenil tetrazolyum'u redükte ederek kırmızı bir renk oluştururken, fenol red varlığında ise dekstroz fermentasyonu sonucu ortam pH'sının aside kaymasıyla sarı bir renk oluşturur. (226). Agar üzerinde üreyen koloniler indirekt ışık altında 0.2-0.3 mm çapında ince, yuvarlak düzgün kenarlı ve ortaları düğmeli olarak görürler (9, 15, 40, 226). Timms (188), agara ve buyyona ekilen materyallerin 37 °C de 4 gün inkube edilmelerinden sonra agar üzerinde veya buyyonda tipik üreme

elde edilmediği taktirde ikinci bir buyyon pasajının ve agar ekiminin yapılarak kültürlerin 37 °C de, rutubetli bir ortamda 6 gün inkube edilmesi gerektiğini ve 6 kez tekrarlanan bu pasajlar sonucunda üreme elde edilemezse, şüpheli materyalin negatif kabul edileceğini bildirmiştir. Üreyen buyyon kültürlerinden hazırlanan preparatlar Giemsa (188) yöntemi ile boyanarak incelendiklerinde tek tek veya gruplar halinde kokoid veya kokobasil formlu mikroorganizmalar görülür (191, 226, 229). Agarda üreyen koloniler ise Adler ve ark. (15) nın bildirdikleri şekilde Diene's yöntemiyle boyadıklarında tipik *M. gallisepticum* kolonileri orta kısımları daha koyu, periferleri ise daha açık mavi renkte boyanmış olarak görülürler. *M. gallisepticum*'un identifikasyonunda glukoz, maltoz, sukroz, trehaloz, laktoz ve mannitol fermantasyonu gibi karbonhidrat testleri ile birlikte (14, 80, 113, 177, 222, 226), fosfataz, arjinin ve jelatin hidroliz, ayrıca da koagüle serum ve kazein sindirim testleri yapılır (152). Etkenin identifikasyonunda 2,3,5-tetrazolium klorid ve tetrazolyum mavisi redüksiyonu testleri de kullanılabilir (222, 229). Agar üzerinde üreyen kolonilerin sferoblast ve protoblastlardan ayırd edilmesi için kültürlerin antibiyotiksiz besi yerlerine pasaj edilmeleri gerekir (188, 191). Üreyen kolonilerin serolojik identifikasyonları için üreme inhibisyon (109, 170, 194, 197, 218), koloni inhibisyon (68), agar-jel presipitasyon (24, 140, 194), adhezyon-hemadzorbsiyon (82, 169), immunoperoksidaz ve floresan antikor (99, 176) gibi tekniklerden de

yararlanılır.

M. gallisepticum'un izolasyonu amacı ile 7 günlük embriyolu tavuk yumurtalarına (ETY) sarı kesesi (8, 37, 42, 153, 217, 221, 226) allantoik kese (9, 10) ve koriollantoik membran (10) yollarıyla inokulasyon teknikleri de uygulanabilir (226). Adler ve Yamamoto (8), 7 günlük ETY'nda etken üremesinin 24 saatte pike ulaştığını bildirmişlerdir. Chute ve Cole (42), tavuk embriolarında meydana gelen değişiklikleri incelemişler ve inokulasyondan sonra 2-7 gün içinde ölen embrioların karaciğer, böbrek ve beyinlerinde hemorajilerle birlikte purulent bir yangı oluştuğunu ve korioallantoik membranlarında da beyazımsı odakların şekillendiğini ve ayrıca embrioların ödematöz olduklarını bildirmişlerdir. Moulton ve Adler (133), inokulasyon yapılan embriolarda çeşitli yangısel değişikliklerle birlikte arthritis oluştuğunu, Roberts ve Olesiuk (163) ise, yumurta sarısı yolu ile M.gallisepticum inokule ettikleri 100 adet 7 günlük embriyodan 50 adedinin yumurtadan çıktığını, 24 adedinin yumurta kabuğunu kırdığını fakat dışarı çıkmadığını ve 26 embriyonun da inokulasyonun 20-21. günlerinde öldüğünü açıklamışlardır. Yumurta sarısı yolu ile 5-8 gün içinde embriyo ölümleri oluşabileceği fakat, tipik lezyonların ve embriyo ölümlerinin oluşabilmesi için infekte yumurta sarılarından 2-3 seri pasaj yapılması gerekebileceği de bildirilmiştir (226). Şüpheli materyallerden etken izolasyonu amacıyla tavuk embriyo doku kültürlerinden de yararlanılabilir (10, 22).

Timms (188) ve Mallinson ve Rosenstein (128), ilk izolasyon sırasında morfolojik ve koloni görünümü bakımından *M. gallisepticum*'a benzerlik gösteren bakteriyel L-formları ile birlikte sferblast ve protoplastların elimine edilmesi gerektiğini; başarılı bir izolasyon için hayvanlardan ekim materyallerinin infeksiyonun akut döneminde iken alınmaları gerektiğini; PPLO agarda uzun süreli inkubasyon sonunda koloni görünümü bakımından *M. gallisepticum*'a benzeyen pseudo-kolonilerin oluştuğunu; kolonilerde oluşan düğme formasyonunun identifikasyonda ve türlerin ayırımında her zaman için güvenilir bir kriter olmadığını; CRD olgularında, solunum sisteminde hızlı üreyen apatojenik *M. gallinarum* suşlarının daha yavaş üreyen patojenik *M. gallisepticum* suşlarından daha fazla bulunduğunu ve bu nedenle kronik infekte hayvanlardan apatojenik *M. gallinarum* suşlarının daha sık izole edildiklerini bildirerek tavuklardan *M. gallisepticum* izolasyon ve identifikasyonunda karşılaşılabilecek bazı zorlukları açıklamışlardır. izolasyon ve identifikasyondaki bu zorluklarla birlikte uygulanmakta olan kültürel tekniklerin yavaş ve zahmetli olması, infekte olan tavuklarda meydana gelen antikörlerin varlığını ve titrelerini ortaya koyan serolojik testlerin, infeksiyonun teşhisinde kullanımını önemli hale getirmiştir.

CRD'ye karşı tavuk ve hindilerde oluşan antikörler serum lam aglutinasyon (SPA) (14, 80, 94, 160, 162, 168, 186) hemaglutinasyon-inhibasyon (HI) (47, 80, 120, 130, 139, 166,

206) agar-jel presipitasyon (AGP) (24, 80, 103, 140, 167, 168) ve ELISA (21, 146, 150, 151, 181, 184) gibi serolojik testlerle saptanabilir.

Adler (2) 1954 yılında, CRD'li tavuk ve infeksiyöz Sinüsitis'li hindilerin serumlarında oluşan spesifik antikörlerin saptanması amacıyla lam aglutinasyon testinin kullanılabileceğini bildirmiştir. Araştırmacı yaptığı başka bir çalışmada (3), hazırladığı antijen ile hindi serumlarında oluşan aglutininlerin başarı ile saptanabildiğini, doğal olarak infekte olmuş 18 hindi den 8'inde, infeksiyondan 11 ay sonra bile aglutininlerin belirlenebildiğini bulmuştur. SPA testi doğal veya deneysel infeksiyonlardan 1 hafta sonra serumda görülmeye başlanan, yaklaşık 20 hafta kadar diagnostik düzeyde kalan ve genellikle IgM yapısında olan antikörleri tespit eder (161, 164, 192). Kanla (16, 18, 120) veya kan serumuyla (33, 103, 192) yapılan SPA testi 0.02 ml serum ile eşit miktarda boyalı antijenin karıştırılması ve 2 dakika içinde sonuçların okunması şeklinde standardize edilmiştir (26, 50, 87, 95, 166). Testte 1/10.000 oranında kristal viyole veya Rose Bengal ile boyanmış (3, 48, 50, 163) ve % 0.25 oranında fenol ilave edilmiş antijenler (8, 87, 164) kullanılır. Testin değerlendirilmesinde ise oluşan aglutinasyon çeşitli araştırmacılar tarafından, reaksiyonun şiddetine göre 1+, 2+, 3+ ve 4+ şeklinde derecelendirilmiştir (120, 134, 168, 227). Bazı araştırmacılar, CRD infeksiyonlarının serolojik teşhisinde ve eradikasyon programlarında bir

sürü tarama testi olarak kullanılan SPA testinden, kanatlı Mycoplasma'larının serogruplandırılması ve aralarındaki antijenik ilişkinin belirlenmesinde yararlanmışlardır (55, 80, 113, 177, 229).

CRD infeksiyonlarının teşhisinde hızlı, basit ve duyarlı bir test olmasına rağmen araştırmacılar çeşitli nedenlere bağlı olarak SPA testinin non-spesifik reaksiyonlar verdiğini bildirmişlerdir (48, 50, 164, 172, 185). Kontamine serumlar (219), dondurulup çözdüğülen serumlar (34, 185), M. synoviae ile infekte hayvan serumları (34, 144, 164, 172) ile birlikte Staph. aureus veya Str. faecalis ile infekte hayvan serumları (186) ve Erysipelas bakterini verilmiş tavuk serumları (32, 164, 207) M. gallisepticum SPA antijeni ile non-spesifik reaksiyonlar verirler. Tavuklara kombine ND + IB + ILT inaktif viral aşularının verilmesi sonucu oluşan anti-globulinler de aşılama sonrası 8. günde başlayan ve 36. güne kadar devam eden non-spesifik reaksiyonlara yol açarlar (32, 50, 162, 186, 227). Windsor ve Thornton (214), M. gallisepticum ile tavuk anti-globulinleri arasındaki bu non-spesifik reaksiyonların, antijen üretimi sırasında besi yerlerinden kaynaklanan IgM, IgG, alfa ve beta globulinler gibi serum globulinlerinin mikroorganizmalar üzerine sıkıca tutunmasından kaynaklandığını bildirerek, globulinsiz bir M. gallisepticum antijeninin non-spesifik reaksiyon oluşturmayacağını ileri sürmüşlerdir. Thornton (186) tavukların serumlarında oluşan römatooid artrit faktörü benzeri

globulinlerin non-spesifik reaksiyon oluşturacaklarını bildirmiştir. Oluşan bu non-spesifik SPA reaksiyonlarının HI ve AGP testleriyle veya serumların 1/5 sulandırılmaları ile giderilebileceği çeşitli araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (32, 50, 186, 192, 226).

Kanatlı Mycoplasma'larının tavuk eritrositlerini aglutine ettikleri ve bu reaksiyonun infekte tavuk serumları tarafından inhibe edilebildiği ilk defa Van Herick ve Eaton (202) tarafından 1945 yılında bildirilmiştir. Gianforte ve ark. (80) inceledikleri 7 PPLO suşunun tümünün 1/32 antijen sulandırmasında tavuk eritrositlerini aglutine ettiklerini açıklamışlardır. Hall (87), % 10 at serumu ve maltoz ile zenginleştirilmiş Tryptose fosfat buyyonda üreterek hazırladığı antijenin 1/640 HA titresi veridiğini, Kuniyasu ve Ando (118) ise, değişik antijenler arasında HA titreleri bakımından farklar bulunduğunu, antijenlerin 1/40 ile 1/320 arasında değişen HA titreleri gösterdiklerini bildirilmişlerdir. Fahey ve Crawley (74), M. gallisepticum buyyon kùltürlerinin HA aktivitelerini incemişler, sıvı kùltürlerde inkubasyonun 3. gününden itibaren HA aktivitesinin saptanmaya başladığını, bu HA aktivitesinin 7-10. günlerde maksimum titreye ulaştığını ve titrenin nadiren 1/16'nın üzerine çıktığını belirtmişlerdir. Cullen ve Snell (49), santrifügasyonla çöktürdükleri M. gallisepticum S6 suşunun üst sıvısında çok düşük titrede HA aktivitesi bulunduğunu saptamışlar ve bu şekilde hazırlanan hücretsiz antijenin HI

testinde kullanılmasının pratik olmayacağı sonucuna varmışlardır. Hemaglutinasyon (HA) testi, teşhis amacıyla kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Bu test, CRD'den şüpheli materyallerde (infekte sarı keseleri, sinus içerikleri, doku eksudatları, vs.) ve kültürlerde *M. gallisepticum* bulunup bulunmadığının araştırılmasında ve ayrıca serumlarındaki hemaglutininlerin varlığını ortaya koymak amacı ile yapılan HI testinde antijenin titresini belirlemek amacı ile yapılır (74, 118, 120, 130, 188, 226).

Hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) testi, doğal veya deneysel infeksiyondan yaklaşık 2 hafta sonra ortaya çıkan ve uzun süre diagnostik seviyenin üzerinde kalan ve genellikle IgG yapısında olan antikorları saptar (47, 74, 119, 159, 161, 168). CRD hastalığının inkubasyon periyodunda infekte hayvanların serum HI titreleri düşüktür fakat infeksiyondan ortalama 3 hafta sonra 1/320 veya daha yüksek titrelere ulaşır ve 19-34 hafta veya daha uzun bir süre diagnostik düzeyin üzerinde kalır (139). HI testinde titresini önceden belirlenen antijen genellikle 4 HA ünitesinde sabit tutularak kullanılır (74, 120, 126, 139, 166, 205). Bunun yanısıra antijenin 2 HA (80, 95) veya 8 HA (185) ünitesinde kullanılabileceği de bildirilmiştir. Fahey ve Crawley (74) HI testinin rutin olarak uygulanabilmesinden önce prosedürün standardize edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar tavuk eritrositleri gibi hindi eritrositlerinin de aynı derecede tüm suşlar tarafından aglutine edilebilece-

ğini açıklamışlardır. En iyi sonuçların %1 eritrosit solusyonu ile alındığını bildiren araştırmacılar %1'den özellikle % 0.5'den düşük eritrosit konsantrasyonlarının yanlış titreler göstereceğini ve % 1'den fazla eritrosit konsantrasyonunda ise hemaglutinasyonun tam olarak görülmeyeceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, antikor-antijen reaksiyonunun oluşabilmesi için 15 dakikalık sürenin yeterli olacağını, bundan daha kısa süreli inkubasyonlarda düşük titreler çıkacağını, eritrosit ilavesinden sonra ise HI reaksiyonun oda ısısında 1 saat içinde okunabileceğini ileri sürmüşlerdir. Test serumunun 1/5'ten başlayarak iki katlı olarak sulandırılması, üzerine 4 HA ünitesinde antijen konularak oda ısısında 15 dakika bekletilmesive son olarak da üzerine %1'lik YTE konularak uygulanması yaygın olarak benimsenen HI testi (47, 74, 139, 163, 191, 226), laboratuvarlarda doğal ve deneysel infekte hayvan serumlarındaki hemaglutininlerin saptanmasında (50, 71, 95, 126, 161, 168) ve ayrıca kanatlı Mycoplasma'larının serogruplandırmasında ve antijenik ilişkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılır (80, 113, 177, 229). Oda ısısında 1 saatlik inkubasyon sonunda, sonuçları değerlendirilen HI testinde 1/80 veya daha yüksek serum titreleri pozitif ; 1/40 serum titreleri şüpheli ve 1/20 veya daha düşük titreler ise negatif olarak değerlendirilirler (89, 166).

Fahey ve Crawley (76), yemleriyle 200 g/ton miktarında aureomisin ve terramisin verilen hayvanlarda deneme

süresi boyunca HI antikor titrelerinde bir gerileme veya tam bir baskılanma oluştuğunu, antibiyotik verilen hayvanlarda 10. hafta sonunda ortalama HI titrelerinin 1/80'den 1/20-1/10'a düştüğünü bildirmişlerdir. Crawley ve Fahey (47), tavuklarda CRD'ye karşı oluşan HI yanıtının infeksiyondan sonraki 14. gün içinde veya hastalığın klinik belirtilerinin görülmesinden 6 gün sonra başladığını bildirerek sağlıklı damızlık sürülerinin saptanmasında HI testinin önemli bir yer tuttuğunu ortaya koymuşlardır. Tavukların *M. gallisepticum* infeksiyonlarında kullanılan HI testi için en uygun koşulları araştıran Kuniyasu ve Ando (118) inkubasyonun 5.günündeki *M.gallisepticum* kültürlerinde HA aktivitesinin oldukça belirgin olduğunu, antijene formol katılmasının veya antijenin ısıtılmasının HA aktivitesini yok ettiğini bildirmişlerdir. Fenol, thimerosal veya alkol ilavesi antijen üzerinde çok az etkili veya hiç etkisiz bulunmuştur. Araştırmacılar, fenol ve thimerosal ilave edilmiş antijenlerin 5 °C de HA aktivitelerini koruduklarını, gliserinli antijenin -20 °C de 6 aydan fazla süre ile aktivitesini muhafaza ettiğini açıklamışlardır. HI testinin SPA'ya oranla daha suşa spesifik olduğunu ve IgG'leri saptadığını bildirerek bir suş ile infekte tavukların her zaman için heterolog antijenlerle HI reaksiyonu veremeyeceğini açıklamıştır. Aratırıcı, yaptığı çalışmada *M.gallisepticum* S6 veya WS7 suşlarıyla infekte olan tavuklarda IgG ve IgM antikorlarının homolog antijenlerle test edildiğinde yüksek titrelerde bulunduğunu ve IgM'nin kalıcılık göstermesinin latent bir *M. gallisepticum*

infeksiyonu sonucu oluşabileceğini bildirmiştir. Vardaman ve Yoder (205, 206) ve Villegas ve ark. (215), *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* için hazırladıkları antijenlerin, HI testi ile bu infeksiyonların ayırımında iyi bir spesifite gösterdiklerini, SPA testi ile saptanan kros-reaksiyonların bu test ile giderildiğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar (205), inceledikleri 76 adet *M. synoviae* ile infekte hayvan serumundan 38 (%50) adedinin *M. gallisepticum* SPA antijeni ile reaksiyon verdiğini, tüm serumların ise *M. gallisepticum* HI testinde negatif bulunduğunu açıklamışlardır. Timms (190), *M. gallisepticum* ve IB miks infeksiyonlarında, *M. gallisepticum*'a karşı serolojik yanıtta bir artma olduğunu, IB ile eprüve edilen piliçlere 19. hafta da *M. gallisepticum* S6 suşunun sinus içi yolla inokule edilmesinden 2 hafta sonra (21. hafta), hayvanların SPA (1/8) ve HI (1/160) titrelerinde bir artma olduğunu, sadece *M. gallisepticum* ile infekte tavuklarda ise SPA (1/1) ve HI (1/5) titrelerinin düşük seviyede kaldığını bildirmiştir. Timms ve Cullen (192), 6 ve 16 haftalıkken *M. gallisepticum* S6, F veya WS7 suşlarıyla eprüve edilen piliçlerin antikor yanıtlarını incelemişler; 28 haftalık deneme süresince tavuklardaki infeksiyonların homolog ve heterolog antijenlerle belirlenebildiğini ancak, homolog antijenlerle daha yüksek titreler elde edildiğini göstermişlerdir. Sahu ve Olson (166) 36 küme ait 43.040 adet broyler serumunu SPA ve HI testleriyle *M. gallisepticum* antikorları yönünden incelemişler ve SPA negatif serum örneklerinin HI antikorları yönünden de test edilmelerinin

önemini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, inceledikleri toplam 43.040 broyler serumundan 53 (%0.12) adedinin SPA testi ve bu 53 serumdan da 5 (%9.43) adedini HI testinde pozitif olarak (HI titresini 1/80) saptamışlardır. Öte yandan, rastgele seçtikleri ve SPA testinde negatif sonuç veren 1.233 serum örneğinden 80 (% 6.49) adedini HI testinde pozitif olarak saptamışlardır. Timms ve Cullen (193), yaptıkları çalışma sonucunda, hem deneysel infekte piliç serumlarında hem de saha serumlarında görülen zayıf ve geçici *M. gallisepticum* SPA pozitif test sonuçlarının HI testinde negatif bulduklarını bildirmişlerdir. Villegas ve ark. (208), CRD infeksiyonlarının serolojik tanısında kullanılan SPA testinin bir tarama testi olduğunu, HI testinin ise daha ziyade bir doğrulama testi olarak kullanıldığını belirtmiş ve oldukça spesifik olan ve kısa sürede sonuç veren HI testinin sadece IgG sınıfı antikoları saptadığından, SPA testi pozitif olduktan ancak birkaç hafta sonra diagnostik düzeyde titreler vereceğini bildirmişlerdir. Timms (189), uygun koşullarda saklanmayan serumların SPA ve HI titrelerinde düşme olacağını, kan pıhtısıyla birlikte bekletildikten sonra pıhtıdan ayrılarak oda ısısında 4-8 gün bekletilen serumların HI titrelerinin % 44'e varan titre kayıplarına neden olacağını bildirmiştir.

CRD infeksiyonunun teşhisinde kullanılan serolojik testlerden bir diğeri de Agar-Jel Presipitasyon (AGP) testidir (103, 167, 168). Bu test, şüpheli kan serumlarındaki

M. gallisepticum antikorlarını saptamanın yanı sıra (34), izole edilen Mycoplasma kültürlerinin identifikasyonu (140) ve Mycoplasma türlerinin sınıflandırılmasında da (24) kullanılabilir. Nonomura ve Yoder (140), kanatlı Mycoplasma'larının identifikasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada besi yerlerinde ürettikleri M. gallisepticum hücrelerini kuru buz-akol banyosunda 10 kez dondurup çözündürerek, 20.000 devir/sn de 1, 2, 4 veya 10 dakika sonike ederek veya sodyum dezoksikolat (SD) ve sodyum dodesilfölfat (SDS) gibi deterjanlarla muamele ederek parçalamışlar ve bu şekilde hazırladıkları antijenleri AGP testinde kullanmışlardır. İzolatların, tavşan veya tavuklarda hazırlanan spesifik antiserumlarla identifiye edilmelerinde test oldukça spesifik bulunmasına rağmen araştırmacılar, doğal infekte tavuk ve hindi sürülerine ait serumlardan çok azının bu test ile pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Aycardi ve ark. (24), besi yerlerinde ürettikleri hücreleri katı karbondioksit ve etanolde 10 kez dondurup çözdürmüşler ve bu şekilde hazırladıkları parçalanmış antijeni kanatlı Mycoplasma'larının sınıflandırılması amacıyla AGP testinde kullanmışlardır. Test ile saptanan benzer antijenik komponentlere göre araştırmacılar 19 adet kanatlı Mycoplasma serotipini 1'den 9'a kadar numaralandırdıkları 9 antijenik grup içinde toplamışlardır. Sahu ve Olson (167), damızlık broyler sürülere ait kan serumlarını SPA, HI ve AGP testleri ile M. gallisepticum ve M. synoviae antikorları yönünden incelerken M. gallisepticum SPA testinde meydana gelen non-spesifik

reaksiyonların HI ve AGP testlerinde oluşmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, hazırladıkları *M. gallisepticum* AGP antijeninin *M. synoviae* antijenine oranla daha zayıf presipitasyon bantları oluşturduklarını açıklamışlardır. Damızlık broyler ve ticari yumurtacı sürülerini *M. gallisepticum* infeksiyonları yönünden serolojik olarak inceledikleri başka bir çalışmada ise araştırmacılar (168), SPA, HI ve AGP test sonuçları arasında iyi bir korelasyon bulmuşlar ve etken izolasyonunun yapılamadığı durumlarda bu 3 serolojik testin, infeksiyonun teşhisindeki önemini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar % 2 Triton X-100, % 1 SDS veya %0.5 M üre muamelesi ile parçalayarak eriyebilir hale getirdikleri antijenleri AGP testinde kullanmışlar, 1/5 veya daha yüksek SPA titresini gösteren serumların HI ve AGP testlerinde, daha düşük SPA titresindeki serumlara oranla daha fazla yüzde ile pozitif reaksiyon verdiklerini ileri sürmüşlerdir. Yumurtacı tavuk serumlarında, 1/5 SPA titreli serum örneklerinden %14-17'si pozitif HI titerini gösterirken, AGP testinde %66-70 oranında pozitif sonuç, 1/10 SPA titreli serum örneklerinden ise %22-40 HI pozitif ve %83-100 AGP pozitif sonuç elde etmişlerdir. Benzer şekilde damızlık broyler serumlarından 1/10 SPA titreli serum örneklerinden % 26 oranında HI pozitif ve % 38 oranında da AGP pozitif sonuçlar almışlardır.

infeksiyonun teşhisi amacı ile kullanılan ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) son yıllarda geliştiril-

miş ve çeşitli araştırmacılar tarafından diğer tüm testlere oranla daha duyarlı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (21, 146, 150, 151, 181, 184, 220). Testte kullanılan antijen genellikle hücrelerin sonikasyonu (150, 184) ile veya sodyum dodesilsülfat gibi deterjanlarla parçalanması (21, 146, 181) sonucunda hazırlanmış ve mikrotiter plate'lere adsorbe edilmiştir. Testte konjugat olarak peroksidazla (21, 105, 151, 173, 174, 184) veya alkalen fosfatazla (146, 181) işaretlenmiş tavşan anti-tavuk IgG'leri (H+L) ve substrat olarak da proksidaz enzimi için 2-2'-azino-di-(3-etilbenzti-azolinsülfat) (ABTS), 5-aminosalisilik asit + H_2O_2 veya orto-fanilendiamin (21, 184), alkalen fosfataz enzimi için de para-nitrofenil fosfat (146, 181) kullanılmaktadır. Ansari ve ark. (21), tavuk serumlarında *M. gallipetcum* antikorlarının varlığını ortaya koymak amacı ile yaptığı ELISA'da hazırladıkları antijenin bir kısmını tüm hücre antijeni olarak diğer kısmını ise SDS ile parçalayarak kullanmışlar ve her iki antijenin de mikrotiter plate'lerin çukurlarına iyi yapıştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, ELISA'nın HI'dan daha duyarlı olduğunu fakat *M. synoviae* ile infekte hayvan serumları ile kros-reaksiyonlar verdiğini, ayrıca konjugatın plate yüzeyine non-spesifik olarak bağlanması sonucu yine non-spesifik reaksiyonlarının şekillenebileceğini ortaya koymuşlardır. Opitz ve ark. (146), deneysel olarak *M. gallisepticum* R suşu ile infekte ettikleri tavuklarda infeksiyondan sonra 8. günde SPA, 21. günde HI ve 28-35. günlerde de ELISA ile % 100 pozitiflik saptadıklarını, *M.*

gallisepticum F suşu ile infekte ettikleri ve ELISA pozitif olan tavukların %98'inin SPA ve %80'inin de HI pozitif sonuç verdiklerini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar HI testinin ELISA'dan daha spesifik olduğunu ileri sürmüşlerdir. Patten ve ark. (150), ELISA'yı HI testinden çok daha duyarlı bulmuşlar ve deneysel olarak infekte ettikleri hayvanlardan, infeksiyon sonrası 2. haftada 21 tavuktan 9 (%43) adedini ELISA, 5 (%24) adedini de HI ile pozitif, 4. haftada 24 tavuktan 16 (%67) adedini ELISA, 13 (%54) adedini HI ile pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar, konjugatın plate'e non-speksitif olarak bağlanmasının, antijen kaplanmış plate'in % 10 fetal buzağı serumu ile muamelesi sonucu önlenebileceğini ve bazı tavuk serumlarında görülen non-spesifik reaksiyonların da, serumun 1/5 sulandırılarak teste alınması ile giderileceğini açıklamışlardır. Piela ve ark. (151), ELISA ve HI testlerinde serum yerine alternatif olarak yumurta sarılarının kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlar, kloroformla ekstrakte edilen yumurta sarılarının M. gallisepticum antikorlarının saptanmasında HI testi için uygun olmadığını fakat ELISA'da iyi sonuç verdiklerini bildirmişlerdir. Talkington ve ark. (181), tavuklarda M. gallisepticum'a karşı oluşan humoral yanıtın ölçülmesinde SPA, HI ve ELISA testlerini karşılaştırmalı olarak denemişler ve deneysel olarak infekte ettikleri tavuklarda inokulasyondan sonraki 5. güne kadar SPA 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 ELISA'nın SPA'dan daha az duyarlı fakat HI'den çok daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. *M. synoviae* ile infekte tavuk serumları ile yaptıkları tek yönlü kros-reaksiyon denemeleri sonucunda ise aynı araştırmacılar infeksiyon sonrası 35. günde hayvanların tümünün *M. gallisepticum* SPA testi ile pozitif reaksiyon verdiklerini, HI testinde ile hiç pozitif titre saptanamadığını ELISA'da ise infeksiyon sonrası 5. günde %5.56, 14. günde de %11.76 oranında kros-reaksiyon oluştuğunu 35. günde ise ELISA ile hiç kros-reaksiyon saptamadığını açıklamışlardır. Bu sonuçlara göre araştırmacılar ELISA'nın SPA'dan daha spesifik, HI'den ise daha az spesifik olduğunu açıklamışlardır. *M. gallisepticum* infeksiyonlarının serolojik teşhisinde ayrıca tüp aglutinasyon, anti-globulin (5, 6, 11, 80), komplement fikzasyon (80), indirekt immunoperoksidaz ve mikro-immunofloresans (36) gibi teknikler de kullanılabilir.

M. gallisepticum streptomisin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, eritromisin, magnamisin, spiramisin, tiamulin ve tylosin gibi çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlıdır (3, 27, 61, 76, 90, 217, 232). Wong ve James

(217), *M. gallisepticum*'a karşı in ovo olarak inceledikleri 16 antibiyotik arasından magnamisin ve terramisini en etkili bulmuşlardır. Domermuth ve Johnson (61) in vitro koşullarda *M. gallisepticum*un inaktive edilmesinde magnamisin, terramisin, streptomisin ve furazolidon'u en etkili antibiyotikler olarak saptamışlardır. Fahey ve Crowley (76), ise yaptıkları deneysel çalışma sonunda hayvanlara 200 g/ton yem oranında verilen aureomisin ve terramisinin CRD'nin klinik seyri üzerinde etkili olmadığını bildirmişlerdir. Barnes ve ark. (27), deneysel olarak oluşturdukları CRD infeksiyonunun sağaltımında tylosin'in 3 g/4.5 litre içme suyu oranında hayvanların sularına katılmaları veya antibiyotiğin hayvanlara parenteral olarak 5 mg/454 g vücut ağırlığı oranında enjekte edilmesi ile iyi sonuçlar aldıklarını, Yoder ve ark. (232), ise tylosin'in 5-10 mg/sinus oranında hayvanlara sinus içi inokule edilmesinin yanı sıra kas içi olarak da 130 mg tylosin enjeksiyonunun hayvanlarda %88 oranında bir iyileşme oluşturduğunu bildirmişlerdir. Tylosin diğer bazı araştırmacılar (28, 148, 230, 232), tarafından da CRD'nin sağaltımında etkili bulunurken Domermuth (57), *M. gallisepticum*'un streptomisin ve tetrasikline karşı kolaylıkla direnç kazandığını göstermiştir. Sağaltım amacıyla uygulanan yöntemlerden bir tanesi de hayvanlara yemleriyle birlikte oksitetrasiklin veya klortetrasiklin yedirilmesidir (90, 226). Yemlerle verilen bu tip geniş spektrumlu antibiyotiklerin etkileri, rasyona %0.5 oranında tereftalik asit (TPA) ilave edilmesi ile ve bazen de rasyondaki kalsiyum oranının azaltılması ile

güçlendirilebilir (90, 91, 142, 143, 226). Olson ve ark. (142), infeksiyonun başlamasından 4 hafta sonra 400 g/ton yem oranında klortetrasiklin ile birlikte %0.5 TPA yedirilmesi ile tavuklarda iyileşme şekillendiğini, yaptıkları diğer bir çalışmada da (143), 2 haftalıkken deneysel infeksiyon oluşturdıkları piliçlere aynı oranlarda klortetrasiklin ve TPA verilmesi ile tavukların trahea'larından ikinci hafta sonunda hiç etken izolasyonunun yapılamadığını bildirmişlerdir. Heishmann ve ark. (91), 50-100 g/ton yem oranında klortetrasiklin yedirilen piliçlerde *M. gallisepticum*'a bağlı büyüme geriliğinin önlendiğini ve antibiyotiğin yanı sıra rasyona %0.5 oranında TPA ilave edilmesinin ve rasyondaki tuz oranının azaltılmasının (%0.85) piliçlerde Mycoplasma reaktörlerinin sayısını azalttığını bildirirken, rasyonda %1.4 oranında tuz ile beslenen piliçlerde bu denli bir etki oluşmadığını açıklamışlardır. Araştırmacılar, yaptıkları diğer bir çalışmada da (90), 1000-1500 g/ton oranında hayvanlara tek başına yedirilen klortetrasiklinin kilo alma üzerinde etkili olduğunu ancak, trachea'dan etkenin elimine edilmesinde etkili olmadığını ortaya koymuşlardır. Antibiyotik sağaltımı, özellikle, akut infeksiyonlarda ölümleri ve ağır kayıpları önlemesi bakımından etkili olabilir fakat hiç bir zaman için hastalığın tam olarak eradike edilmesini sağlayamaz. Bir kez infekte olan hayvanlar sağaltılsalar bile yaşamlarının sonuna kadar portör olarak kalırlar ve hastalığın vertikal ve horizontal olarak bulaşmasında aktif görev yapmaya devam ederler (165).

Genelde, kanatlı Mycoplasma'ları vertikal ve horizontal olarak bulaşmalarına rağmen fazlaca invaziv ve spesifik antikorlara karşı dirençli değildirler. Bu nedenle aynı bölgede bulunan bir popülasyondan diğerine infeksiyonun yayılmasının önlenmesi veya büyük ölçüde azaltılması mümkündür. Bu amaçla antibiyotik uygulamalarının yanı sıra iyi bir bakım ve beslenme, ve damızlık hayvanların serolojik olarak gözlem altında tutulmaları hedef alınmıştır (101, 160, 165). Timms (191), İngiltere'de yapılan çalışmaların sonuçlarına göre en iyi kontrol yönteminin, ilk olarak Grandparent damızlık sürülerden infeksiyonun eradike edilmesi ve sonradan belli aralıklara yapılan serolojik gözlemlerle Grandparent ve Parent sürülerin infeksiyondan arif tutulmalarının olacağını açıklamıştır. Araştırmacı hayvanlara dengeli ve kaliteli yemlerin ve temiz suyun verilmesi yanında, gerekli idarî tedbirlerin alınmasının da önemli olduğunu vurgulamıştır. Buna göre, damızlık işletmelerde değişik yaş gruplarından olan hayvanlar ayrı ayrı kümeslerde barındırılmalı, işletmeler birbirlerinden izole bir şekilde bulunmalı ayrıca hijyen ve dezenfeksiyon programları dikkatlice uygulanmalıdır. Ticarî işletmelerde ise beton zeminli kümesler tercih edilmeli, kuluçkalık yumurtlar mutlak surette çiftlikte fumige edilmeli, yumurtalar yıkanmamalı, yabancı kanatlılarla temas önlenmeli ve yere yumurtlanan yumurtalar kuluçka amacı ile kullanılmamalıdır. Roepke (165), ise Hollanda'da yaptığı çalışmalar sonunda genel hijyen ve sanitasyon kurallarının yanı sıra iyi bakım ve beslenme ile

birlikte, damızlık işletmelerde 7-11 günlük embriyolu yumurtaların hava kesesi boşluğuna 2 mg dozunda tylosin enjeksiyonunun hastalığın eradikasyonunda etkili olduğunu ve eradikasyon çalışmalarının damızlık sürülerden başlatılması gerektiğini bildirmiştir. Hastalıktan korunmanın ilk ve temel koşulu infeksiyondan arı sürülerin oluşturulmasıdır (35, 101, 114, 131, 160). Damızlık sürülerden başlatılmak üzere yumurtacı ve broyler sürülere de periyodik olarak serolojik testler uygulanmalıdır. Bunlardan WB, SPA, TA ve HI testleri sürülerde bulunan gizli infekte ve portör hayvanları belirlemek amacıyla sıklıkla uygulanır (35, 114, 160). Damızlık sürülerde bulunan reaktörlerin ayrılarak yumurtlarının kuluçka amacıyla kullanılmaması, ticari sürülerde ise reaktörlerin imha edilerek yerlerine sağlıklı hayvanların alınması infeksiyonun kontrolünde etkili bir yol olarak bildirilmektedir.

İnfeksiyonun kontrolü amacıyla damızlık işletmelerde yumurtaların antibiyotikli solusyonlara daldırılmaları çeşitli araştırmacılar tarafından denenmiştir (38, 88, 122, 145, 178). Chalquest ve Fabricant (38), kuluçkalık yumurtaları 37 °C ye kadar ısıttıktan sonra 5 °C de 100, 500 veya 1000 ppm dozunda oksitetrasiklin solusyonuna 30 dakika süreyle daldırılmışlar ve süre sonunda yumurta albumininde 0.405-7.50 µg, yumurta sarısında ise 0.15-0.50 µg oranında oksitetrasiklin saptamışlardır. Daldırma işlemi sonunda yumurtadan çıkan civcivlerden etken izolasyonuna çalışmışlar ve etken

izolasyonunda belirgin bir azalma olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, daldırma işleminin, yumurtaların kuluçkalanabilme yeteneklerine etki etmediğini de göstermişlerdir. Levine ve Fabricant (145) ve Olson ve ark. (178), aynı yöntemle 400-500 ppm eritromisin solüsyonuna daldırılan yumurtaların kuluçkalanma yeteneklerinde bir azalma olmadığını ve embriyolarda solunum kanalı lezyonlarının şekillenmediğini, etken izolasyonunun yapılamadığını, ayrıca yumurta ile bulaşmanın da büyük ölçüde önlendiğini bildirmişlerdir. Hall ve ark. (122) da aynı amaçla 400 ppm tylosin, veya spiramisin de kullanılabileceğini açıklamışlardır. Stuart ve Bruins (178) ise, kuluçkalanabilme yeteneğinde %3.1-46.2'lik bir azalmaya yol açmasına rağmen, yumurtaların 400-500 ppm eritromisin solüsyonuna daldırılmalarının, etkenin yumurta ile bulaşmasını ve hastalığın insidensini azaltacağını açıklamışlardır. Yoder (224), infekte kuluçkalık yumurtaların inkubasyon öncesi ısıtılmaları sonucu iç ısılarının 114 'F'ye ulaşması ile 12-14 saat içinde yumurtalarda bulunan M. gallisepticum'un inaktive olacağını bildirilmiştir.

Tavukların M. gallisepticum'a karşı aşılınmaları çeşitli araştırmacılar tarafından denemiştir (3, 7, 12, 59, 125, 210, 225). Adler (3), adjuvantlı veya adjuvantsız olarak verilen inaktive PPLO süspansiyonlarının hayvanlarda önemli bir aglutinin titresi oluşturmadığını ve hayvanların yapılan eprüvasyona karşı duyarlı kaldıklarını açıklamıştır. Adler ve

ark. (12) da, benzer bir şekilde sonikasyon veya formol muamelesi ile inkative edilen kültürlerle immünizasyon deneyleri yapmışlar fakat hayvanlarda korunma sağlayamamışlardır. Araştırmacılar, hastalıktan iyileşme sonucunda bir bağışıklık şekillendiğini fakat inkative aşuların hayvanlarda bağışıklık oluşturamadıklarını bildirmişlerdir. Domermuth (59), canlı, patojenik etken ile kas içi aşılanan 518 piliçten %36'sının homolog suş kullanılarak torakal ve abdominal hava keseleri yolu ile yapılan eprüvasyonlara karşı korunduklarını bildirmiştir. Adler ve Lamas DaSilva (97) inaktive kültür ile damar içi inokule edilen piliçlerin abdominal hava kesesi yolu ile yapılan eprüvasyona karşı korunduklarını, thimerasol ile inaktive edilen veya canlı kültürlerin burun içi yolla verilmesi ile hava kesesi eprüvasyonuna karşı korunma olduğunu açıklamışlardır. Lin ve Kleven (125) de, M. gallisepticum F veya R suşlarıyla göze damlatılarak yaptıkları aşılamalardan 4 hafta sonra hayvanlarda aerosol eprüvasyona karşı bir korunma saptamışlardır.

4. MATERYAL VE METOT

Serumlar

Test Serumları : Çalışmada, serum lam aglutinasyon, hemaglutinasyon-inhibisyon, agar-jel presipitasyon testlerinde ve ELISA'da kullanılan toplam 900 adet serum örneği, kasaplık, yumurtacı ve damızlık yönünden yetiştiricilik yapılan özel işletmelerden ve Ankara Sincan Tavuk Mezbaha'sından temin edilmiştir (Tablo 1). Hayvanlardan alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra çizilerek 37 °C lik etüvde serumları çıkarılmıştır. Elde edilen bu serumlar serolojik testlerde kullanılıncaya kadar buz dolabında muhafaza edilmişlerdir.

Pozitif ve negatif kontrol serumları : İki adet 16 haftalık sağlıklı Beyaz Leghorn tavuğa haftada 2 kez olmak üzere 3 hafta süreyle M. gallisepticum S6 suşunun 5 günlük buyyon kültüründen göğüs kasına 0.5 ml verilmiştir. Son enjeksiyondan 1 hafta sonra hayvanların kanları alınarak serumları çıkarılmış ve çalışmada pozitif kontrol serum olarak kullanılmıştır. Ayrıca, Hannover Veteriner Yüksek Okulu'ndan (Almanya) temin edilen 1/640 HI titreli standart M. gallisepticum serumundan da serolojik testlerde yararlanılmıştır. Çalışmada, negatif kontrol serumları olarak ise Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Entitüsü'nden sağlanan SPF tavuk serumları kullanılmıştır.

Tablo-1. Kan serumlarının alındıkları yerler ve sayıları

Serumun orijini	Sağlandığı kaynak	Serum Sayısı	TOPLAM
Broyler	Bakteriyoloji Bilim Dalı	68	308
	Sincan Tavuk Mezbahası	228	
	Ticari İşletme I *	-	
	Ticari İşletme II **	-	
	Ticari İşletme III***	5	
	Ticari İşletme IV ****	7	
Yumurtacı	Bakteriyoloji Bilim Dalı	212	283
	Sincan Tavuk Mezbahası	-	
	Ticari İşletme I	31	
	Ticari İşletme II	-	
	Ticari İşletme III	26	
	Ticari İşletme IV	14	
Damızlık	Bakteriyoloji Bilim Dalı	10	309
	Sincan Tavuk Mezbahası	-	
	Ticari İşletme I	211	
	Ticari İşletme II	80	
	Ticari İşletme III	-	
	Ticari İşletme IV	8	
TOPLAM			900

- * : Yumurtacı ve damızlık yönünden yetiştiricilik yapılan işletme
** : Yumurtacı ve damızlık yönünden yetiştiricilik yapılan işletme
*** : Broyler ve yumurtacı yönünden yetiştiricilik yapılan işletme
**** : Broyler, yumurtacı ve damızlık yönünden yetiştiricilik yapılan işletme

Mycoplasma gallisepticum Suşları

Çalışmada, serolojik testlerde (HI, AGP, ELISA) kullanılacak antijenleri hazırlamak amacı ile liyofilize M. gallisepticum S6 suşları, Dr. Kaoru KOSHIMIZU (Japonya) ve Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Entitüsü Mycoplasma Bölüm Laboratuvarı'ndan (İstanbul) temin edilmiştir. Suşlar kullanılmadan önce sıvı ve katı besi yerlerinde üretilerek morfolojik, kültürel, fizyolojik ve serolojik karakterleri yeniden saptanmış ve aralarında bir fark bulunamamıştır. Japonya'dan temin edilen suş katı besi yerinde üretilerek tipik M. gallisepticum karakteri gösteren ortası düğmeli kolonilerden 8-10 tanesi agarla birlikte kesilerek PPLO buyyon içinde üretilmiş ve bunlardan elde edilen kültürler denemede kullanılmıştır.

Besi Yerleri

Mycoplasma besi yerleri : Çalışmada, Mycoplasma gallisepticum suşlarının üretilmesinde ve antijenlerin hazırlanmasında % 15-20 at serumu, % 1 maya ekstraktı, % 1 glukoz, 200-500 IU/ml penisilin ve 1/4000 oranında talyum asetat ilave edilmiş Trypticase Soy Broth (OXOID), PPLO Broth (DIFCO) ile birlikte aynı maddeleri içiren katı besi yeri olarak da PPLO Agar (DIFCO) kullanılmıştır.

AGP Test Ortamı : Denemede, AGP testi, içinde % 8 NaCl ve % 1.25 Noble Agar (DIFCO) içeren ortamda gerçekleştirilmiştir. Bakteriyeel kontaminasyonları önlemek amacı ile ortama 1/10.000 oranında mertiyolet ilave edilmiştir (140).

Konjugat

ELISA'da, tavşandan elde edilen kanatlı türlerine ait peroksidazla işaretli Nordic Immunological firmasına ait anti-IgG (Rach/IgG (H+L)/PO) konjugatı, Hannover Veteriner Yüksek Okulu'ndan temin edilmiş ve kullanılmıştır.

Substrat

ELISA'da, antijen, konjugat titrasyonları ve esas reaksiyon için, 5-aminosalisilik asit 40 mg/50 ml PBS oranında sulandırılmış ve bu solusyona 10 µl hidrojen peroksit (H_2O_2) katılarak testlerde substrat olarak kullanılmıştır.

Solusyonlar ve Tampon Sıvılar

Alsever Solusyonu : 12 g sodyum sitrat ve 4 g NaCl, 800 ml distile su içinde eritilerek otoklavda sterilize edilmiştir. Ayrıca, 20.5 g dekstroz, 200 ml distile suda eritilerek Seitz filtresinden süzölmüştür. Bu solusyon aseptik koşullarda sodyum sitrat ve NaCl solusyonuna ilave edilmiş ve tavuklardan kan alınmasında kullanılmıştır.

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) : 85 g NaCl, 1000 ml cam distile su cihazında hazırlanan distile su içinde eritilerek otoklavda sterilize edilmiş ve hazırlanan FTS, HA ve HI testlerinde sulandırma sıvısı olarak kullanılmıştır.

Özel yıkama solusyonu : Bu solusyon, eşit miktarda, A solusyonu (9.73 g KH_2PO_4 /1000 ml distile su) ve B solusyonunun (9.46 g Na_2HPO_4 /1000 ml distile su)

karıştırılması ve bu karışımdan 1 kısım solusyonun 9 kısım C solusyonuna (85 g NaCL/1000 ml distile su) ilave edilmesiyle hazırlanmış ve antijenin yıkanmasında kullanılmıştır.

Coating buffer : 8.4 g sodyum bikarbonat ve 0.2 g NaN₃, 1000 ml distile su içinde eritildikten sonra otoklavda sterilize edilerek hazırlanan Coating buffer, ELISA'da antijenin sulandırılmasında kullanılmıştır.

Fosfat buffer solusyonu (PBS) : 8 g NaCL, 0.2 g KH₂PO₄, 2.9 g Na₂HPO₄.12H₂O ve 0.2 g KCL, 1000 ml distile su içinde eritilerek otoklavda sterilize edilmiş ve hazırlanan PBS, ELISA'da substratın sulandırılmasında kullanılmıştır.

PBS-Tween 20 : Hazırlanan PBS'ye, 0.5 ml/1000 ml miktarında katılan Tween 20, ELISA'da konjugat ve serum sulandırmaları ile yıkama işlemleri sırasında kullanılmıştır.

Yıkanmış tavuk eritrotisi : Kan, Alsever solusyonuna 1/5 oranında alınıp 3 kez PBS solusyonu ile yıkanmış (1000 rpm'de 10 dakika) ve sediment PBS ile sulandırılarak HA ve HI testlerinde kullanılmıştır.

Yıkanmış tavuk eritrosit süspansiyonunun standardize edilmesi: HA ve HI testlerinde kullanılacak olan tavuk eritrositlerinin konsantrasyonunun standardizasyonu için eritrositleri % 0.5, 1, 1.5 ve 2 oranında sulandırılıp HA ve HI testlerinde kullanılmıştır.

Mikroplate'ler

Denemede kullanılan *M. gallisepticum* antijeninin HA titresini saptamak, şüpheli kan serumlarındaki antikorları ortaya koymak için yapılan ELISA ve HI testlerinde, Greiner firmasına ait, 96 çukurlu ve yuvarlak tabanlı mikroplate'lerden yararlanılmıştır.

Otomatik Dilüter

ELISA ve HI testlerinde, serumların sulandırılmaları amacıyla Microtiter Automatic Diluter (Dynatech)'den yararlanılmıştır.

Karıştırıcı

Plate'lerde hazırlanan dilusyonların karıştırılması amacıyla Microshaker AM69 (Dynatech) cihazı kullanılmıştır.

Micro ELISA Mini Reader MR590 (Dynatech)

ELISA'nın değerlendirilmesi micro ELISA mini reader MR590 cihazında 490 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Sonikatör

ELISA ve AGP testlerinde kullanılan antijenlerin parçalanması sonikatörde (Sonic 300 Dismembrator, Fisher Scientific) gerçekleştirilmiştir.

Antijenler

Serum Lam Aglutinasyon Antijen : Çalışmada, serum lam aglutinasyon testinde, Nobilis firması tarafından hazırlanmış boyalı CRD lam aglutinasyon antijeni kullanılmıştır.

Hemaglutinasyon (HA) ve Hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) Antijenleri : Denemede, HA ve HI testlerinde kullanılan antijen Adler ve Yamamoto'nun (8) bildirdikleri yonteme göre hazirlanmistir. Bu amacla, Japonya'dan temin edilen M. gal-lisepticum S6 suşu, çeşitli kültürel, morfolojik, fizyolojik ve serolojik karakterleri saptandıktan sonra tipik ureme karakteri gösteren ortası düğmeli kolonilerden 8-10 tanesi agarla birlikte kesilerek 5 ml PPLO buyyonunda 3-4 gün süreyle üretilmiş ve bu şekilde hazirlanan kültür 5 lt lik PPLO buyyona inokule edilerek 37 °C de aerobik ortamda belli aralıklarla çalkalanarak 3 gün süre ile üretilmiştir. inkubasyon süresi sonunda kültür + 4 °C de ve 10.000 rpm de 30-45 dakika santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen sediment özel yıkama solusyonu ile 3 kez yıkanmış ve son yıkamadan sonra, sediment aynı solusyon ile orjinal volümünün 1/100 ü oranında sulandırılarak testlerde antijen olarak kullanılmıştır.

Agar-Jel Presipitasyon (AGP) Antijeni : Çalışmada, AGP testinde kullanılan antijen, Nonomura ve Yoder'in (140) bildirdikleri yonteme göre hazirlanmistir. HA ve HI testleri için hazirlanan antijen, -20 °C de 10 defa dondurulup çözdürülerek ve ayrıca 10 dakika süreyle sonike edilerek (Sonic 300 Dismembrator, Fisher Scientific, 20.000 devir/dakika) parçalanmış ve buz dolabında 2-3 saat çökmesi için bekledikten sonra üst sıvısı AGP testinde antijen olarak kullanılmıştır.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Antijeni :

Denemede, ELISA'da kullanılan antijen, Heitmann ve ark. nın (92) bildirdikleri yöntemle göre hazırlanmıştır. Japonya'dan temin edilen *M. gallisepticum* S6 suşu 37 °C de, aerobik ortamda 72 saat süreyle 700 ml'lik PPLO buyyonda üretilmiş ve inkubasyon sonunda kültür 20.000 rpm de 30 dakika santrifüje edilerek sediment 2 kez FTS ile yıkanmıştır. Daha sonra sediment, distile su ile 1/100 oranında sulandırılmış, -20 °C de 3 kez dondurulup çözündürülmüş ve ayrıca 10 dak sonike edilerek (Sonic 300 Dismembrator, Fisher Scentific, 20.000 devir/dakika) parçalanmış ve ELISA da antijen olarak kullanılmıştır. ELISA antijeninin protein miktarı Biüret yöntemiyle tayin edilmiştir (21).

Serum Lam Aglutinasyon (SPA) Testi

Bu test, Timms ve Cullen'in (192) bildirdikleri yöntemle göre yapılmıştır. Test için temiz bir lam üzerinde 0.02 ml inaktive edilmemiş ve sulandırılmamış serum ve 0.02 ml boyalı CRD antijeni konularak karıştırılmış ve 2 dakika içinde oluşan kümeleşme pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. İki dakikadan sonra meydana gelen aglutinasyon, non-speksifik olarak değerlendirilmiştir. Testte değerlendirmeler gözle yapılmıştır.

Hemaglutinasyon (HA) Testi

Bu test, Matsuo ve ark. nın (130) bildirdikleri yöntemle göre mikropate'lerde yapılmıştır. Plate'in bütün gözlerine otomatik pipetle önce, 0.025 ml FTS konulmuş ve

sonra yukarıdan aşağıya doğru plate'in birinci gözlerine hazırlanmış olan M. gallisepticum S6 antijeninden 0.025 ml ilave edilerek otomatik sulandırıcı ile (Dynatech-Microtiter) soldan sağa doğru 1/2 sulandırmadan başlayarak antijenin iki katlı sulandırmaları yapılmıştır. Antijen 8 seri halinde sulandırılmıştır. Daha sonra, tüm gözlere 3 kez yıkanmış % 1'lik tavuk eritrositinden 0.025 ml ilave edilerek çalkalayıcıda (Microshaker AM69-Dynatech) 10-15 saniye çalkalanmış ve oda ısısında 45 dakika bekletilmiştir. Dantela tarzında çöküntünün olduğu gözlerde reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiş ve pozitif reaksiyon görülen en son sulandırma antijenin HA titresini olarak alınmış ve bu sulandırmada antijenin 1 HA ünitesi içerdiği kabul edilmiştir. Eritrositlerin nokta tarzında kümeleşmesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) Testi

Bu test, Matsuo ve ark. nın (130) bildirdikleri yöntemle göre mikropate'lerde yapılmış ve değerlendirilmiştir. Plate'in bütün gözlerine 0.025 ml FTS konulmuş, daha sonra yukarıdan aşağıya doğru plate'in birinci gözlerine test edilecek her bir serumun 1/5'lik sulandırmasından 0.025 ml ilave edilerek, otomatik sulandırıcı ile (Dynatech-Microtiter) soldan sağa doğru iki katlı sulandırmaları yapılmış, titresini HA testi ile belirlenen ve 4 HA ünitesinde sabit tutulan antijenden bütün gözlere 0.025 ml konularak çalkalayıcıda (Microshaker AM69-Dynatech) 10-15 saniye

çalkalanmış ve oda ısısında 15-20 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, bütün gözlere 3 kez yıkanmış % 1'lik tavuk eritrositinden 0.025 ml ilave edilerek çok hafif çalkalanmış ve oda ısısında 45-60 dakika bekletilmiştir. Düşme tarzında cöküntünün görüldüğü gözlerde reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiş, pozitifliğin görüldüğü en son sulandırma, serumun HI titresi olarak kabul edilmiştir. Değerlendirmede, 1/80 ve daha yüksek titreler CRD yönünden pozitif, 1/40 titreler şüpheli ve 1/20 ve daha düşük titreler ise negatif olarak kabul edilmişlerdir. Denemede, standart pozitif ve negatif serumlar da kullanılmıştır.

Agar-Jel Presipitasyon (AGP) Testi

Bu test, Nonomura ve Yoder'in (140) bildirdikleri yönteme göre, 5 cm çapındaki niastik petri kutularında (Greiner firması) yapılmıştır. İçerisinde % 8 oranında NaCl bulunan, % 1.25'lik Noble Agar petri kutularına 10 ml miktarında dökülmüştür. Agar katılaştıktan sonra üzerinde 4 mm çapında ve aralarında 4 mm mesafe bulunan 7 çukur, birisi merkezde altısı periferde olmak üzere, açılmış ve çukurların dipleri pastör pipeti kullanılarak birer damla agar ile kapatılmıştır. Ortadaki çukura AGP antijeni, çevredeki çukurlara ise test serumlarından çukurlar tamamen dolana kadar ilave edilmiş ve petriyer oda ısısında ve nemli bir ortamda 48-72 saat süreyle inkube edilmişlerdir. Antijenle arasında presipitasyon çizgisi oluşan serumlar, pozitif ve negatif kontrol serumlarıyla mukayese edilerek pozitif olarak değerlendirilmişlerdir.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bu test, Heitmann ve ark. nın (92) bildirdikleri yönteme göre antijen ve konjugat titrasyonunu, negatiflik kriterinin belirlenmesi ve testin uygulanması olmak üzere 4 aşamada gerçekleştirilmiştir.

Antijen Titrasyonu : *M. gallisepticum* S6 susundan hazırlanan ve orjinal volümünün 1/100'ü oranında sulandırılan antijenin Coating Buffer'da 1/50'den başlayarak iki katlı sulandırmaları tüplerde hazırlanmış ve bu sulandırmalardan mikropate'in gözlerine soldan sağa doğru ilk sıraya 0.025 ml 1/50 sulandırmadan, ikinci sıraya 1/100 sulandırmadan 0.025 ml olmak üzere sekizinci sıraya da 0.025 ml 1/6400 sulandırmadan konularak plate 37 °C de 3 saat nemli bir ortamda inkube edilmiştir. inkubasyondan sonra plate PBS-Tween 20 ile 3 kez yıkanmış ve yukarıdan aşağıya doğru ilk gözlere standart pozitif serumdan 0.050 ml, diğer gözlere ise 0.025 ml PBS-Tween 20 konularak otomatik sulandırıcıda soldan sağa doğru serumun iki katlı sulandırması yapılmış, 37 °C de 30 dakika inkubasyondan sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Titresi 1/100 olarak bilinen kanatlı konjugatından bütün gözlere 0.025 ml ilave edilmiş ve 37 °C'de 30 dak inkube edilmiştir. Son yıkamayı takiben, 50 ml PBS içinde sulandırılan 40 mg 5-aminosalisilik asit + 10 µl hidrojen peroksit (H_2O_2)'den bütün gözlere 0.050 ml konularak oda ısısında 30-45 dakika tutulmuş, sonuçlar gözle ve minireader ile değerlendirilmiştir.

Konjugat Titrasyonu : Coating Buffer'da 1/500 oranında sulandırılan antijenden plate'in bütün gözlerine 0.025 ml konarak 37 °C de nemli bir ortamda 3 saat inkubasyona bırakılmıştır. Mikroplate soldan sağa doğru 6 bölüme ayrılmış ve yine soldan sağa doğru ilk gözlere bilinen pozitif ve negatif serumlardan 0.050 ml, diğer gözlere de 0.025 ml PBS-Tween 20 konmuş ve serumların yukarıdan aşağıya doğru iki katlı sulandırmaları yapılmış, 37 °C de 30 dakika inkubasyonu takiben yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Konjugatın, tüplerde PBS-Tween 20 içinde 1/100 sulandırmadan başlayarak iki katlı olmak üzere 1/3200'e kadar sulandırmaları yapılmış ve bu sulandırmalardan her birinden, yukarıdan aşağıya doğru ayrılan 6 bölümün bütün gözlerine 0.025 ml konulmuştur. 37 °C de 30 dakika inkubasyondan sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Son aşamada, 50 ml PBS içinde sulandırılan 40 mg 5-aminosalisilik asit + 10 µl hidrojen peroksit (H₂O₂)'den bütün gözlere 0.050 ml ilave edilerek oda ısısından 30-45 dakika tutulmuş, sonuçlar gözle ve minireader ile değerlendirilmiştir.

Negatiflik Kriterinin Belirlenmesi: Lam aglutinasyon ve HI testleri ile negatif olduğu belirlenen ve SPF tavuklardan sağlanan 20 adet negatif serum, 3 kez ELISA ile incelenerek alınan değer ortalamaları düzenlenmiş ve bu sonuçlara göre negatiflik eşiği belirlenmiştir. Denemeler sırasında bu eşiğin üstünde reaksiyon veren serumlar pozitif, altındaki serumlar ise ELISA'da negatif olarak değerlendirilmişlerdir.

ELISA'nın uygulanması : ELISA, Heitmann ve ark. nın (92) bildirdikleri yönteme göre mikroplate'lerde yapılmıştır. Plate'in bütün gözlerine Coating Buffer'da 1/500 oranında sulandırılan antijenden 0.025 ml konulmuş ve 37 °C de nemli bir ortamda 3 saat inkubasyondan sonra PBS-Tween 20 solusyonu ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra, test edilecek serumlar 1/5 oranında PBS-Tween 20'de sulandırılmış ve plate'in soldan sağa doğru ilk gözlerine 0.050 ml miktarında konulmuş, diğer gözlere de 0.025 ml PBS-Tween 20 solusyonundan konarak, serumların otomatik sulandırıcıda yukarıdan aşağı doğru 0.025 ml aktarılarak iki katlı sulandırmaları yapılmıştır. 37 °C de 30 dakika inkubasyondan sonra, yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Mikroplate'in gözlerine, PBS-Tween 20 içinde 1/500 oranında sulandırılmış konjugattan 0.025 ml konarak 37 °C de inkubasyona bırakılmıştır. Son yıkamayı takiben, 50 ml PBS içinde sulandırılan 40 mg 5-aminosalisilik asit +10 µl hidrojen peroksit (H₂O₂)'den bütün gözlere 0.050 ml ilave edilerek oda ısısında 30-45 dakika tutulmuştur. Sonuçta, her bir gözün absorbanı 490 nm de (optik dansite) minireader ile değerlendirilmiş ve negatiflik eşiğinin üstünde kalan en son sulandırmaya kadar reaksiyon pozitif kabul edilmiştir.

İstatistik Değerlendirmeler : SPA testine göre ELISA ve HI testlerinin spesifite ve sensitivite değerlendirmeleri Thrusfield'in bildirdiği yönteme göre yapılmıştır (187).

5. BULGULAR

Hiperimmün Serum : Denemede, ELISA'da antijen, konjugat titrasyonları, pozitiflik/negatiflik kriterinin belirlenmesi, ELISA, HI ve AGP testlerinin uygulanmasında kontrol amacı ile kullanılan pozitif serumunun (Hiperimmün serum) titresi HI testinde 1/1280 olarak belirlenmiştir.

Kan Konsantrasyonunun Standardizasyonu : HA ve HI testlerindeki eritrositlerin standardizasyonu kanın % 0.5, 1, 1.5 ve 2 oranında sulandırılması ile yapılmıştır. Gerek dantela gerekse düğme tarzındaki çöküntüler en iyi % 1'lik eritrosit süspansiyonunuda görüldüğünden, kanın bu konsantrasyonu HA ve HI testlerinde kullanılmıştır.

Hemaglutinasyon (HA) Testi : Denemede kullanılan *M. gallisepticum* S6 suşundan hazırlanan antijenin HA titresini saptamak amacı ile, mikropate'lerde bu test 8 kez tekrarlanmış ve titre 1/128 olarak belirlenmiştir. Deneme süresince, her çalışmadan önce, antijenin titresini kontrol amacı ile bu test yeniden yapılmış ve titede bir değişiklik saptanmamıştır.

ELISA Antijeninin Protein Miktarının Tayini : Hazırlanan ELISA antijeninin kullanılmasından önce biüret metodu ile total protein miktarı hesaplanmış ve 7 mg/ml olarak bulunmuştur.

Serum Lam Aglutinasyon (SPA) Testi : Denemede kullanılan 900 adet tavuk serumu lam aglutinasyon testi ile değerlendirilmiştir. Testin sonucunda broyler serumlarından 51 (%16.56) serum pozitif ve 257 (%83.44) serum negatif ; yumurtacı serumlarından 77 (%27.21) serum pozitif ve 206 (%72.79) serum negatif; damızlık serumlarından da 54 (%17.48) serum pozitif ve 255 (%82.52) serum negatif olarak saptanmıştır (Tablo 2).

Hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) Testi : Denemede, toplam 900 adet tavuk serumu HI testi ile değerlendirilmiştir. Broyler serumlarından 193 (%62.66) serum hiç HI titresi göstermezken 51 (%16.56) serum 1/20 veya daha düşük, 27 (%8.77) serum 1/40 ve 37 (%12.10) serum da 1/80 veya daha yüksek titreler göstermişlerdir. Yumurtacı serumlarından 166 (%58.66) serum hiç HI titresi göstermezken, 48 (%16.69) serum 1/20 veya daha düşük, 18 (%6.36) serum 1/40 ve 51 (%18.02) serum da 1/80 veya daha yüksek HI titresi göstermişlerdir. Damızlık serumlarından ise 171 (%55.34) serum HI titresi göstermezken, 65 (%21.04) serum 1/20 veya daha düşük, 33 (%10.68) serum 1/40 ve 40 (%12.49) serum da 1/80 veya daha yüksek HI titreleri göstermişlerdir (Tablo 2). SPA ve HI testleri karşılaştırıldığında ise 182 adet toplam SPA pozitif serumdan 87'si (%47.80) HI pozitif ve 95'i (%52.20) HI negatif saptanırken (Tablo-3), 718 adet toplam SPA negatif serumdan 38'i (%5.29) HI pozitif ve 680'i (%94.71) HI negatif belirlenmiştir (Tablo-4). Bu sonuçlara göre HI testinin SPA

Tablo-2. Çalışmada kullanılan broyler, yumurtacı ve damızlık tavuklara ait serumların serolojik test sonuçları

Serumun orijini	Sağlandığı kaynak	Serum Sayısı	SPA		HI		AGP		ELISA	
			+	-	+	-	+	-	+	-
Broyler	Bakteriyoloji Bilim Dalı	68	21	47	25	43	12	56	12	56
	Sincan Tavuk Mezbahası	228	26	202	12	216	9	219	137	91
	Ticari İşletme I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ticari İşletme II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ticari İşletme III	5	2	3	-	5	-	5	-	5
Ticari İşletme IV	7	2	5	-	7	-	7	-	7	
Yumurtacı	Bakteriyoloji Bilim Dalı	212	62	150	47	165	15	197	144	68
	Sincan Tavuk Mezbahası	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ticari İşletme I	31	7	24	2	29	5	26	16	15
	Ticari İşletme II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ticari İşletme III	26	8	18	2	24	-	26	4	22
Ticari İşletme IV	14	-	14	-	14	-	14	5	9	
Damızlık	Bakteriyoloji Bilim Dalı	10	4	6	3	7	-	10	5	5
	Sincan Tavuk Mezbahası	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ticari İşletme I	211	31	180	23	188	8	203	118	93
	Ticari İşletme II	80	16	64	14	66	2	78	57	23
	Ticari İşletme III	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ticari İşletme IV	8	3	5	-	8	-	8	1	7	
TOPLAM		900	182	718	128	772	51	849	543	357

testine göre sensitivitesi %47.8, spesifitesi ise %94.7 olarak hesaplanmıştır.

Tablo-3. SPA pozitif serum örneklerinin HI titre dağılımları

SPA (+) serum sayısı	HI titreleri			
	-	1/20	1/40	1/80
Broyler 51	11(21.57)	2(3.92)	11(21.57)	27(52.94)
Yumurtacı 77	26(33.77)	4(5.20)	12(15.58)	35(45.45)
Damızlık 54	9(16.67)	9(16.67)	11(20.37)	25(46.29)
TOPLAM 182	46(25.27)	15(8.24)	34(18.68)	87(47.81)

Tablo-4. SPA negatif serum örneklerinin HI titre dağılımları

SPA (-) serum sayısı	HI titreleri			
	-	1/20	1/40	1/80
Broyler 257	182(70.82)	49(19.07)	16(6.23)	10(3.88)
Yumurtacı 206	140(67.96)	46(22.33)	6(2.91)	14(6.80)
Damızlık 255	164(64.31)	55(21.57)	22(8.63)	14(5.49)
TOPLAM 718	486(67.69)	150(20.89)	44(6.13)	38(5.29)

Agar-Jel Presipitasyon (AGP) Testi : Denemede toplam 900 adet tavuk serumu AGP testi ile değerlendirilmiştir. Broyler serumlarından 21 (%6.82) serum pozitif ve 287 (%93.18) serum negatif; yumurtacı serumlarından 20 (%7.07) serum pozitif ve 263 (% 92.93) serum negatif; damızlık serumlarından ise 10 (% 3.24) serum pozitif ve 299 (%96.76) serum negatif olarak saptanmıştır (Tablo 2).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

a) Antijen titrasyonu : HI testi ile titresi 1/1280

olarak saptanan, bilinen pozitif serumun, antijen sulandırmasında en iyi pozitif reaksiyon gösterdiği nokta antijenin titresi olarak değerlendirilmiştir. Bu titre 1/500 olarak belirlenmiş ve deneme süresince antijen 1/500 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

b) Konjugat titrasyonu : Titresi HI testinde 1/1280 olarak belirlenen, bilinen pozitif serum ile 1/500 oranında sulandırılmış antijen kullanılarak yapılan konjugat titrasyonunda, titre 1/500 olarak saptanmıştır. Deneme süresince, ELISA'da, konjugat 1/500 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

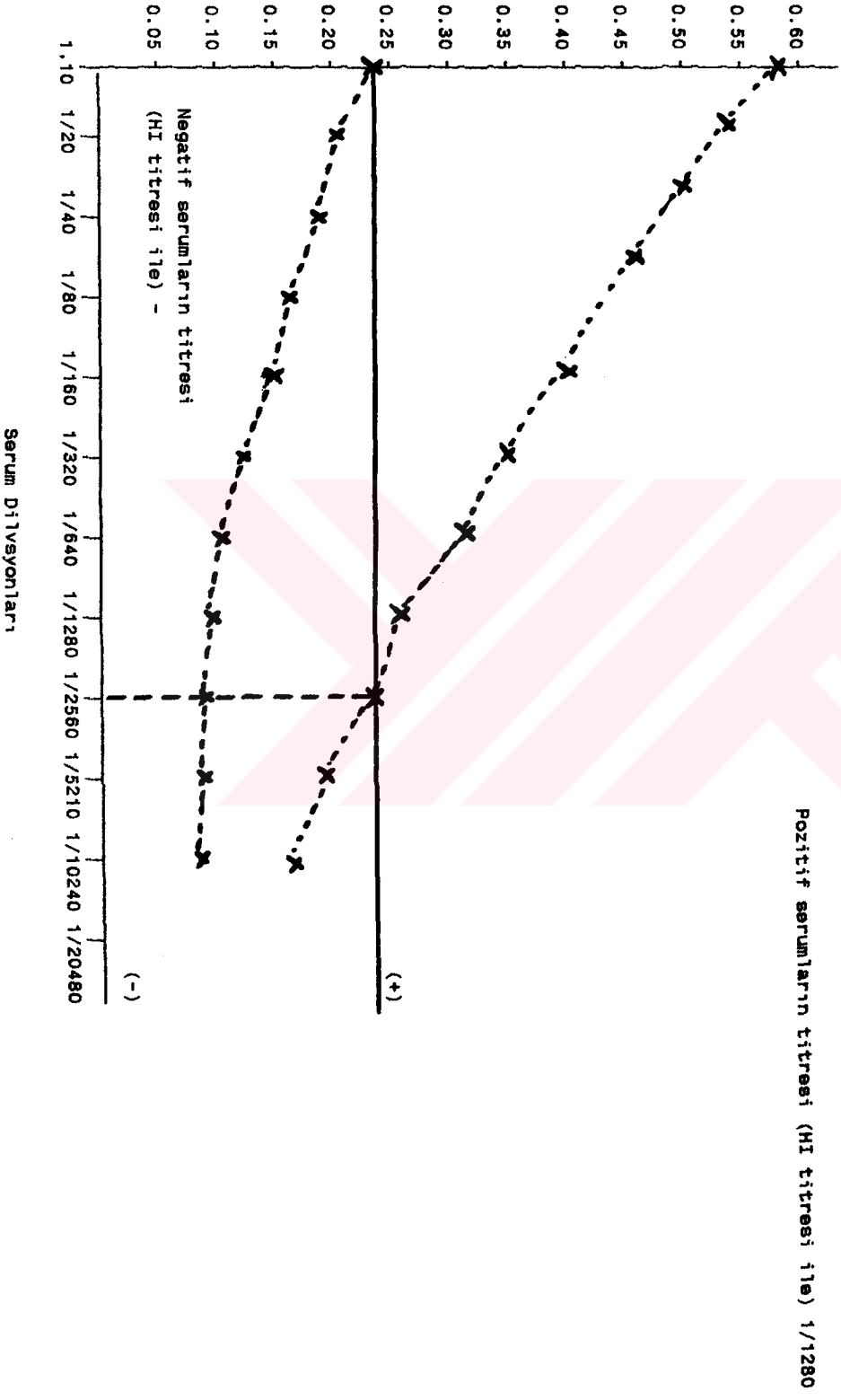
c) Negatiflik kriterinin belirlenmesi : SPA ve HI testleriyle negatif reaksiyon veren 20 serum örneği ve titresi HI testi ile 1/1280 olarak belirlenen pozitif serum, 3 kez ELISA ile incelenmiş, alınan değer ortalamaları düzenlenerek negatiflik ve pozitiflik eğrileri çizilmiş (Grafik 1) ve negatiflik eşiği optik dansite (OD) 0.24 olarak saptanmıştır. Deneme süresince ELISA'da, test edilen serumların bu eşiğin üstünde reaksiyon veren en son sulandırmaları pozitif olarak kabul edilmiş ve serum titreleri bu sulandırmaya göre hesaplanmıştır.

d) ELISA: ELISA'da 308 broyler serumundan 193(62.66) serum pozitif, 115 (% 37.34) serum negatif; 283 yumurtacı serumdan 169 (% 59.72) serum pozitif, 114 (%40.28) serum negatif, 309 damızlık serumundan da 181 (% 58.58) serum

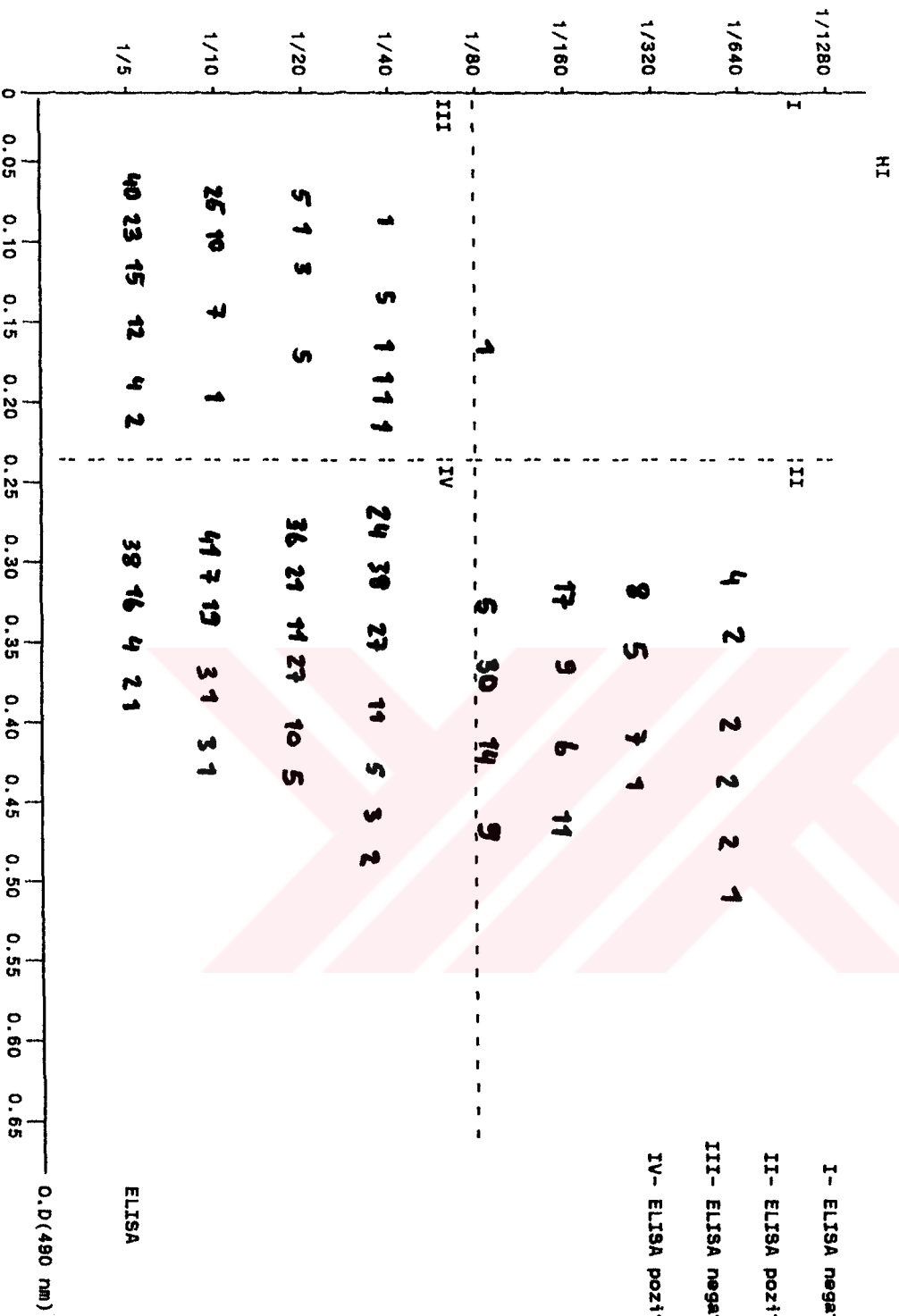
pozitif ve 128 (% 41.42) serum negatif bulunmuştur (Tablo 2). ELISA ve HI ile incelenen 900 serumun optik dansite (OD) ve HI titre dağılımları Grafik-2 de görülmektedir. Buna göre, sadece HI ile 1 (%0.11) serum, sadece ELISA ile 372 (%41.33) serum pozitif olarak belirlenmiştir. HI-ELISA ile 401 (%44.56) serum negatif ve aynı testlerle 126 (%14.00) serum pozitif olarak saptanmıştır.



Grafik 1. ELISA 'da Negatif ve Pozitif Serumlarla Negatiflik Kriterinin Belirlenmesi



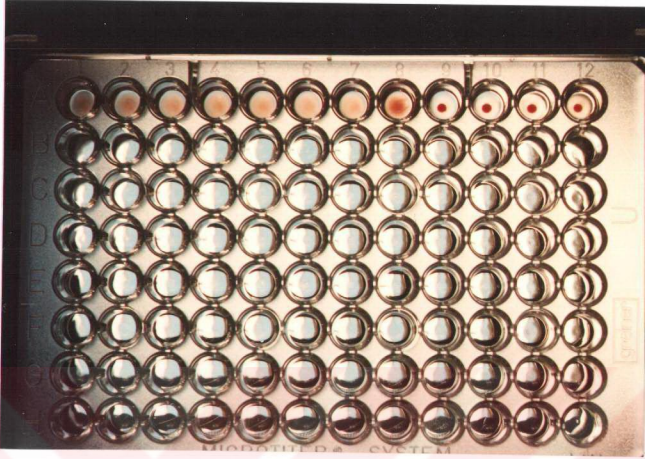
Grafik 2. ELISA ile incelenen 900 Serumun OD (optik dansite) ve HI Titrasyonlarının Dağılımı



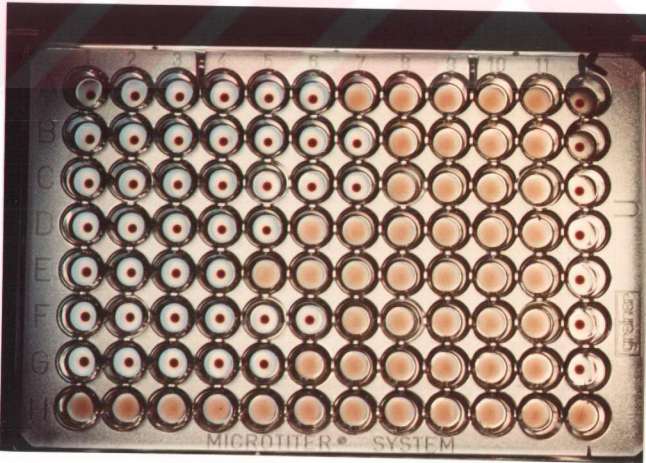
- I- ELISA negatif HI pozitif } 1 serum(X0.11)
- II- ELISA pozitif HI pozitif } 126 serum(X14.00)
- III- ELISA negatif HI negatif } 401 serum(X44.56)
- IV- ELISA pozitif HI pozitif } 372 serum(X41.33)

ELISA

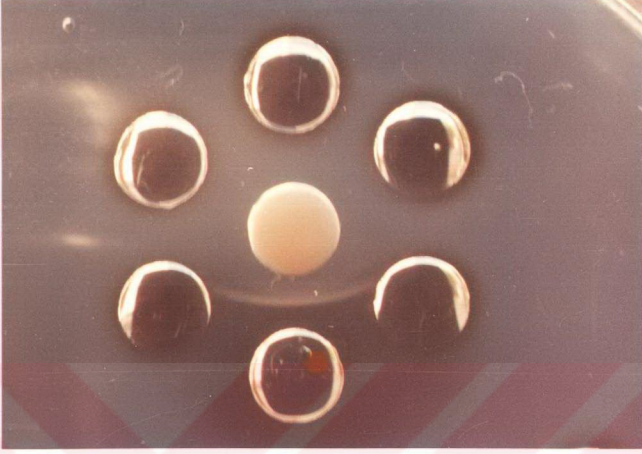
O.D.(490 nm)



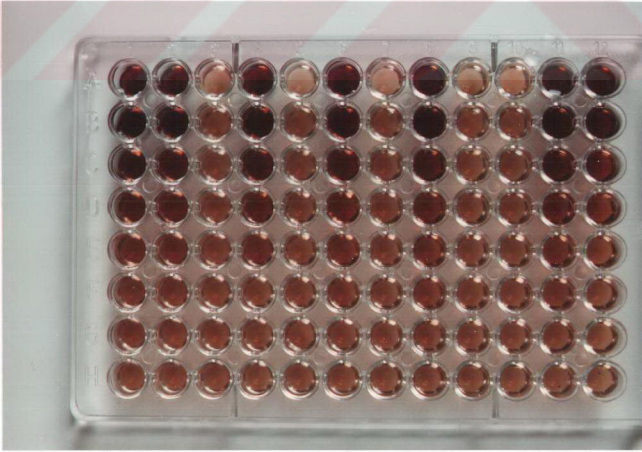
Sekil 1. Hemaglutinasyon (HA) Testi



Sekil 2. Hemaglutinasyon Inhibisyon (HI) Testi



Şekil 3. Agar Jel Presipitasyon (AGP) Testi



Şekil 4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanatlı hayvanlarda *Mycoplasma gallisepticum* infeksiyonları, tavukların "Kronik Solunum Sistemi Hastalığı" (CRD) ve hindilerin "İnfeksiyöz Sinüsitis i" olarak bilinmektedir. Tavuk ve hindi sürülerinde *M. gallisepticum* infeksiyonları hırıltılı soluma, burun akıntısı, aksırık-tıksırık, soluma güçlüğü, tortikollis, sinüsitis, konjunktivitis, hava kesesi yangısı ve bazen de sinirsel semptomlar ile birlikte yemden yararlanmada, vücut ağırlığında ve yumurta veriminde azalma ile karakterizedir. Genç hayvanlarda, özellikle komplike olgularda ve stres koşulları altında ölümlere neden olan bu hastalık tüm dünyada yaygındır ve çok yönlü yetiştirilen (broyler, yumurtacı, damızlık) tavuk ve hindileri etkileyerek önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Tavuklarda *M. gallisepticum* infeksiyonlarının tanımlanmasından ve dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunduğu anlaşılmasından sonra, etken ve hastalık hakkında birçok araştırma yapılmıştır (9, 15, 41, 77, 156). CRD infeksiyonunda kalıcı bir bağışıklık oluşmaması, aşılama denemelerinin tam bir başarı ile sonuçlanamamasına yol açmıştır (7, 12, 210). İnfekte hayvanlardan etken izolasyon ve identifikasyonunun zaman alıcı ve zor oluşu, etken izolasyonunu engelleyen birçok faktörün bulunması, bir sürü içinde, özellikle, komplike olmamış CRD olgularında klinik

semptomların fazla belirgin olmayışı, sürü içinde gizli portör hayvanları belirlemek ve ayrıca sürünün CRD durumunu ortaya koymak için SPA (26, 166), TA (5, 6), HI (74, 139), AGP (24, 168) ve ELISA (21, 146) gibi serolojik yöntemlerin kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Hayvanların serumlarında oluşan spesifik antikorların belirlenmesinde çabukluk, kolaylık ve duyarlılık bakımlarından avantajlı olan SPA testi birçok araştırmacı tarafından doğal ve deneysel *M. gallisepticum* infeksiyonlarında aglutininlerin belirlenmesinde kullanılmıştır (50, 161, 166, 168, 185, 189, 191). Roberts (161), 6 haftalık etçi piliçleri intranazal sinus yolu ile deneysel olarak infekte ettikten sonra hayvanların antikor yanıtlarını incelemiş, eprüvasyon suşuyla (S6 suşu) yaptığı SPA 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 üç antijenle de pozitif reaksiyon verdiğini açıklamıştır. Benzer bir çalışmada Timms ve Cullen (191), 6 ve 16 haftalık 3 grup Beyaz Leghorn pilici *M. gallisepticum* S6, F ve WS7 suşlarıyla deneysel olarak infekte etmişler ve 28 hafta boyunca hayvanlarda oluşan serolojik yanıtı homolog ve heterolog antijenleri kullanarak SPA ve HI testleri ile incelemişler, yaptıkları SPA testinde aglutininlerin infeksiyondan sonraki 1. haftadan itibaren saptanabildiğini,

antikorların heterolog antijenlerle de belirlenebildiğini ancak homolog antijenlerle daha yüksek titreler elde edildiğini, HI antikorlarının ise infeksiyondan ancak 2 hafta sonra belirlendiğini bildirmişlerdir. Sahu ve Olson (166), inceledikleri 36 adet broyler sürüsüne ait 43.040 adet kan serumundan 53 (% 0.12) adedinin SPA testi ile pozitif bulunduğunu açıklamışlardır. Araştırmacılar, yaptıkları başka bir çalışmada ise (168), broyler, yumurtacı ve damızlık sürülere ait serumlardan % 1-100 pozitif reaksiyonlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Doğal ve deneysel infeksiyon sonunda 1 hafta içinde ortaya çıkan ve genellikle IgM karakterinde (161, 164, 207) aglutininlerin saptanmasında oldukça duyarlı olan ve bu nedenle bir sürü tarama testi olarak kullanılan SPA testi bazı koşullar altında non-spesifik pozitif reaksiyonlar da vermektedir (32, 34, 162, 186, 192, 206, 226). Bu non-spesifik reaksiyonların, serumun 1/5 sulandırılması veya HI ve AGP test sonuçları ile doğrulanabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından açıklanmıştır (32, 186, 192, 226). Bu çalışmada, 0.02 ml serum ve 0.02 ml ticari boyalı lam aglutinasyon antijeninin karıştırılması ve 2 dakika içinde sonuçların değerlendirilmesi ile yapılan SPA testinde etçi, yumurtacı ve damızlık hayvanlara ait toplam 900 serum örneğinden 182 (% 20.22) adedi pozitif, 718 (% 79.78) adedi ise negatif bulunmuştur. Non-spesifik reaksiyonların elimine edilmesi için SPA testinde pozitif bulunan 182 serum örneğinin 1/5 sulandırılarak yeniden test edilmesi sonucunda ise 132 (%

72.53) serum örneği pozitif ve 50 (% 27.47) serum örneği de negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, araştırmacıların bulgularına paralellik sağlamakta ve serumlar 1/5 sulandırıldığında pozitif serum sayısındaki azalma SPA testinin non-spesifik antikordardan fazlasıyla etkilendiğini ve gerçek değerlerin belirlenmesinde mutlaka diğer serolojik testlerle konfirme edilmesi gerektiğini göstermektedir.

CRD kontrol programlarında SPA testinin yanısıra duyarlılığı daha az fakat spesifitesi oldukça fazla olan HI testi, bir doğrulama testi olarak kullanılmaktadır (47, 80, 118, 126, 158, 166). İnfeksiyondan yaklaşık 14 gün veya klinik semptomların görülmesinden 4-6 gün sonra ortaya çıkan (47) HI antikordlarının saptanması amacıyla HI testi geliştirilmiş ve yapılan karşılaştırmalı denemeler sonucunda, infeksiyonun belirlenmesinde SPA testinden daha spesifik olduğu vurgulanmıştır (51, 126, 139, 161). Etkenin tavuk eritrositlerini aglutine edebildiği ve bu reaksiyonun infekte hayvan serumları tarafından inhibisyonunun bildirilmesinden sonra (201), çeşitli araştırmacılar etkenin HA özelliği üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Fahey ve Crawley (74), sıvı besi yerlerinde 3 günlük bir inkubasyon sonunda HA aktivitesinin saptanabildiğini, 7-10. günlerde ise titrenin maksimum düzeye ulaştığını ve bu titrenin nadiren 1/16 yı geçtiğini bildirmişlerdir. Hall (87) ise, % 10 at serumu ve maltoz ile zenginleştirilmiş Tryptose fosfat buyyonda etkeni üreterek hazırladığı antijenin 1/320 - 1/640 titrelerde HA

verdiğini açıklamıştır. Kleckner (113), serotiplendirme amacı ile hazırladığı antijenin 1/128 titrede HA verdiğini, Kuniyasu ve Ando (118) ise, değişik antijen grupları arasında HA titreleri bakımından farklar bulunduğunu, antijenlerin 1/40 ile 1/320 arasında değişen HA titreleri gösterdiklerini bildirmişlerdir. Cullen ve Timms (51), inceledikleri 1558 piliç serumundan 226 adedini (% 14.5) HI testi ile pozitif bulurlarken, 266 adedini (% 17.1) SPA testi ile pozitif olarak saptamışlar ve SPA testinin HI testine göre % 4.33 oranında yanlış pozitif ve % 1.42 oranında da yanlış negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Sahu ve Olson (166), inceledikleri broyler serumlarından 53 adet pozitif serumun 5 adedinin (% 9.4) HI pozitif titre verdiğini, öte yandan da 1233 SPA negatif serum örneğinden 80 adedinin (% 6.5) HI testi ile pozitif olarak saptandığını, sonuçta ise, SPA negatif serum örneklerinin HI testi ile de incelenmelerinin yararlı olacağını vurgulamışlardır. Lin ve Kleven (126), *M. gallisepticum* antikollarının saptanmasında SPA ve HI testlerini karşılaştırmışlar, inceledikleri 162 tavuk serumundan 115 adedini (% 70.99) SPA, 56 adedini (% 34.57) ise HI testi ile pozitif bulmuşlar ve HI testinin SPA testine oranla çok daha spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları karşılaştırmalı çalışmaları sırasında Roberts ve Olesiuk (164), *M. gallisepticum* ile infekte hayvan serumlarının *M. synoviae* SPA antijeni ile non-spasifik reaksiyon oluşturmadığını ancak, *M. synoviae* ile infekte hayvan serumlarının *M. gallisepticum* SPA antijeni ile reaksiyon

verdiklerini, fakat bu serumların HI testi ile negatif bulduklarını açıklamışlardır. Vardaman ve Yoder (205), hazırladıkları HI antijenleri ile *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* infeksiyonlarını başarı ile ayırt edebildiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, HA testi ile titresi 1/128 olarak saptanan antijen 4 HA ünitesinde sulandırılmış ve % 1 yıkanmış tavuk eritrositi ile birlikte HI testinde kullanılmıştır. İncelenen toplam 900 tavuk serumundan 125 adedi (% 13.89) HI testinde pozitif, 775 adedi (% 86.11) ise negatif olarak değerlendirilmiştir. SPA pozitif 182 serum örneğinden 95 adedi (% 52.19) HI negatif bulunurken SPA negatif 718 serum örneğinden 38 adedi (% 5.29) HI ile pozitif olarak saptanmıştır. Alınan bu sonuçlara göre HI testinin SPA testine göre sensitivitesi % 47.8, spesifitesi ise % 94.7 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, araştırmacıların sonuçları ile uyum sağlamakta, SPA testinde oluşan non-spesifik reaksiyonların HI testinde bir problem olmadığı gerçeğini bir kez daha vurgulamaktadır. Şüpheli serum örneklerinden SPA pozitif sonuç verenlerin tümünün, SPA negatif sonuç verenlerin ise rastgele seçilecek bir miktarının HI testi ile incelenmesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

M. gallisepticum infeksiyonlarında oluşan antikörlerin saptanması, izole edilen suşların identifikasyonu ve ayrıca değişik suşların serotiplendirilmesi için AGP testinin de kullanılabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından

bildirilmiştir (24, 103, 140, 167, 168). Aycardi ve ark. (24), katı karbondioksit ve etanolde 10 kez dondurup çözdürmek suretiyle hazırladıkları antijenleri, farklı serotiplere ait Mycoplasma suşlarının serotiplendirilmesinde kullanmışlardır. Araştırmacılar, M. gallisepticum ve M. synoviae kültürlerinin diğer serotiplerle kros-reaksiyon vermediklerini, oluşan kros-reaksiyonlara göre de inceledikleri 19 adet kanatlı Mycoplasma serotipinin, 9 antijenik grup içinde toplandıklarını açıklamışlardır. Jordan ve Kulasegaram (103), AGP testinin duyarlılığının sınırlı olduğunu, tavuk serumlarındaki antikörlerin saptanmasında daha duyarlı serolojik testlerin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Nonomura ve Yoder (140), dondurup çözdürme, sonik vibrasyon veya sodyum dodesil sülfat (SDS) ile parçaladıkları antijenleri kullanarak AGP testi ile Mycoplasma izolatlarını identifiye etmeye çalışmışlar, araştırmacılar, doğal olarak infekte tavuk ve hindi sürülerinden çok az hayvanın AGP ile reaksiyon verdiğini, yine de testin oldukça spesifik olduğunu açıklamışlardır. Sahu ve Olson (167), broyler damızlık sürülere ait serumları incelerken SPA testinde görülen non-spesifik reaksiyonların negatif HI ve AGP test sonuçları ile doğrulanabileceğini bildirmişler ve aynı araştırmacılar yaptıkları başka bir çalışmada (168), broyler, yumurtacı ve damızlık sürülerinde etken izolasyonu yapılamadığı durumlarda, hayvanların kanlarında aglutininlerin, presipitinlerin ve HI antikörlerinin varlığının gösterilmesinin önemini ortaya

koymuşlar ve SPA, HI ve AGP testleri arasında iyi bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, AGP antijeni, *M. gallisepticum* S6 suşunun % 10 at serumu ve glukoz ile zenginleştirilmiş PPLO buyyonda üretilmesi, toplanan antijenin -20 °C de 10 defa dondurulup çözündürülmesi ve ayrıca sonike edilmesi ile hazırlanmıştır. Test ortamı olarak da, içinde % 8 oranında NaCL içeren % 1.25 Noble Agar kullanılmıştır. Toplam 900 adet tavuk serumundan 51 adedi (% 5.67) AGP ile pozitif, 849 adedi (% 94.33) ise negatif olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, şüpheli kan serumlarında *M. gallisepticum* antikorlarının saptanmasında AGP testi diğer testlere oranla oldukça yetersiz kalmıştır. Bu sonuç, kan örnekleri alındığı sırada hayvanların kan serumlarında IgG antikorlarının yeterli düzeye ulaşmamış olmasına bağlı olabilir.

M. gallisepticum infeksiyonunun teşhisi amacıyla kullanılan ELISA, son yıllarda gündeme gelmiş ve çeşitli araştırmacılar tarafından diğer tüm testlere oranla daha duyarlı ve spesifik bulunmuştur (21, 146, 150, 151, 181, 184). Testte antijen olarak sonikasyon (150, 184) ile veya sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi bir deterjanla (21, 146, 181) parçalanmış hücreler kullanılmaktadır. Konjugat olarak peroksidazla (21, 151) veya alkalin fosfatazla (146, 181) işaretlenmiş tavşan anti-tavuk IgG leri ve substrat olarak da peroksidaz enzimi için 2-2-azino,di-(3-etil-benzotiazolinsülfat) (ABTS), 5-aminosalisilik asit + hidrojen peroksit veya

orto-fenilendiamin (21, 184), alkalen fosfataz enzimi için de para-nitrofenilfosfat (146, 181) kullanılmaktadır. Ansari ve ark. (21), ELISA tekniğinde kullanmak üzere tüm bakteri hücrelerini ve parçalanmış hücre süspansiyonlarını kullanmışlar ve her iki antijenin de mikrotiter plate yüzeyine kuvvetlice bağlanabildiğini ve ELISA tekniğinin HI testinden daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Opitz ve ark. (146), *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* infeksiyonlarında oluşan antikörleri ELISA, SPA ve HI ile inceleyerek *M. gallisepticum* F suşuyla infekte tavuklardan ELISA ile % 100, SPA ile % 98 ve HI ile de % 80 oranlarında pozitiflik belirleyerek antikörleri saptamada ELISA tekniğinin SPA ve HI testlerinden daha duyarlı olduğunu ayrıca, ELISA ile SPA testine göre daha az non-spesifik reaksiyon oluştuğunu bildirmişlerdir. Patten ve ark. (150), ELISA tekniğinin SPA ve HI testlerine oranla daha duyarlı ve spesifik olduğunu açıklamışlar ve inceledikleri 99 serum örneğinden 74 adedini (% 74.75) ELISA ve SPA ile pozitif bulduklarını, infeksiyonun saptanmasında HI testinden daha kısa bir sürede ELISA ile antikörleri belirleyebildiklerini ve ortalama ELISA titrelerini, ortalama HI titrelerine oranla 1-3 katı daha fazla bulduklarını açıklamışlardır. Piela ve ark. (151), ELISA tekniğinde serum yerine yumurta sarısının da kullanılabileceğini, Talkington ve ark. (181) da, ELISA ve SPA ile infeksiyon sonrası 7. günden itibaren antikörlerin saptanabildiğini, HI testinde ise ancak 10. günden sonra antikörlerin diagnostik bir düzeye gelebileceklerini açıklamışlardır. Bu çalışmada, ELISA

antijeni, *M. gallisepticum* S6 susunun % 10 at serumu ve glukoz ile zenginleştirilmiş PPLO buyyonda üretilmesi, toplanan antijenin -20 °C de 10 defa dondurulup çözündürülmesi ve ayrıca sonike edilmesi ile hazırlanmıştır. ELISA tekniğinde konjugat olarak peroksidazla işaretli tavşan anti-tavuk IgG leri (H + L) ve substrat olarak da 5-aminosalisilik asit + hidrojen peroksit kullanılmıştır. Çalışmada, incelenen 900 serum örneğinden 543 adedi (% 60.33) ELISA ile pozitif, 357 adedi (% 39.67) ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda ise ELISA tekniğinin SPA testine göre spesifitesi % 92.64, sensitivitesi, % 31.09, HI testine göre spesifitesi % 99.75 ve sensitivitesi de % 25.30 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, araştırmacıların yaptıkları çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, broyler, yumurtacı ve damızlık işletmelere ait 900 serumun SPA, HI, AGP ve ELISA ile *M. gallisepticum* yönünden incelenmesinde en duyarlı yöntem ELISA bulunmuştur. Ancak, uygulanabilirliği ve ekonomik olması nedeniyle SPA testi tarama testlerinin vazgeçilmez bir yöntemi olmaktadır. Sadece non-spesifik reaksiyonlar açısından çalışmada alınan sonuçlara göre % 5 gibi bir yanlış pozitifliğe sebep olan bu testin yanısıra, yine laboratuvarlarda uygulanması oldukça basit ve kısa sürede sonuç veren HI testinin bir tamamlayıcı test olarak kullanılmasında büyük yarar vardır. AGP testinin bir sürü tarama

testinden ziyade CRD konusunda yapılacak deneysel araştırmalarda antikorların saptanmasında daha duyarlı olacağı düşüncesi hakim olmuştur. Çalışmada, her 3 testle ayrı ayrı karşılaştırılan ELISA, pahalı ve zaman alıcı olması gibi nedenlerle saha taramaları için her ne kadar uygun görünmüyorsa da, kullanılan spesifik IgG ler nedeniyle, M. gallisepticum antikorlarının saptanmasında oldukça spesifik bir test olması nedeniyle, oldukça güvenilir bir test olduğu anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen bulgular SPA, HI ve ELISA tekniklerinin M. gallisepticum infeksiyonlarında serolojik taramalarda gayet iyi sonuçlar verdiklerini göstermiştir. Ancak, bundan sonraki yapılacak çalışmalarda mezbahadan sağlanacak serumların yanısıra belli bir periyod içinde işletmelerden alınacak serumlarda bu testlerin uygulanmasının, testlerin ,önemi ve güvenilirliği açısından önemli sonuçlar doğuracağı şüphesiz görülmektedir.

7. ÖZET

Bu çalışmada, konvansiyonel testlerle (SPA, HI, AGP) birlikte ELISA tekniğinin, tavuklarda Mycoplasma gallisepticum infeksiyonlarının serolojik tanısındaki rollerini belirlemek ve sonuçlarını karşılaştırmak amaçlandı.

ELISA tekniğinde M. gallisepticum S6 suşundan dondurulup çözdürülerek ve sonike edilerek parçalanan antijen, peroksidaz enzimi ile işaretli tavşan anti-tavuk IgG konjugatı ve 5-aminosalisilik asit + hidrojen peroksit substratı kullanıldı. Negatiflik eşiği 490 nm dalga boyunda optik dansite (OD) 0.24 olarak belirlendi.

SPA testinde, ticari boyalı CRD lam aglutinasyon antijeni kullanıldı ve sonuçlar 2 dakika içinde değerlendirildi. HI testi için, M. gallisepticum S6 suşundan hazırlanan antijenin titresini HA testi ile 1/128 olarak belirlendi ve HI testinde antijen 4 HA ünitesinde sulandırılarak kullanıldı. AGP testinde ise üretilen antijen dondurulup çözdürülerek ve sonike edilerek parçalandı.

Broyler, yumurtacı ve damızlık sürülerinden temin edilen toplam 900 adet tavuk serumunun tümü SPA, HI, AGP ve ELISA ile değerlendirildi. Sırasıyla 182 (% 20.22), 128 (% 14.22), 51 (% 5.67) ve 543 (% 60.35) pozitif serum saptandı. Buna göre, pozitifleri saptamada ELISA > SPA > HI > AGP sırası elde edildi.

Tavuklarda *M. gallisepticum* infeksiyonlarının serolojik teŖhisinde, konvansiyonel testlerin (SPA, HI, AGP) yanısıra, ELISA gibi oldukça duyarlı ve spesifik olan bir yntemin de kullanılması, infeksiyonun saptanmasında yararlı olacağı sonucuna varıldı.



8. SUMMARY

Detection of antibodies in chickens produced against *Mycoplasma gallisepticum* by different serological tests (SPA, HI, AGP, ELISA) and comparison of the results.

In this study, the aim was to show the reliability and accuracy of conventional tests (SPA, HI, AGP) together with ELISA in detecting *Mycoplasma gallisepticum* infections in chickens and to compare their results.

Freezed-thawed and sonicated antigen prepared from *M. gallisepticum* S6 strain, the peroxidase labelled rabbit antichickens IgG conjugate and 5-aminocsalycilic acid + hydrogen peroxide were used in ELISA. Negative treshold was determined as 0.24 optical density (OD) at 490 nm wavelength.

Commercial stained CRD serum plate agglutination antigen was used in SPA test and the results were read in two minutes. The HA titer of the antigen prepared from *M. gallisepticum* S6 strain was found to be 1/128 with HA test and 4 HA unit antigen was used in the HI test. The same antigen was freezedthawed and sonicated and subsequently used in the AGP test.

All of the 900 chicken sera obtained from broiler, layer and breeder flocks were evaluated with SPA, HI, AGP and ELISA. Among these sera 182 (20.22%), 128 (14.22%), 51 (5.67%)

and 543 (60.35 %) were found to be positive, respectively. Therefore, ELISA was found to be more sensitive in detecting antibodies than SPA, HI and AGP.

In detecting *M. gallisepticum* infections in chickens, the use of ELISA, which is a very sensitive test, together with other conventional tests, was found to be beneficial.



9. KAYNAKLAR

- 1- ADAIR, B.M., BURNS, K., McNULTY, M.S. and TODD, D.: A Study of ELISA Systems Incorporating Pooled Viral and Mycoplasma Antigen Preparations for Antibody Screening of Chicken Sera. Avian Pathol., 19:263-278, 1990.
- 2- ADLER, H.E.: Proc. Am. Vet., Med. Assoc., pp.346, 1954. In: HOFSTAD, M.S.: A Serological Study of Infectious Sinusitis in Turkeys. Avian Dis., 1:170-179, 1957.
- 3- ADLER, H.E.: A PPLO Slide Agglutination Test for the Detection of Infectious Sinusitis of Turkeys. Poult. Sci., 37: 1116-1123, 1958.
- 4- ADLER, H.E. and BERG J.: Cultivation of Mycoplasma of Avian Origin. Avian Dis., 4:3-12, 1960.
- 5- ADLER, H.E. and DaMASSA, A.J.: Enhancement of Mycoplasma Agglutination Titers by Use of Anti-Globulin. Proc. Soc. Exptl. Biol., 116:608-610, 1964
- 6- ADLER, H.E. and DaMASSA, A.J. : Antigenicity of Six Isolates of Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis., 9:205-211, 1965.
- 7- ADLER, H.E. and LAMAS DaSILVA, J.M.: Immunization against Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis., 14:763-769, 1970.
- 8- ADLER, H.E. and YAMAMOTO, R. : 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, 1956.
- 9- ADLER, H.E. and YAMAMOTO, R.: Studies on Chronic Coryza (Nelson) in the Domestic Fowl. Cornell Vet., 46:337-343, 1956.
- 10- ADLER, H.E. and YAMAMOTO, R.: Pathogenic and Nonpathogenic Pleuropneumonia-Like Organisms in Infectious Sinusitis of Turkeys. Am. J. Vet. Res., 18:655-656, 1957.
- 11- ADLER, H.E., DaMASSA, A. J. and SADLER, W.W.: Application of the Anti-Globulin Technique for the Detection of Mycoplasma gallisepticum Antibodies. Avian Dis., 8:576-579, 1964

- 12- ADLER, H.E., McMARTIN, D. and SHIFRINE, M.: Immunization against Mycoplasma Infections of Poultry. Am. J. Vet. Res., 21:482-485, 1960
- 13- ADLER, H.E., YAMAMOTO, R. and BANKOWSKI, R.A.: A Preliminary Report of Efficiency of Various Mediums for Isolation of Pleuropneumonia-Like Organisms from Exudates of Birds with Chronic Respiratory Disease. Am. J. Vet. Res., 15:463-465, 1954
- 14- ADLER, H.E., YAMAMOTO, R. and BERG, J.: Strain Differences of Pleuropneumonia-Like Organisms of Avian Origin. Avian Dis., 1:19-27, 1957.
- 15- ADLER, H.E., FABRICANT, J. and YAMAMOTO, R.: Symposium on Chronic Respiratory Diseases of Poultry. I. Isolation and Identification of Pleuropneumonia-Like Organisms of Avian Origin. Am. J. Vet. Res., 19:440-447, 1958
- 16- AFTOSMIS, J.G., TOUETRLLOTTE, M.E. and JACOBS, R.E.: A Sensitive Whole Blood Test for Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis., 4:486-491, 1960.
- 17- AHMAD, I., KLEVEN, S.H., GLISSON, J.R. and AVAKIAN, A.P.: Further Studies of Mycoplasma gallisepticum Serum Plate Agglutination Antigen Grown in Medium with Artificial Liposomes Substituting for Serum. Avian Dis., 33:140-149, 1989.
- 18- ANDO, K., MATSUI, K., SATO, S., YOSHIDA, I., KATO, K. and KUNIASU, C: Evaluation of Antigenicity of the Agglutination Antigen for Avian Respiratory Mycoplasmosis and Availability of the Antigen for the Field Test. Nat. Inst. Anim. Hith. Quart., 5:13-19, 1965.
- 19- ANONİM: Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying Avian Pathogens. National Academy of Science. Washington, D.C., 1971.
- 20- ANONİM: Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerin Sağlık Kontrol Yönetmeliği. Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Lalahan-Ankara, 1990.
- 21- ANSARI, A.A. TAYLOR, R.F. and CHANG, T.S.: Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibody to Mycoplasma gallisepticum Infections in Poultry. Avian Dis., 27:21-35, 1983.
- 22- ARDA, M., MİMBAY, A., AYDIN, N., AKAY, Ö. ve İZGÜR, M.: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Pfizer İlaçları A.Ş., Ortaköy-İstanbul, 1990.

- 23- AVAKIAN, A.P. and KLEVEN, S.H.: Evaluation of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Purified Proteins of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* as Antigens in a Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Avian Dis.*, 34:575-584, 1990.
- 24- AYCARDI, E.R., ANDERSON, D.P. and HANSON R.P.: Classification of Avian Mycoplasmas by Gel-Diffusion and Growth-Inhibition Tests. *Avian Dis.*, 15:434-447, 1971.
- 25- BARBER, C.W.: The Lymphofollicular Nodules in Turkey Tissues Associated with *Mycoplasma gallisepticum* Infection. *Avian Dis.*, 6:289-296, 1962.
- 26- BARBER, C.W.: An Evaluation of PPLO Agglutination Antigens for the Detection of PPLO Agglutinins in Turkey Sera. *Avian Dis.*, 6:349-358, 1962.
- 27- BARNES, L.E., OSE, E.E. and GOSSETT, F.O.: Treatment of Experimental Infectious Sinusitis of Turkeys with Erythromycin. *Avian Dis.*, 4:176-187, 1960.
- 28- BARNES, L.E., OSE, E.E. and GOSSETT, F.O.: Treatment of Experimental PPLO Infections in Young Chickens with Tylosin, a New Antibiotic. *Poult. Sci.*, 39:1376-1381, 1960.
- 29- BENCINA, D., TADINA, T. and DORRER, D.: Natural Infection of Ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma* Egg Transmission. *Avian Pathol.*, 17:441-449, 1988.
- 30- BENCINA, D., TADINA, T. and DORRER, D.: Natural Infection of Geese with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and Egg Transmission of the Mycoplasmas. *Avian Pathol.*, 17:925-928, 1988.
- 31- BENTON, W.J., COVER, M.S. and MELCHIOR, F.W.: *Mycoplasma gallisepticum* in a Commercial Laryngotracheitis Vaccine. *Avian Dis.*, 11:426-429, 1967.
- 32- BOYER, C.I., FABRICANT, J. and BROWN, J.A.: Non-Specific Plate Agglutination Reactions with PPLO Antigen. *Avian Dis.*, 4:546-547, 1960.
- 33- BRADBURY, J.M. and JORDAN, F.T.W.: The Influence of pH of the Culture Medium on the Sensitivity of *Mycoplasma gallisepticum* Antigens for Use in Certain Serological Tests. *J. Hyg. Camb.*, 69:593-607, 1971.

- 34- BRADBURY, J.M. and JORDAN, F.T.W.: Non-Specific Agglutination of *Mycoplasma gallisepticum*. *Vet. Rec.*, 92:591-592, 1973.
- 35- BRADBURY, J.M. and KLEVEN, S.H.: Avian Mycoplasmas: Detection and Control Update. *Isr. J. Med. Sci.*, 23:771-772, 1987.
- 36- BRADBURY, J.M., McCARTHY, J.D. and METWALI, A.Z.: Micro-Immunofluorescence for the Serological Diagnosis of Avian *Mycoplasma* Infections. *Avian Pathol.*, 19:213-222, 1990.
- 37- CALNEK, B.W. and LEVINE, P.P.: Studies on Experimental Egg Transmission of Pleuropneumonia-Like Organisms in Chickens. *Avian Dis.*, 1:208-222, 1957.
- 38- CHALQUEST, R.R. and FABRICANT, J.: Survival of PPLO Injected into Eggs Previously Dipped in Antibiotic Solutions. *Avian Dis.*, 3:257-271, 1959.
- 39- CHALQUEST, R.R. and FABRICANT, J.: Pleuropneumonia-Like Organisms Associated with Synovitis in Fowls. *Avian Dis.*, 4:514-539, 1960.
- 40- CHANDIRAMANI, N.K., VAN ROEKEL, H. and OLESIUK, O.M.: Viability Studies with *Mycoplasma gallisepticum* Under Different Environmental Conditions. *Poult. Sci.*, 45:1029-1044, 1966.
- 41- CHU, H.P.: Differential Diagnosis and Control of Respiratory Diseases of Poultry. *Vet. Rec.*, 70:1064-1078, 1958.
- 42- CHUTE, H.L. and COLE, C.R.: Lesions in Chicken Embryos Produced by Pleuropneumonia-Like Organisms from Chronic Respiratory Disease of Chickens and Infectious Sinusitis of Turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 15:108-118, 1954.
- 43- CORSTVET, R.E. and SADLER, W.W.: A Comparative Study of Single and Multiple Respiratory Infections in the Chicken: Multiple Infections (with *Mycoplasma gallisepticum*, Newcastle Disease Virus, and Infectious Bronchitis Virus). *Am. J. Vet. Res.*, 27:1703-1720, 1966.
- 44- COTTEW, G.S.: *Aust. Vet. J.*, 32:249-251, 1956. In: YODER, H.W.Jr.: Avian Mycoplasmosis. In: HOFSTAD, M.S., BARNES, H.J., CALNEK, B.W., REID, W.M. and YODER, H.W.Jr.: *Diseases of Poultry*. 8th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. pp.187-220, 1984.

- 45- COVER, M.S. and WALLER, E.F.: The Presence of Chronic Respiratory Disease in Pipped Eggs. *Am. J. Vet. Res.*, 15:119-121, 1954.
- 46- CRAWLEY, J.F. and FAHEY, J.E.: A Proposed Plan for the Control of Chronic Respiratory Disease of Chickens. *Poult. Sci.*, 34:707-716, 1955.
- 47- CRAWLEY, J.F. and FAHEY, J.E.: The Use of the Hemagglutination-Inhibition Test for the Control of PPLO Infection in Poultry. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 130:187-190, 1957.
- 48- CULLEN, G.A. and ANDERTON, M.F.: Comparative Efficiency of Some Rapid Agglutination Antigens for *Mycoplasma gallisepticum* Infection. *Avian Pathol.*, 3:89-103, 1974.
- 49- CULLEN, G.A. and SNELL, G.C.: A Cell-Free Haemagglutinating Antigen of *Mycoplasma synoviae* and its Use in Haemagglutination-Inhibition Test. *J. Biol. Stan.*, 4:203-207, 1976.
- 50- CULLEN, G.A. and TIMMS, L.: Diagnosis of *Mycoplasma* Infections in Poultry Previously Vaccinated with Killed Adjuvant Vaccines. *Bri. Vet. J.*, 128:94-100, 1972.
- 51- CULLEN, G.A., ANDERTON, M.F., GIBBS, D.F. and HOPKINS, I.: Automation of the Rapid Slide Agglutination Test for *M. gallisepticum* Infection in Chickens. *Vet. Rec.*, 95:396-397, 1974.
- 52- DELAPLANE, J.P.: *Cornell Vet.*, 38:192-194, 1948. In: CHUTE, H.L. and COLE, C.R.: Lesions in Chicken Emryos Produced by Pleuropneumonia-Like Organisms from Chronic Respiratory Disease of Chickens and Infectious Sinusitis of Turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 15:108-118, 1954.
- 53- DELAPLANE, J.P. and STUART, H.O.: *Am. J. Vet. Res.*, 4:325-332, 1943. In: YODER, H.W.Jr.: Avian Mycoplasmosis. In: HOFSTAD, M.S., BARNES, H.J., CALNEK, B.W., REID, W.M. and YODER, H.W.Jr.: *Diseases of Poultry*. 8th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. pp.187-220, 1984.
- 54- DICKINSON, E.M. and HINSHAW, W.R.: Treatment of Infectious Sinusitis of Turkeys with Argyrol and Silver Nitrate. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 93:151-156, 1938.

- 55- DIERKS, R.E., NEWMAN, J.A. and POMEROY, B.S.: Characterization of Avian Mycoplasma. Ann. N.Y. Acad.Sci., 143:170-189, 1967.
- 56- DODD, S.: J. Comp. Path. Thera., 18:239-245, 1905. In: YODER, H.W.Jr.: Avian Mycoplasmosis. In: HOFSTAD, M.S., BARNES, H.J., CALNEK, B.W., REID, W.M. and YODER, H.W.Jr.: Diseases of Poultry. 8th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. pp.187-220, 1984.
- 57- DOMERMUTH, C.H.: Antibiotic Resistance and Mutation Rates of Mycoplasmas. Avian Dis., 4:456-466, 1960.
- 58- DOMERMUTH, C.H.: Experimental Production of "Breast Blisters" by S-6 Type Mycoplasma. Avian Dis., 6:135-140, 1962.
- 59- DOMERMUTH, C.H.: Vaccination of Chickens with Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis., 6:412-419, 1962.
- 60- DOMERMUTH, C.H. and GROSS, W.B.: The Production of Salpingitis of Chickens by Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis., 6:499-505, 1962.
- 61- DOMERMUTH, C.H. and JOHNSON, E.P.: An in Vitro Comparison of Some Antibacterial Agents on a Strain of Avian Pleuropneumonia-Like Organism. Poult. Sci., 34:1395-1399, 1955.
- 62- DROTT, J.H., VARDAMAN, T.H. and LOTT, B.D.: Effect of Sex and Mycoplasma synoviae Infections on Chicken Red Blood Cells Used for Hemagglutination-Inhibition Test. Poult. Sci., 59:1548-1549, 1980.
- 63- DUTTA, S.K., DIERKS, R.E. and POMEROY, B.S.: Electron Microscopic Studies of the Morphology and the Stages of Development of Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis., 9:241-251, 1965.
- 64- EDWARD, D.G.: J. Gen. Microbiol., 1:238-243, 1947. In: ADLER, H.E. and YAMAMOTO, R.: 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, 1956.
- 65- EDWARD, D.G. and FREUNDT, E.A.: J. Gen. Microbiol., 14:197-207, 1956. In: STIPKOVITS, L. and EL-EBEEDY, A.A.: Biochemical and Serological Studies of Avian Mycoplasmas. Zbl. Vet. Med. B, 24:218-230, 1977.

- 66- EDWARD, D.G. and KANAREK, A.D.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 79:696-702; 1960. In: STIPKOVITS, L. and EL-EBEEDY, A.A.: Biochemical and Serological Studies of Avian Mycoplasmas. Zbl. Vet. Med. B, 24:218-230, 1977.
- 67- ERDAĞ, O. ve TÜRKASLAN, J.: Kanatlı Mikoplazmalarında Laboratuvar Teşhis Yöntemleri. Pendik Hay. Hast. Merk. Araş. Enst. Derg., 19:85-97, 1988.
- 68- FABRICANT, J.: Serological Studies of Avian Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLo) with Edward's Technique. Avian Dis., 4:505-514, 1960.
- 69- FABRICANT, J. and LEVINE, P.P.: Experimental Production of Complicated Chronic Respiratory Disease Infections (Air Sac Disease). Avian Dis., 6:13-23, 1962.
- 70- FABRICANT, C.G., VAN DEMARK, P.J. and FABRICANT, J.: The Effect of Atmospheric Environment upon the Growth of Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis., 6: 328-332, 1962.
- 71- FAHEY, J.E.: A Hemagglutination-Inhibition Test for Infectious Sinusitis of Turkeys. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 36:38-40, 1954.
- 72- FAHEY, J.E.: Chronic Respiratory Disease of Ducks. Poult. Sci., 34:397-399, 1955.
- 73- FAHEY, J.E. and CRAWLEY, J.F.: Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. III. Egg Transmission of a Pleuropneumonia-Like Organism. Can. J. Comp. Med., 18:67-75, 1954.
- 74- FAHEY, J.E. and CRAWLEY, J.F.: Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. IV. A Hemagglutination Inhibition Diagnostic Test. Can. J. Comp. Med., 18:264-272, 1954.
- 75- FAHEY, J.E. and CRAWLEY, J.F.: Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. V. Air-Borne Spread of the CRD Agent. Can. J. Comp. Med., 19:53-56, 1955.
- 76- FAHEY, J.E. and CRAWLEY, J.F.: Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. VI. The Effects of Antibiotics on the Clinical and Serological Course of CRD. Can. J. Comp. Med., 19:281-285, 1955.
- 77- FAHEY, J.E. and CRAWLEY, J.F.: Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. VII. The Nature of Infection with the Pleuropneumonia-Like Organisms. Can. J. Comp. Med., 20:7-19, 1956.

- 78- FREY, M.L., HANSON, R.P. and ANDERSON, D.P.: A Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*, 29:2163-2171, 1968.
- 79- GENTRY, R.F.: Survival of Mycoplasma in Broth and Semi-Solid Media. *Avian Dis.*, 4:436-443, 1960.
- 80- GIANFORTE, E.M., JUNGHER, E.L. and JACOBS, R.E.: A Serologic Analysis of Seven Strains of Pleuropneumonia-Like Organisms from Air Sac Infection in Poultry. *Poult. Sci.*, 34:662-669, 1955.
- 81- GLAVITS, R., SANTHA, M., RATZ, F., MOLNAR, E. and STIPKOVITS, L.: Pathological and Immunological Studies on Chicken Embryos and Day-Old Chicks Experimentally Infected with Mycoplasma gallisepticum. *Acta Vet. Hun.*, 34:189-200, 1986.
- 82- GOREN, E.: Haemadsorption-Inhibition Test for the Identification of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae. *Vet. Quart.*, 1:3-7, 1979.
- 83- GROSS, W.B.: Symposium on Chronic Respiratory Disease of Poultry. II. The Role of Escherichia coli in the Cause of Chronic Respiratory Disease and Certain Other Respiratory Diseases. *Am. J. Vet. Res.*, 19:448-452, 1958.
- 84- GROSS, W.B. and JOHNSON, E.P.: Effect of Drugs on the Agents Causing Infectious Sinusitis of Turkeys and Chronic Respiratory Disease (Air-Sac Infection) of Chickens. *Poult. Sci.*, 32:260-263, 1953.
- 85- GROUPE, V. and WINN, J.D.: *J. Bact.*, 57:515-528, 1949. In: WONG, S.C. and JAMES, C.G.: The Susceptibility of the Agents of Chronic Respiratory Disease of Chickens and Infectious Sinusitis of Turkeys to Various Antibiotics. *Poult. Sci.*, 32:589-593, 1953.
- 86- GROUPE, V., WINN, J.D. and JUNGHER, E.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 67:397-398, 1948. In: CHUTE, H.L. and COLE, C.R.: Lesions in Chicken Embryos Produced by Pleuropneumonia-Like Organisms from Chronic Respiratory Disease of Chickens and Infectious Sinusitis of Turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 15:108-118, 1954.
- 87- HALL, C.F.: Mycoplasma gallisepticum Antigen Production. *Avian Dis.*, 6:359-362, 1962.
- 88- HALL, C.F., FLOWERS, A.I. and GRUMBLES, L.C.: Dipping of Hatching Eggs for Control of Mycoplasma gallisepticum. *Avian Dis.*, 7:178-183, 1963.

- 89- HALL, C.F., MOORE, R.W. and GRUMBLES, L.C.: Eradication of Infectious Sinusitis in a Hatchery Operation by Serological Testing. *Avian Dis.*, 5:168-177, 1961.
- 90- HEISHMAN, J.O., OLSON, N.O. and CUNNINGHAM, C.J.: Control of Chronic Respiratory Disease. IV. The Effect of a Low-Calcium Diet and High Concentrations of Chlortetracycline on the Isolation of Mycoplasma from Experimentally Infected Chicks. *Avian Dis.*, 6:165-170, 1962.
- 91- HEISHMAN, J.O., OLSON, N.O. and SHELTON, D.C.: Control of Chronic Respiratory Disease. II. The Effect of Low Calcium Diet, Therephtalic Acid and Chlortetracycline. *Avian Dis.*, 4:413-418, 1960.
- 92- HEITMAN, V.J., KIRCHOFF, H., WEIGT, U., LINDENA, J., DUBENKROPP, H. und SCHMIDT, R.: Mycoplasma-bovis-Infektion in einem Rinderbestand. 3.Mitteilung: Serologische Untersuchung auf Antikörper gegen Mycoplasma bovis. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 96:43-48, 1983.
- 93- HITCHNER, S.B.: The Pathology of Infectious Sinusitis of Turkeys. *Poult. Sci.*, 28:106-118, 1949.
- 94- HOFSTAD, M.S.: Egg Transmission of Infectious Sinusitis of Turkeys. *Avian Dis.*, 1:165-170, 1957.
- 95- HOFSTAD, M.S.: A Serological Study of Infectious Sinusitis in Turkeys. *Avian Dis.*, 1:170-179, 1957.
- 96- HOFSTAD, M.S. and DOERR, L.: A Chicken Meat Infusion Medium Enriched with Avian Serum for Cultivation of an Avian Pleuropneumonia-Like Organism, Mycoplasma gallinarum. *Cornell Vet.*, 46:439-446, 1956.
- 97- HROMATKA, L. and ADLER, H.E.: Effects of pH, Physical Factors and Preservatives on the Sensitivity of Mycoplasma gallisepticum Slide Agglutination Antigens. *Avian Dis.*, 13:452-461, 1969.
- 98- IMADA, Y., NONOMURA, I. and FUTURA, K.: Indirect Immunoperoxidase Technique for the Assay of Antibodies against Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae in Chicken Serum. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 22: 16-22, 1982.
- 99- IMADA, Y., NONOMURA, I., HAYASHI, S. and TSURUBUCHI, S.: Immunoperoxidase Technique for Identification of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 19:40-46, 1979.

- 100- JOHNSON, E.P.: Broiler Grow., 2:12-26, 1949. In: WONG, S.C. and JAMES, C.G.: The Susceptibility of the Agents of Chronic Respiratory Disease of Chickens and Infectious Sinusitis of Turkeys to Various Antibiotics. *Poult. Sci.*, 32:589-593, 1953.
- 101- JORDAN, F.T.W.: Avian Mycoplasmosis and Requirements for its Control and Eradication. *Poultry Diseases in the Near East. Fac. Agr. Univ. Jordan, Amman, Food Agr. Org. U.N., Rome, 1984.*
- 102- JORDAN, F.T.W.: Gordon Memorial Lecture: People, Poultry and Pathogenic Mycoplasmas. *Bri. Poult. Sci.*, 26: 1-15, 1985.
- 103- JORDAN, F.T.W. and KULASEGARAM, P.: Non-Specific Antibodies in Chickens Inoculated Intratracheally with *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Comp.Path.*, 78:407-414, 1968.
- 104- JORDAN, F.T.W., RASHID, R.A. and UTHMAN, A.U.: The Recovery of *Mycoplasma* from the Avian Oesophagus. *Vet. Rec.*, 102:403-404, 1978.
- 105- JORDAN, F.T.W., YAVARI, C. and KNIGHT, D.L.: Some Observations on the Indirect ELISA for Antibodies to *Mycoplasma iowa* Serovar I in Sera from Turkeys Considered to be Free from *Mycoplasma* Infections. *Avian Pathol.*, 16:307-318, 1987.
- 106- JUNGHERR, E.: The Pathology of Experimental Sinusitis of Turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 10:372-382, 1949.
- 107- JUNGHERR, E.L.: Symposium on Chronic Respiratory Diseases of Poultry. IV. The Control of Chronic Respiratory Disease. *Am. J. Vet. Res.*, 19:464-467, 1958.
- 108- KAHANE, I. and RAZIN, S.: Immunological Analysis of *Mycoplasma* Membranes. *J. Bact.*, 100:187-194, 1969.
- 109- KELTON, W.H. and VAN ROEKEL, H.: Serological Studies of *Mycoplasma* (PPLO) of Avian Origin. *Avian Dis.*, 7:272-286, 1963.
- 110- KEYMER, I.F.: Infectious Sinusitis of Pheasants and Partridges. *Vet. Rec.*, 73:1034-1038, 1961.
- 111- KHAN, M.I., KIRKPATRICK, B.C. and YAMAMOTO, R.: A *Mycoplasma gallisepticum* Strain-Specific DNA Probe. *Avian Dis.*, 31:907-909, 1987.

- 112- KHAN, M.I., LAM, K.M. and YAMAMOTO, R.: Mycoplasma gallisepticum Strain Variations Detected by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Avian Dis., 31:315-320, 1987.
- 113- KLECKNER, A.L.: Serotypes of Avian Pleuropneumonia-Like Organisms. Am. J. Vet. Res., 21:274-280, 1960.
- 114- KLEVEN, S.H. and SOLIMAN, A.: Mycoplasmosis-Testing and Detection. Poultry Disease Conference. Feb29-Mar2, 1988, Davis, California.
- 115- KLEVEN, S.H., MORROW, C.J. and WHITHEAR, K.G.: Comparison of Mycoplasma gallisepticum Strains by Hemagglutination-Inhibition and Restriction Endonuclease Analysis. Avian Dis., 32:731-741, 1988.
- 116- KOSHIMIZU, K., MAGARIBUCHI, T., TANABE, K. and KONO, N.: Isolation and Characterization of Mycoplasmas from Gallinaceous Birds. Jap. J. Vet. Sci., 40: 445-449, 1978.
- 117- KUMAR, S., DIERKS, R.E., NEWMAN, J.A., PFOW, C.J. and POMEROY, B.S.: Airsacculitis in Turkeys. I. A Study of Airsacculitis in Day-Old Poults. Avian Dis., 7: 376-385, 1963.
- 118- KUNIYASU, C. and ANDO, K.: Studies on the Hemagglutination-Inhibition Test for Mycoplasma gallisepticum Infection of Chickens. Nat.Inst. Anim. Hlth. Quart., 6:136-143, 1966.
- 119- KUNIYASU, C. and YOSHIDA, Y.: Cold Hemagglutinin in Serum of Chicken Infected with Mycoplasma gallisepticum. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 12:69-73, 1972.
- 120- KUNIYASU, C., MATSUI, K., ANDO, K. and YOSHIDA, T.: Serological Responses of Chickens Naturally Infected with Mycoplasma gallisepticum and the Effect of Tylosin on these Responses. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 7:57-64, 1967.
- 121- LECCE, J.G. and SPERLING, F.G.: Chronic Respiratory Disease. I. The Isolation of Pleuropneumonia-Like Organisms as a Diagnostic Aid. Cornell Vet., 44: 441-448, 1954.
- 122- LEVINE, P.P. and FABRICANT, J.: Effect of Dipping Eggs in Antibiotic Solutions on PPLO Transmission in Chickens. Avian Dis., 6:72-85, 1962.

- 123- LEVISOHN, S., HYMAN, H., PERELMAN, D. and RAZIN, S.: The Use of Specific DNA Probe for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Field Outbreaks. *Avian Pathol.*, 16:535-541, 1989.
- 124- LIN, M.Y. and KLEVEN, S.H.: Egg Transmission of Two Strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Chickens. *Avian Dis.*, 26:487-495, 1982.
- 125- LIN, M.Y. and KLEVEN, S.H.: Cross-Immunity and Antigenic Relationships Among Five Strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Young Leghorn Chickens. *Avian Dis.*, 26:496-507, 1982.
- 126- LIN, M.Y. and KLEVEN, S.H.: Evaluation of the Microagglutination Test in the Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in the Chickens. *Avian Dis.*, 28:289-294, 1983.
- 127- MADDEN, D.L., HENDERSON, W.H. and MOSES, H.E.: Case Report: Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from Bobwhite Quail (*Colinus virginianus*). *Avian Dis.*, 11:378-380, 1967.
- 128- MALINSON, E.T. and ROSENSTEIN, M.: Case Report: Clinical, Cultural and Serologic Observations of Avian Mycoplasmosis in Two Chicken Breeder Flocks. *Avian Dis.*, 20:211-215, 1975.
- 129- MARKHAM, F.S. and WONG, S.C.: Pleuropneumonia-Like Organisms in the Etiology of Turkey Sinusitis and Chronic Respiratory Disease of Chickens. *Poult. Sci.*, 31:902-904, 1952.
- 130- MATSUO, K., KUNIYASU, C., YAMADA, S., SUSUMI, S. and YAMAMOTO, S.: Suppression of Immunoresponses to *Haemophilus gallinarum* with Nonviable *Mycoplasma gallisepticum* in Chickens. *Avian Dis.*, 22:552-561, 1978.
- 131- MOHAMMED, H.O., McMARTIN, D.A., CARPENTER, T.E. and YAMAMOTO, R.: Evaluation of an Approach for Eradication of *Mycoplasma gallisepticum* from an Endemically Infected Multiple-Age Layer Operation. Poultry Disease Conference. Feb29-Mar2, 1988, Davis, California.
- 132- MOULTHROP, I.M.: A Report on Broilers from Parents Free of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 6:161-164, 1962.

- 133- MOULTON, J.E. and ADLER, H.E.: Pathogenesis of Arthritis in Chicken Embryos Caused by a Pleuropneumonia-Like Organism. *Am. J. Vet. Res.*, 18:731-734, 1957.
- 134- NEHAY, J., ADLER, H.E. and FARVER, T.: A Comparison of Three Antigens for Detection of Agglutinins in Pullets Vaccinated with an Attenuated *Mycoplasma gallisepticum* Culture. *Avian Dis.*, 23:434-441, 1978.
- 135- NELSON, J.B.: Studies on an Uncomplicated Coryza of the Domestic Fowl. V. A Coryza of Slow Onset. *J. Exptl. Med.*, 63:509-513, 1936.
- 136- NELSON, J.B.: Studies on an Uncomplicated Coryza of the Domestic Fowl. VI. Coccobacilliform Bodies in Birds Infected with the Coryza of Slow Onset. *J. Exptl. Med.*, 63:515-522, 1936.
- 137- NELSON, J.B.: The Nasal Transmission of Pleuropneumonia-Like Organisms in Mice and Rats. *J. Exptl. Med.*, 69:169-176, 1939.
- 138- NELSON, J.B.: Association of a Special Strain of Pleuropneumonia-Like Organisms with Conjunctivitis in a Mouse Colony. *J. Exptl. Med.*, 91:309-320, 1950.
- 139- NEWNHAM, A.G.: The Haemagglutination-Inhibition (HI) Test and a Study of its Use in Experimental Avian Respiratory Mycoplasmosis. *Res. Vet. Sci.*, 5: 245-255, 1964.
- 140- NONOMURA, I. and YODER, H.W.Jr.: Identification of Avian *Mycoplasma* Isolates by the Agar-Gel Precipitin Test. *Avian Dis.*, 21:370-381, 1977.
- 141- OLESIUK, O.M. and VAN ROEKEL, H.: Transmission of Chronic Respiratory Disease in Chickens. *Avian Dis.*, 4:348-368, 1960.
- 142- OLSON, N.O., HEISHMAN, J.O. and SHELTON, D.C.: Control of Chronic Respiratory Disease. III. Isolation of *Mycoplasma* as Influenced by Potentiated Chlortetracycline and Time Interval After Exposure. *Avian Dis.*, 4:419-428, 1960.
- 143- OLSON, N.O., HEISHMAN, J.O. and SHELTON, D.C.: Control of Chronic Respiratory Disease. V. Artificial Exposure of Young Chicks to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 6:171-177, 1962.

- 144- OLSON, N.O., ADLER, H.E., DaMASSA, A.J. and CORSTVET, R.E.: The Effect of Intranasal Exposure to *Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis on Development of Lesions and Agglutinins. *Avian Dis.*, 8:623-631, 1964.
- 145- OLSON, N.O., HASH, T.R., HEISHMAN, J.O. and CAMPBELL, A.: Dipping of Hatching Eggs in Erythromycin for the Control of *Mycoplasma*. *Avian Dis.*, 6:191-194, 1962.
- 146- OPITZ, H.M., DUPLESSIS, J.B. and CYR, M.J.: Indirect Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *M. gallisepticum*. *Avian Dis.*, 27:773-786, 1983.
- 147- OSBORN, O.H. and POMEROY, B.S.: Symposium on Chronic Respiratory Diseases of Poultry. V. Infectious Sinusitis of Turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 19:468-472, 1958.
- 148- OSE, E.E., WELLENREITER, R.H. and TONKINSON, L.V.: Effects of Feeding Tylosin to Layers Exposed to *Mycoplasma gallisepticum*. *Poult. Sci.*, 58:42-49, 1979.
- 149- OSTERHOUT, S.: *Mycoplasma*. In: JOKLIK, W.K., WILLETT, H.P. and AMOS, D.B.: *Zinsser Microbiology*. 18th ed., Appleton-Century-Crofts/Norwalk, Connecticut. pp. 793-798, 1984.
- 150- PATTEN, B.E., HIGGINS, P.A. and WHITHEAR, K.G.: A Urease-ELISA for the Detection of *Mycoplasma* Infections in Poultry. *Aust. Vet. J.*, 61:151-155, 1984.
- 151- PIELA, T.H., GULKA, C.M., YATES, V.J. and CHANG, P.W.: Use of Egg Yolk in Serological Tests (ELISA and HI) to Detect Antibodies to Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 28:877-883, 1984.
- 152- RAZIN, S. and FREUNDT, E.A.: The *Mycoplasmas*. In: KRIEG, N.R. and HOLT, J.G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore/London. pp. 740-793, 1984.
- 153- REAGAN, R.L., DAY, W.C. and BRUECKNER, A.L.: Electron Microscopy Studies of Four Strains of Chronic Respiratory Agent. *Poult. Sci.*, 32:960-965, 1953.
- 154- REAGAN, R.L., PORTER, J.E., DELAHA, E.C., COOK, S.R. and BRUECKNER, A.L.: Electron Microscopy of Erythrocytes from Chickens Affected with Chronic Respiratory Disease. *Poult. Sci.*, 34:103-106, 1955.

- 155- ROBERTS, D.H.: The Inactivation of Mycoplasma by Beta-Propiolactone. Bri. Vet. J., 120:479-480, 1964.
- 156- ROBERTS, D.H.: Serotypes of Avian Mycoplasma. J. Comp. Path. Thera., 74:447-456, 1964.
- 157- ROBERTS, D.H.: The Isolation of an Influenza A Virus and a Mycoplasma Associated with Duck Sinusitis. Vet. Rec., 76:470-473, 1964.
- 158- ROBERTS, D.H.: Experimental Infection of Chickens with Mycoplasma gallisepticum and Subsequent Re-isolation of the Organism from the Body Tissues. Vet. Rec., 76:798-801, 1964.
- 159- ROBERTS, D.H.: Immunological Aspects of Infectious Sinusitis in Turkeys. Vet. Rec., 76:1200-1202, 1964.
- 160- ROBERTS, D.H. Methods of Eradication of Mycoplasma gallisepticum from Chickens. The Veterinarian. 5: 259-263, 1968.
- 161- ROBERTS, D.H.: Serological Response Produced in Chickens by Three Strains of Mycoplasma gallisepticum. J. Appl. Bact., 32:395-401, 1969.
- 162- ROBERTS, D.H.: Non-specific Agglutination Reactions with Mycoplasma gallisepticum Antigens. Vet. Rec., 87: 125-126, 1970.
- 163- ROBERTS, D.H. and OLESIUK, O.M.: Immunological Competence of the Chicken Embryo and Neonatal Chicken to Mycoplasma gallisepticum. J. Infect. Dis., 116:490-494, 1966.
- 164- ROBERTS, D.H. and OLESIUK, O.M.: Serological Studies with Mycoplasma synoviae. Avian Dis., 11:104-109. 1967.
- 165- ROEPKE, W.J.: Mycoplasma gallisepticum. Its Control and Eradication in the Netherlands. Bull. Off. Int. Epiz., 72:431-457, 1969.
- 166- SAHU, S.P. and OLSON, N.O.: Hemagglutination-Inhibition Versus Serum Plate Agglutination in Detecting Mycoplasma gallisepticum in Broiler Flocks. Avian Dis., 19:370-374, 1974.
- 167- SAHU, S.P. and OLSON, N.O.: Evaluation of Broiler Breeder Flocks for Non-specific Mycoplasma synoviae Reaction. Avian Dis., 20:49-64, 1967.

- 168- SAHU, S.P. and OLSON, N.O.: Use of the Agar-Gel Precipitin Test to Evaluate Broiler Breeder and Commercial Layer Flocks for *Mycoplasma gallisepticum* Infection. *Avian Dis.*, 20:563-573, 1976.
- 169- SHIMIZU, T. and NAGATOMO, H.: An Adhesion-Hemadsorption Test for Screening and Identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Jap. J. Vet. Sci.*, 51:206-208, 1988.
- 170- SHIMIZU, T., NUMANO, K. and UCHIDA, K.: Isolation and Identification of Mycoplasmas from Various Birds: An Ecological Study. *Jap. J. Vet. Sci.*, 41:273-282, 1979.
- 171- SHIMIZU, T., TAKAHATA, T. and KATO, M.: Detection of Serum Antibodies against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by a Dot-Immunobinding Technique. *Jap. J. Vet. Sci.*, 52:191-197, 1990.
- 172- SNELL, G.C. and CULLEN, G.A.: An Evaluation of Rapid Serum Agglutination and Haemagglutination-Inhibition Tests for Mycoplasmosis in Turkeys. *Br. Vet. J.*, 134:198-204, 1978.
- 173- SOERIPTO, WHITHEAR, K.G., COTTEW, G.S. and HARRIGAN, K.E.: Virulence and Transmissibility of *Mycoplasma gallisepticum*. *Aust. Vet. J.*, 66:65-72, 1989.
- 174- SOERIPTO, WHITHEAR, K.G., COTTEW, G.S. and HARRIGAN, K.E.: Immunogenicity of *Mycoplasma gallisepticum*. *Aust. Vet. J.*, 66:73-77, 1989.
- 175- STIPKOVITS, L.: The Pathogenicity of Avian Mycoplasmas. *Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig. A*, 245:171-183, 1979.
- 176- STIPKOVITS, L.: Limit *Mycoplasma* Infections with Good Hygiene. *Misset Int. Poult.*, 6:30-32, 1990.
- 177- STIPKOVITS, L. and EL-EBEEDY, A.A.: Biochemical and Serological Studies of Avian Mycoplasmas. *Zbl. Vet. Med. B*, 24:218-230, 1977.
- 178- STUART, E.E. and BRUINS, H.W.: Pre-incubation Immersion of Eggs in Erythromycin to Control Chronic Respiratory Disease. *Avian Dis.*, 7:287-293, 1963.
- 179- SULLIVAN, J.F., GILL, E., SOMER, A. and HEDDLESTON, K.: Laboratory Analysis of Several Field Outbreaks of Chronic Respiratory Disease. *Avian Dis.*, 1:94-100, 1957.

- 180- TAJIMA, M., YAGAHASHI, T. and MIKI, J.: Capsular Material of *Mycoplasma gallisepticum* and its Possible Relevance to the Pathogenic Process. *Infect. Immun.*, 36:830-833, 1982.
- 181- TALKINGTON, F.D., KLEVEN, S.H. and BROWN, J.: An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in Experimentally Infected Chickens. *Avian Dis.*, 29: 53-70, 1985.
- 182- TAYLOR, J.R.E., FABRICANT, J. and LEVINE, P.P.: A Comparison of Four in Vitro Methods for the Isolation of the Pleuropneumonia-Like Organism of Chronic Respiratory Disease from Tracheal Exudate. *Avian Dis.*, 1:101-104, 1957.
- 183- THOMAS, G.B. and DIERKS, R.E.: Relationship Between Two Serotypes of Avian Mycoplasmas by Serological and DNA-DNA Hybridization Tests. *Avian Dis.*, 24:439-454, 1980.
- 184- THOMAS, C.B. and SHARP, P.: Detection of Antigen Variations among Strains of *Mycoplasma gallisepticum* by Enzyme-Linked Immunosorbent Inhibition Assay (ELISIA) and Western Blot Analysis. *Avian Dis.*, 32:748-756, 1988.
- 185- THORNTON, G.A.: Serum Treatment and Antigen Dose Effects on Agglutination and Haemagglutination-Inhibition by *Mycoplasma gallisepticum* Antibodies. *Bri. Vet. J.*, 125:195-201, 1969.
- 186- THORNTON, G.A.: Non-Specific Agglutination of *Mycoplasma gallisepticum* by Rheumatoid Factor-Like Antoglobulin in Chickens Infected with *Streptococcus faecalis* or *Staphylococcus aureus*. *J. Comp. Pathol.*, 83:41-47, 1973.
- 187- THRUSFIELD, M.: *Veterinary Epidemiology*. Butterworth and Co. Ltd., ISBN 0-408-10861-4, pp. 181-184, 1986.
- 188- TIMMS, L.: Isolation and Identification of Avian *Mycoplasma*. *J. Med. Lab. Tech.*, 24:79-89, 1967.
- 189- TIMMS, L.: Effects of Storage of Sera on the Diagnosis of Avian Mycoplasmosis. *Vet. Rec.*, 88:698, 1971.
- 190- TIMMS, L.: The Effects of Infectious Bronchitis Superimposed on Latent *M. gallisepticum* Infection in Adult Chickens. *Vet. Rec.*, 91:185-190, 1972.

- 191- TIMMS, L.: Avian Mycoplasmosis. Training Course for Laboratory Veterinarians Conducted at the Bornova Institute, İzmir, TURKEY, April, 1989.
- 192- TIMMS, L. and CULLEN, G.A.: Comparative Efficiency of Four Mycoplasma gallisepticum Strains as Antigens in Detecting Heterologous Infection. Res. Vet. Sci., 13:523-528, 1972.
- 193- TIMMS, L. and CULLEN, G.A.: Detection of M. Synoviae Infection in Chickens and its Differentiation from M. gallisepticum Infection. Bri. Vet. J., 130: 75-84, 1974.
- 194- TIONG, S.K., LIOW, T.M. and TAN, R.J.S.: Isolation and Identification of Avian Mycoplasmas in Singapore. Bri. Poult. Sci., 20:45-54, 1979.
- 195- TOURTELLOTTE, M.E., JENSEN, R.G., GANDER, G.W. and MOROWITZ, H.J.: Lipid Composition and Synthesis in the Pleuropneumonia-Like Organism Mycoplasma gallisepticum. J. Bact., 86:370-379, 1963.
- 196- TRIPATHY, S.B., ACHARJYO, L.N., SINGH, U., RAY, S.K. and MISRA, S.K.: Studies on an Outbreak of Mycoplasma gallisepticum Infection among Peafowls (Pavo Cristatus). Bri. Vet. J., 128:428-431, 1972.
- 197- TÜRKASLAN, J.: Mikoplazma Kültürlerinin Üreme inhibisyon Testi ile identifikasyonu. Pendik Hay. Hast. Merk. Araş. Enst. Derg., 20:60-64, 1989.
- 198- TÜRKASLAN, J. ve SALİHOĞLU, H.: Çeşitli Besi Yerleri Kullanılarak Kikoplazma galliseptikumum Bakteriyolojik Yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu. Pendik Hay. Hast. Merk. Araş. Enst. Derg., 20:53-59, 1989.
- 199- TYZZER, E.E.: Cornell Vet., 16:221-224, 1926. In: OSBORN, O.H. and POMEROY, B.S.: Symposium on Chronic Respiratory Disease of Poultry. V. Infectious Sinusitis of Turkeys. Am. J. Vet. Res., 19:468-472, 1958.
- 200- UPPAL, P.K., WISE, D.R. and BOLDERO, M.K.: Ultrastructural Characteristics of Mycoplasma gallisepticum, M. gallinarum and M. meleagridis. Res. Vet. Sci., 13:200-201, 1972.
- 201- ÜLGEN, M.: Kanatlıların Kronik Solunum Yolu İnfeksiyonu (Chronic Respiratory Disease-CRD) Üzerinde Karşılaştırmalı Bakteriyolojik ve Serolojik Araştırmalar. U.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa, 1991.

- 202- VAN HERICK, W. and EATON, M.C.: J. Bact., 50:47, 1945.
In: CALNEK, B.W. and LEVINE, P.P.: Studies on
Experimental Egg Transmission of Pleuropneumonia-
Like Organisms in Chickens. Avian Dis., 1:208-222,
1957.
- 203- VAN ROEKEL, H., OLESIUK, O.M. and BENINATO, L.P.:
Symposium on Chronic Respiratory Diseases of
Poultry. III. Epizootiology of Chronic Respiratory
Diseases in Chickens. Am. J. Vet. Res., 19:453-463,
1958.
- 204- VAN ROEKEL, H., OLESIUK, O.M. and PECK, H.A.: Chronic
Respiratory Disease of Chickens. Am. J. Vet. Res.,
13:252-259, 1952.
- 205- VARDAMAN, T.H. and YODER, H.W.Jr.: Preparation of
Mycoplasma synoviae Hemagglutinating Antigen and
its Use in the Hemagglutination-Inhibition Test.,
Avian Dis., 13:654-661, 1969.
- 206- VARDAMAN, T.H. and YODER, H.W.Jr.: Mycoplasma synoviae
and Mycoplasma gallisepticum Infections: Differen-
tiation by the Hemagglutination-Inhibition Test.
Poult. Sci., 49:157-161, 1970.
- 207- VARDAMAN, T.H. and YODER, H.W.Jr.: Determination of Non-
Specific Serological Reactions to Avian Mycoplasma
Antigens. Poult. Sci., 50:183-186, 1971.
- 208- VILLEGAS, A.C., KLEVEN, S.H. and ANDERSON, D.P.:
Evaluation of Avian Mycoplasma Membranes as
Antigens. Avian Dis., 20:342-354, 1976.
- 209- WHITE, F.H., WALLECE, G.I. and ALBERTS, J.O.: Serological
and Electron Microscope Studies of Chronic Respira-
tory Disease Agent of Chickens and of Turkey
Sinusitis Agent. Poult. Sci., 33:500-507, 1954.
- 210- WHITHEAR, K.G., GHIOCAS, E. and MARKHAM, P.P.: Examina-
tion of Mycoplasma gallisepticum Isolates from
Chickens with Respiratory Disease in a Commercial
Flock Vaccinated with a Living M. gallisepticum
Vaccine. Aust. Vet. J., 67:459-460, 1990.
- 211- WHITHEAR, K.G., SOERIPTO, HARRIGAN, K.E. and GHIOCAS,
E.: Safety of Temperature Sensitive Mutant
Mycoplasma gallisepticum Vaccine. Aust. Vet. J.,
67:159-165, 1990.
- 212- WHICHMANN, R.W.: Case Report-PPLO Infection in Chukar
Partridges (Alectoris Graeca). Avian Dis., 1:222-226,
1957.

- 213- WILSON, J.E.: Respiratory Diseases of the Fowl. Vet. Rec., 66:683-690, 1954.
- 214- WINDSOR, G.D. and THORNTON, G.A.: Avoidence of Non-Specific Agglutination of Mycoplasma gallisepticum by the Use of a Globulin-Free Antigen. Vet. Rec., 92: 147-148, 1973.
- 215- WINDSOR, G.D., THOMPSON, G.W. and BAKER, N.W.: Haemagglutination and Haemagglutination-Inhibition with Mycoplasma synoviae. Res. Vet. Sci., 18:59-63, 1975.
- 216- WINTERFILED, R.W.: Pigeons as a Source of the Turkey Sinusitis Agent. Vet. Med., 48:124-126, 1953.
- 217- WONG, S.C. and JAMES, C.G.: The Susceptibility of the Agents of Chronic Respiratory Disease of Chickens and Infectious Sinusitis of Turkeys to Various Antibiotics. Poult. Sci., 32:589-593, 1953.
- 218- WOODE, G.N. and McMARTIN, D.A.: Metabolic and Growth Inhibition of Mycoplasma gallisepticum by Antiserum. J. Gen. Microbiol., 75:43-50, 1973.
- 219- WRIGHT, C.L. and MENEELY, J.D.: Removal of Non-specific Agglutination Reactions by Avian Sera to the Serum Plate Agglutination Test for Mycoplasma gallisepticum. Vet. Rec., 90:13-14, 1972.
- 220- YAGIHASHI, T. and TAJIMA, M.: Antibody Responses in Sera and Respiratory Secretions from Chickens Infected with Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis., 30:543-550, 1986.
- 221- YAMAMOTO, R. and ADLER, H.E.: Characterization of Pleuropneumonia-Like Organisms of Avian Origin. I. Antigenic Analysis of Seven Strains and Their Comparative Pathogenicity for Birds. J. Inf. Dis., 102:143-152, 1958.
- 222- YAMAMOTO, R. and ADLER, H.E.: Characterization of Pleuropneumonia-Like Organisms of Avian Origin. II. Cultural, Biochemical, Morphological and Further Serological Studies. J. Inf. Dis., 102:243-250, 1958.
- 223- YI, S.H., PANANGALA, V.S., ROSSI, C.R., GIAMBRONE, J.J. and LAUERMAN, L.H.: Monoclonal Antibodies that Recognize Specific Antigens of Mycoplasma gallisepticum and M. Synoviae. Avian Dis., 33:42-52, 1989.
- 224- YODER, H.W.Jr.: Pre-incubation Heat Treatment of Chicken Hatching Eggs to Inactivate Mycoplasma. Avian Dis., 14:75-86, 1970.

- 225- YODER, H.W.Jr.: Serologic Response of Chickens Vaccinated with Inactivated Preparations of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 23:493-506, 1979.
- 226- YODER, H.W.Jr.: Avian Mycoplasmosis. In: HOFSTAD, M.S., BARNES, H.J., CALNEK, B.W., REID, W.M. and YODER, H.W.Jr.: *Diseases of Poultry*. 8th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. pp. 187-220, 1984.
- 227- YODER, H.W.Jr.: Non-Specific Reactions to *Mycoplasma* Serum Plate Antigens Induced by Inactivated Poultry Disease Vaccines. *Avian Dis.*, 33:60-68, 1989.
- 228- YODER, H.W.Jr. and HOFSTAD, M.S.: A Previously Unreported Serotype of Avian *Mycoplasma*. *Avian Dis.*, 6:147-160, 1962.
- 229- YODER, H.W.Jr. and HOFSTAD, M.S.: Characterization of Avian *Mycoplasma*. *Avian Dis.*, 8:481-512, 1964.
- 230- YODER, H.W.Jr. and HOFSTAD, M.S.: Evaluation of Tylosin in Preventing Egg Transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in Chickens. *Avian Dis.*, 9:291-301, 1965.
- 231- YODER, H.W.Jr., DRURY, L.N. and HOPKINS, S.R.: Influence of Environment on Airsacculitis: Effects of Relative Humidity and Air Temperature on Broilers Infected with *Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis. *Avian Dis.*, 21:195-208, 1977.
- 232- YODER, H.W.Jr., NELSON, C.L. and HOFSTAD, M.S.: Tylosin, An Effective Antibiotic for Treatment of PPLO Turkey Sinusitis. *Vet. Med.*, 56:178-180, 1961.
- 233- YOGEV, D., LEVISHON, S. and RAZIN, S.: Genetic and Antigenic Relatedness Between *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Vet. Microbiol.*, 19:75-84, 1989.
- 234- ZANDER, D.V.: Origin of S6 Strain *Mycoplasma*. *Avian Dis.*, 5:154-156, 1961.
- 235- ZHAO, S. and YAMAMOTO, R.: Recombinant DNA Probes for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.*, 34:709-716, 1990.

10. TEŞEKKÜR

Bu doktora tez çalışmasının yürütülmesinde yardım ve yakın ilgilerini gördüğüm başta doktora yöneticim değerli hocam olmak üzere, A. Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji Bilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine, tüm çalışma arkadaşlarıma, çalışmalarımı bir süre sürdürdüğüm Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Mycoplasma Bölüm Laboratuvarı'nda çalışan değerli meslektaşlarıma ve bu projeye maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

25.01.1964 yılında Ankara'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Ankara'da tamamladım. 1981 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdim ve 1986 yılında mezun oldum. Aynı yıl içinde Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Entitüsü'nün açmış olduğu Doktora ve arkasından da Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin açmış olduğu Araştırma Görevlisi sınavlarını kazanarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Bilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev ve aynı Bilim Dalı'nda Doktora yapmaya başladım. Halen aynı Bilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim.