

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ATILLA ILGAZ

118455

TAVUKLARDA *Mycoplasma gallisepticum*
İNFEKSİYONUNUN TANISINDA BAKTERİYOLOJİK ve
SEROLOJİK YÖNTEMLERİN POLYMERASE CHAIN
REACTION (PCR) İLE KARŞILAŞTIRILMASI

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

Araştırma Görevlisi A. FUNDA BAĞCIGİL

İSTANBUL-2002

118455

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmama başladığım andan itibaren büyük katkı ve yardımlarını gördüğüm başta Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Danışmanım Sayın Prof. Dr. Atilla ILGAZ olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Ömer AKAY' a , Sayın Doç. Dr. Seyyal AK' a, Sayın Doç. Dr. N. Yakut ÖZGÜR' e, Sayın Dr. Serkan İKİZ'e, Liverpool Üniversitesi Veteriner Patoloji Departmanından Dr. Janet Bradbury' e ve aileme sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tez çalışması İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-859/17072000



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1-2
2. GENEL BİLGİLER	3-28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29-44
4. BULGULAR	45-54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55-63
6. ÖZET	64
7. SUMMARY	65
8. KAYNAKLAR	66-80
9. ÖZGEÇMİŞ	81



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hayvancılık sektöründe önemli bir yere sahip olan tavuk yetiştiriciliği birçok dünya ülkesinde yeterli düzeyde olmasına karşın ülkemizde halen gelişmeye devam etmektedir. Son yıllarda Türkiye' deki ekonomik krizden etkilenen yetiştiriciyi, zor duruma düşürebilecek bir başka neden de infeksiyöz hastalıklardır. Bunlardan Kronik Solunum Yolu Hastalığı (Chronic Respiratory Disease-CRD) da, tavukçuluk sektöründe önde gelen ve çok önemli ekonomik kayıplara neden olan infeksiyonlardan biridir. Hastalık, ülkemizde olduğu kadar Amerika, Kanada, Arjantin, Brezilya, Avustralya, İngiltere, İsrail gibi dünyanın birçok gelişmiş ülkesindeki kanatlı çiftliklerinde sorun olmaya devam etmektedir.

CRD' nin primer etkeni olan *Mycoplasma gallisepticum*, tavuklarda mycoplasma infeksiyonlarına neden olan etkenler arasında en önde gelmektedir. *M. gallisepticum*' dan kaynaklanan doğal infeksiyonlar tavuk ve hindilerde ortaya çıkmakta, bunun yanısıra sülün, keklik, bıldırcın, ördek, kaz, serçe ve ispinozlarda da görülebilmektedir (13, 75, 77, 59, 100)

Hasta hayvanlarda verim kaybı, hırıltılı solunum, öksürük, burun akıntısı ve bazı durumlarda tortikollis gibi sinirsel belirtiler görülebileceği gibi, hiçbir klinik belirti göstermeksizin infekte olan hayvanlar da bulunmaktadır (71, 75, 90, 97). Bulaşma lateral ya da vertikal yollarla şekillenmektedir. Lateral bulaşmada, duyarlı hayvanlar etkeni damlacık infeksiyonu şeklinde alarak infekte olmaktadır. İyileşen hayvanların uzun süre portör kaldığı ve infeksiyonu sağlıklı hayvanlara bulaştırdıkları bilinmektedir (11, 13, 54, 75, 116).

Kanatlılarda mycoplasmozis düşük mortalite ve yüksek morbiditeli kronik infeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın yayılmasında sağlıklı görünen portör hayvanların önemli rol oynadığı, bu durumun hastalığın kontrol ve eradikasyonunu önlediği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (13, 62, 75, 121).

Hastalığın kontrolünde en etkili yöntem eradikasyondur. Bu nedenle de spesifik ve duyarlı tanı yöntemlerine gerek duyulmaktadır. Tanıda kültür, günümüzde hala "altın standart" olarak nitelendirilmekte ve her yeni tanı

yönteminin değeriendirilmesinde referans test olarak kullanılmakta, bunun yanında serolojik testler de oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Son yıllarda birçok hastalıkta olduğu gibi moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmeler ile, *M. gallisepticum*' un tanısında da büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Günümüzde mycoplasmozisin ortaya konması için kullanılan kültür, serolojik testler gibi laboratuvar yoklamalarında karşılaşılan sorunlar nedeniyle moleküler düzeydeki tanı yöntemleri ve özellikle PCR önem kazanmaya başlamıştır.Ülkemizde bu moleküler tanı yöntemlerinin birçok hastalıkta kullanılmaya başlandığı bilinmesine karşın, CRD' nin tanısında PCR kullanımına ait bir yayına rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, Marmara Bölgesindeki çeşitli işletmelerden toplanan 96 tavuğa ait trachea örneklerinde *M. gallisepticum*' un spesifik DNA'sının saptaması amacıyla Polymerase Chain Reaction (PCR), etken izolasyonu için bakteriyolojik incelemeler ve aynı tavuklara ait kan serumu örneklerinden de lam aglutinasyon testi yapılarak, tavuklarda enfeksiyonun tanısında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum*' un neden olduğu kronik solunum yolu enfeksiyonu (CRD), hırıltılı solunum, öksürük, burun akıntısı, sinüzit ile karakterize kronik seyirli bir hastalıktır (4, 5, 28, 52, 56, 75). Hastalık, karkasın değer kaybetmesi ve yumurta veriminde azalma gibi ekonomik kayıpların yanı sıra, yüksek sağaltım masrafları ile de yetiştiriciyi zor durumda bırakmaktadır (28, 30, 37, 53, 70, 78, 91, 125).

Mycoplasmalar ilk olarak 1898 yılında Nocard ve Roux tarafından sığırlardan pleuro-pneumonia' nın etkeni olarak izole edilmiş, önceleri *PPLO*, *Asterococcus*, *Anulomyces* olarak isimlendirilmesine karşın 1929 yılında *Mycoplasma* adı altında toplanmıştır (4). Nelson (1935) nezleli tavukların burun akıntılarının direkt mikroskopik incelemesi sonucunda kokobasil şeklinde mikroorganizmalar gözlendiğini, bu mikroorganizmaların doku kültürü ve embriyolu yumurtanın yanı sıra besiyerlerinde de üretilbildiğini, ancak agar üzerinde tipik üreme elde edilemediğini bildirmiştir (26, 75). Bundan sonraki yıllarda pleuropneumonia-like organizma (PPLO)' ların kanatlıların solunum yolu enfeksiyonlarındaki rolünü belirlemek amacıyla birçok araştırma yapılmıştır (17, 75, 128). Delaplane ve Stuart (1943) embriyolu tavuk yumurtalarında tavukların kronik solunum yolu enfeksiyonu ile ilişkili bir etkeni üretmişler ancak etkeni PPLO olarak tanımlayamadıklarını bildirmişlerdir. Bunun aksine Van Herick ve Eaton (1945), embriyolu tavuk yumurtasından izole ettikleri PPLO' ların yapay besiyerlerine pasaj yapıldığında ürettiğini, ancak bu mikroorganizmanın tavukların solunum yolu enfeksiyonu ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir (26, 75, 128). Araştırmacılar, Markham ve Wong (1952) ile Van Roekel ve Olesiuk (1953) 'un, besiyerlerinde ürettikleri PPLO' nun tavukların kronik solunum yolu hastalığı (CRD) ve hindilerin enfeksiyöz sinüzitisi ile ilişkili olduğunu ortaya koyduklarını bildirmişlerdir (104, 128).

Yoder ve Hofsad (128), White ve ark.(1954) ile Gianforte ve ark. (1955)' na göre, kanatlı solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkili PPLO' ların tek bir

patojenik serotip olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Edward ve Freundt 1956 yılında kanatlı orijinli PPLO' ların klasifikasyonu için yeni bir düzenleme yapılması gerektiği önermiş, Freundt (1957) Bergeys Manuel of Determinative Bacteriology' nin 7. baskısında, Mycoplasmatales takımı altında yer alan Mycoplasmataceae familyasında sadece Mycoplasma cinsi bulunduğunu ve kanatlı orijinli tek türün *Mycoplasma gallinarum* olduğunu yayınlamıştır.

Yapılan daha detaylı araştırmalar, kanatlı türlerinde çeşitli serotiplerin varlığını ortaya koymuştur. Yamamoto ve Adler (1958) 5 farklı serotip (I,II,III,IV, V) belirlemiş, Kleckner (1960) ise serotip sayısını 8'e (A, B, C, D, E, F, G, H) çıkarmıştır (128). Edward ve Kanarek (25), kanatlı orijinli iki türü daha isimlendirmişler, bunlardan birinin tavuklarda CRD ve hindilerde infeksiyöz sinusitis'e yol açan, patojenik *M. gallisepticum*, diğerinin ise nonpatojenik *M. iners* olduğunu bildirmişlerdir. Fabricant (29), *M. gallisepticum*' un A serotipine, *M. iners*' in ise G serotipine ait olduğunu, *M. gallinarum*' un da B serotipine ait bir nonpatojen olduğunu saptamıştır.

Günümüzde *M. gallisepticum*' un sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte çok sayıda suşu bulunmaktadır. İnfeksiyöz sinuzitisli bir hindinin beyninden izole edilen S6 suşu, birçok çalışmada antijen hazırlanmasında kullanılan A5969 suşu, canlı aşı programlarında geniş kullanıma sahip F suşu, bakterin üretiminde ve challenge çalışmalarında patojenik suş olarak kullanılan R suşunun yanısıra PG-31, A-514, K2317, K2320, BA, KW, X-95, WVU 1791, 227, K-730, K-78, 2600,VR, K-703, 30902, G11, 4229, 80083, Ap3AS Iowa 801, P12027, P33470, W, T suşlarının bunlardan bazıları olduğu bildirilmiştir (17, 52, 71, 73, 75, 108, 112, 120).

Stipkovits ve Kempf (114), moleküler düzeydeki çalışmaların ilerlemesiyle suşların genetik farklılıklarının daha kolay ve net bir şekilde ortaya çıkarılmaya başlandığını, buna göre *M. gallisepticum* suşlarının 3 grupta toplanabileceğini bildirmiştir. Birinci grupta serolojik özellik olarak aynı ancak virulensleri farklı suşların bulunduğunu, aşılarında sıklıkla kullanılan F suşu, challenge çalışmalarında sıklıkla kullanılan virulent R ve A5969 suşlarının bu grupta olduğunu belirtmiştir. İkinci grupta varyant, atipik, 503, Y5, Y9, M876 gibi 35

ve 43 kDa protein bandı içeren suşların bulunduğunu, üçüncü grupta ise kaz, ördek, keklik gibi değişik konaklardan izole edilen suşların bulunduğunu bildirmiştir.

Araştırmacılar, *Mycoplasma gallisepticum* (serotip-A), *Mycoplasma meleagridis* (serotip-H), *Mycoplasma synoviae* (serotip-S) ve son yıllarda da *Mycoplasma iowae*' nin kanatlı yetiştiriciliği açısından en önemli Mycoplasma serotipleri olduklarını belirtmişlerdir (36, 45, 59, 70, 114, 125).

Mycoplasma gallisepticum, Bergeys Manuel of Determinative Bacteriology (1994)' nin 9 baskısında, Mollicutes sınıfının Mycoplasmatales takımındaki Mycoplasmataceae familyasında bulunan Mycoplasma cinsine ait bir tür olarak yer almaktadır (40).

Mycoplasmalar hücre duvarına sahip olmadıkları halde, çevre ile bağlantılarını sağlayan kolestrol ya da karotenoid yapıda 3 tabakalı, 70-120 A° genişliğinde sitoplazmik bir membranla çevrilidirler. Protein ve karbonhidrattan oluşan dış ve iç tabakalar arasında lipidlerin bulunduğu bir orta tabaka bulunmaktadır. Ünit membrandaki karbonhidrat molekülleri, komplementin fikze edilmesinde, nötralizan antikorların saptanmasında ve aynı zamanda suşlar arasındaki kross reaksiyonlarda görev almaktadır. *M. gallisepticum*' da diğer mikoplasmalardan farklı olarak ünit membran üzerinde hemaglütinasyon oluşturabilen çıkıntılar bulunmaktadır (4, 95, 96).

Stoplazmik membranın dış yüzüne tutunmuş birtakım farklı lipoproteinler bulunmaktadır. Bu yüzey antijenleri konakçı immun sistem hücrelerinin tercih edilen hedefleridir. Bununla beraber, bu lipoproteinlerin bazılarında oluşacak değişiklikler, mycoplasmaların konakçı savunma sisteminden kaçmasına olanak sağlarlar (19). Kleven (60), bir tek yüzey antijeninin birbirine yakın ancak farklı yaklaşık 34 gen tarafından kodlandığını bildirmiştir. Bu değişken yüzey antijenlerini "şaltere" benzeten araştırıcı, belli bir zaman diliminde açık olan genin, konakçı immun sistem hücrelerince tanınmasından sonra kapandığını ve diğer genin açığa çıktığını belirtmiştir.

M. gallisepticum yaklaşık 0.25-0.5 µm boyutlarında, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, Gram negatif bir bakteridir. Diğer mycoplasmalar gibi hücre duvarı

sentezleyecek genetik yeteneğe sahip olmadıklarından oval, yüzük, kokoid, filamentöz ya da yıldız şeklinde pleomorfik bir görünüm sergilemektedirler (95). Anilin boylarla güç boyanma özelliğinde olduklarından Giemsa, Dienes, Macchiavello, Castenada ve Stamp boyama yöntemleri kullanılır (4, 75).

Genel besiyerlerinde üreme özelliğine sahip olmayan *M. gallisepticum*' un üretilmesi için farklı kompleks besiyerlerinin değişik kompozisyonları kullanılmakta olup, bu amaçla PPLO buyyon, PPLO agar, avian meat infuzyon agar, beyin-kalp infuzyon buyyonu, Brucella agar, Brucella buyyon, fenol red maltoz buyyon, triptoz fosfat buyyon, gibi temel besiyerlerine üremeyi zenginleştirici suplementler katılmaktadır (10, 32, 33, 104). *M. gallisepticum*, sitoplazmik membranının dayanıklılığı ve akıcılığı için başta kolesterol olmak üzere sterollere gereksinim duymaktadır ve bu gereksinimini besiyerlerine % 10-15 oranında inaktive at, tavuk ya da domuz serumu ilavesi ile karşılamaktadır (2, 21, 32, 59, 75, 95). Ayrıca üremeyi güçlendirmek için, besiyerlerine maya otolizati ya da maya ekstraktı gibi maya ürünlerinin ilavesi gereklidir (59, 75).

Besiyerlerine bazı karbonhidratların katılmasının üremeyi artırıcı etkisi olduğu, ancak fazla miktarda katılmasının besiyeri pH' sını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (109, 124). *M. gallisepticum*' un izolasyonu için besiyerlerinin pH' sının 7.2-7.8 arasında olması gerektiği, düşük pH' ya çok duyarlı olması nedeniyle, sıvı besiyerinde renk değişimi gözlemlendiğinde bekletilmeden hemen pasajının yapılması gerektiği belirtilmiştir (59, 75).

M. gallisepticum' un klinik örneklerden izolasyonu için ekim yapılmış besiyerlerinin mikroaerobik koşullarda, nemli bir ortamda, 37°C de 3-5 gün süreyle inkubasyona bırakılması, bu sürelerde üreme görülmeyen besiyerlerinin 7-14 güne kadar bekletilmesi gerektiği belirtilmiştir (21, 95, 100, 104). Tipik kolonilerin 0.01-1 mm çapında, kalın ve yüksek merkezli, düzgün, yuvarlak, yarı-seffaf yığınlar şeklinde olup, agarın içine doğru üreme göstermesi nedeniyle ortaları düğmeli bir görünüm sergilediği ve en iyi indirekt ışık verilen stereo mikroskop yardımıyla gözlemlendiği bildirilmiştir (71,75). Kolonilerin görünümünün besiyerinin besleyici özelliğine, besiyeri yüzeyinin nemine ve kültürün eskiliğine

göre değişiklik gösterdiği (97), farklı serotiplerin farklı koloni oluşturdukları (128), tip ayrımının koloni formasyonuna göre yapılmasının doğru olmadığı vurgulanmıştır (75). Sıvı besiyerlerinde optimal üremenin elde edilebilmesi için 1-3 günlük inkubasyon süresine gereksinim duyulmaktadır. Tekrarlanan pasajlar sonucunda laboratuvar koşullarına adapte olan suşların daha kısa sürede yoğun bir bulanıklık oluşturarak üredikleri bildirilmiştir (26, 40, 59, 95, 97).

M. gallisepticum, besiyerlerinin yanısıra embriyolu tavuk yumurtasında da üreme özelliğine sahiptir (75, 104).

M. gallisepticum' un biyokimyasal ve biyolojik özellikleri birçok araştırıcı tarafından incelenmiştir (10, 35, 100). Etkenin, glukoz ve maltozu gaz oluşturmaksızın fermente ettiği, laktoz, dulsitol, sellobioz, ksiloz, adonitol, arabinoz, sorbitol, inulin ve salisini fermente etmediği, sukrozu ender olarak fermente ederken, galaktoz, fruktoz, trehaloz ve mannitolu fermente etme özelliğinin değişken olduğu, arjinini hidrolize etmediği, fosfataz aktivitesinin negatif olduğu, 2,3,5 triphenyl tetrazolium' u ve neotetrazolium' u redükte ettiği bildirilmiştir (21, 75, 97, 114). *M. gallisepticum*' un tavuk, hindi, kobay gibi bazı hayvan türlerinin eritrositlerini aglutine edici etkisi olduğu belirlenmiştir (97, 120, 128). Besiyerine at kanı ilave edildiğinde tam hemoliz oluşturduğu gözlenmiştir (75, 97, 114, 116, 119). Mycoplasmaların sadece glukoz fermentasyonuna göre "glukozu fermente edenler" ve "glukozu fermente etmeyenler" olarak iki gruba ayrılabilir olduklarını bildiren Barber ve Fabricant (10), 300' den fazla mycoplasma izolatının biyokimyasal özelliklerini incelediklerinde, glukozu fermente edenlerin önemli bir oranda diğer karbonhidratları fermente etme özelliklerinin de benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Ülgen (120) *M. gallisepticum*' un diğer Mycoplasma türlerinden ayırıcı tanısının yapılması için özellikle glukoz fermentasyon, tetrazolium redüksiyon, arjinin hidrolizi, ve film-spot oluşturma testlerinin uygulanması gerektiğini, Türkarslan ve Salihoğlu (119) identifikasyonda sadece üreme inhibisyon testinin kullanılmasının yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

M. gallisepticum tavuk dışkısında 20°C de 1-3 gün, giysilerde 20°C de 3 gün ya da 37°C de 1 gün, yumurta sarısında 37°C de 18 hafta ya da 20°C de 6

hafta canlı kalabilmektedir. Sıvı kültürler -30°C de 2-4 yıl, liyofilize suşlar 4°C de en az 7 yıl canlı kalabilmektedir (75). Christensen ve ark. (20), *M. gallisepticum* un tavuk tüyünde 2-4 gün, pamuklu giyside 12 saat-4 gün, insan saçında 8 saat-3 gün, kauçuk ve samanda 2 gün, kerestede birkaç saat, kulak mukozasında 4 saat, burun mukozasında 4-24 saat canlılığını koruduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar kontamine tavuk tüyünün mycoplasma infeksiyonu gözlenmeyen sürülerde en önemli tehlikelerden biri olabileceğini, etkenin kauçuk ve pamuklu giysilerde 2 gün kadar canlılığını sürdürmesi nedeniyle kümeslere girişte ayak dezenfeksiyonunun ve kümesler arasında dolaşırken giysilerin değiştirilmesinin çok önemli olduğunu vurgulamışlardır.

M. gallisepticum fenol, formalin, β -propiolakton ve merthiolat gibi dezenfektanlara ve deterjanlara duyarlıdır. Penisilin ve analoglarına, polimiksin, neomisin ve düşük konsantrasyondaki (1:4000) thalyum asetata dirençlidir ve bu özelliği izolasyonda kullanılmaktadır (5, 40, 59, 71, 75, 97).

Mycoplasmalar ekstrasellüler parazitlerdir. Patojen mycoplasmalar, meme bezi, seröz membranlar, ürogenital sistem, solunum yolu gibi belli başlı organ ve dokularda bulunmakta ve birçok orguda yüksek oranda konakçı spesifitesi göstermektedirler (31, 62, 95, 116). *M. gallisepticum* solunum yolu mukozasına kolonize olduktan sonra tracheal hırıltılar, burun akıntısı, öksürük gibi klinik semptomlar şekillenmeye başlamaktadır. Solunum sistemi viruslarının mukoz membranlarda ve epitel hücrelerinde oluşturdukları bozukluklar, *M. gallisepticum* un buralara daha kolay yerleşerek üremesini sağlamaktadır. *M. gallisepticum*'un da solunum yolundaki silia hücrelerine zarar vermesi sekonder bakteriyel invazyonları kolaylaştırmaktadır. Bunun sonucunda infeksiyonun şiddetlendiği ve bu komplike hastalığın kronik solunum yolu kompleksi olarak adlandırıldığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir(24, 56, 95).

Kanatlı mycoplasmalarının farklı suşlarının solunum yolu mukoz membranlarına ve beyin dokusuna zarar verdikleri bildirilmiştir (26, 31, 45, 46,121). *M. gallisepticum* un, konakçı hücrenin membranındaki glikoproteinlerin sialik asit kısımlarını reseptör olarak kullanarak, polipeptid yapıdaki kısımlarıyla

mukozaya yapışarak, salgıladıkları nöraminidaz enzimleri ile duyarlı olan hücre membranlarına zarar verdikleri bildirilmiştir (19, 120, 121).

M. gallisepticum un patojenitesi, etkenin virulensine, vücuda giriş yoluna, konakçının duyarlılığına, türüne ve diğer dış faktörlere bağlı olarak değişmektedir. *M. gallisepticum* un oluşturduğu infeksiyonunun, hijyenik olmayan kalabalık kümesler, amonyak düzeyinin yüksek olduğu ortamlar ve soğuk hava gibi stres faktörleri ile birlikte hayvanların vücut dirençlerinin kırıldığı durumlarda daha şiddetli seyrettiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (62, 73, 111, 120). Mycoplasmaların patojenitesinin incelenmesi için tracheal organ kültürleri, deney hayvanları ve embriyolu tavuk yumurtası kullanılmaktadır (121, 122).

M. gallisepticum içeren sıvı kültürlerin ya da eksudatların 7 günlük embriyolu tavuk yumurtasına inokulasyonu sonucu, embriyonun 5-7 günde ölümüne, gelişememesine, generalize ödem, karaciğer nekrozu ve dalakta büyüme gibi tipik lezyonlara neden olabileceği bildirilmiştir (75). Colusi (21), 72 saatlik sıvı kültürlerin yumurta sarısı kesesine inokulasyonundan 2-5 gün sonra, embriyo ölümlerinin görüldüğünü, *M. gallisepticum* un embriyodan ve yumurta sarısı kesesinden tekrar izole edildiğini belirtmiştir.

Araştırmacılar *M. gallisepticum* suşlarının virulensini değerlendirmek için direkt olarak konjunktival keseye, nasal sinusa ve tracheaya inokulasyon, ya da hayvanların etkeni solunum yoluyla almasının sağlanması gibi yöntemleri denemişlerdir (73, 75, 111). Soeripto ve ark. (111) konjunktival keseye direkt saf kültür inokulasyonu sonrası hiçbir klinik semptom ve otopsi bulgusu gözlemediklerini, saf kültürlerin nasal sinuslara ya da tracheaya inokulasyonu sonrası, yumurta veriminde herhangi bir düşüşe neden olmadığını ve otopside de hiçbir bulguya rastlanmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar intraabdominal inokulasyon sonucu belirgin lezyonların oluştuğunu, inokulasyondan 2-3 hafta sonraki dönemlerde bu lezyonların en yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın Nunoya ve ark.(90), tracheaya inokulasyondan iki hafta sonra hava kesesi lezyonlarının oluştuğunu ve etkenin buradan yapılan kültür çalışmaları sonrasında tekrar izole edildiğini rapor etmişlerdir. Levisohn ve ark. (73), 2

haftalık tavukları aerosol yolla *M. gallisepticum'* a maruz bırakmalarını takiben hava kesesi lezyonlarının oluştuğunu ve etkenin tekrar izole edildiğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar, tracheal organ kültürlerinde, *M. gallisepticum'* un patojenitesinin değerlendirilmesi için siliar aktivitenin gözlenmesi gerektiğini belirtmişlerdir (121, 122). Ülgen ve ark. (121), bu siliostatik etkinin pasaj sayısı ve tracheal organ kültürüne inokule edilen bakteri miktarı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değiştiğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar, inceledikleri saha izolatları arasında patojen *M. gallisepticum'* un siliostatik etkisinin *M. gallinarum'* a göre daha kısa sürede şekillendiğini saptamışlardır. Ülgen ve ark. (122), iki *M. gallisepticum* saha suşunu tracheal organ kültürlerinde incelemeleri sonucunda, silyaların zarar gördüğünü, lamina epitelyalisin yassılaştığını, epitel hücrelerin sitoplazmalarının vakuolleştiğini ve çekirdeklerinde piknoz oluştuğunu gözlemişlerdir.

CRD halen ülkemizde olduğu kadar Amerika, Kanada, Arjantin, Brezilya, Avustralya, İngiltere, İsrail gibi dünyanın birçok gelişmiş ülkesindeki kanatlı çiftliklerinde sorun olmaya devam etmektedir (5, 21, 91, 100, 103, 111).

M. gallisepticum' dan kaynaklanan doğal infeksiyonlar tavuk ve hindilerde gözlenmektedir. Bununla birlikte sülün, keklik, bıldırcın, papağan, ördek ve kazlardan da izole edildiği bildirilmiştir (13, 46, 75, 77, 100, 116). Birçok araştırmacı ispinozlarda *M. gallisepticum'* dan kaynaklanan salgınların görüldüğünü rapor etmiştir (77, 81, 91, 99). Ağaçkakan, alakarga gibi bir çok kuş türünden de etken izolasyonuna dair raporlar bulunduğu bildirilmiştir (36, 43, 63, 75, 81). Araştırmacılar serçelerin ve papağanların da etkene duyarlı olduklarını, infeksiyonun bu hayvanlarda geçici seyrettiğini belirtmişlerdir (13, 63). Yapılan çalışmalar ispinozlardan izole edilen suşların tavuklarda hafif infeksiyona yol açtığını ortaya çıkarmıştır (91,113). Bu gibi hayvanların her birinin infeksiyon kaynağı ve tavukçuluk sektörü için büyük tehlike olabileceği vurgulanmıştır (28,43).

Kanatlı hayvanlarda CRD düşük mortalite ve yüksek morbiditeli kronik infeksiyonlar olarak tanımlandığı, genellikle % 10-50 arasında seyretmekte olan

morbiditenin yaşı ve mevsime göre değiştiği ve mortalite oranının %5-10 arasında olduğu ancak miks infeksiyonlarda bu oranın %30' a kadar çıkabildiği belirtilmiştir (62, 75, 114, 121).

CRD' de bulaşma lateral ya da vertikal olarak şekillenir. Lateral bulaşmada, hasta hayvanlarla temas oldukça önemlidir. *M. gallisepticum* üst solunum yoluna kolonize olduğu için burun akıntısı, öksürük ile çevreye saçılmakta, duyarlı hayvanlar damlacık infeksiyonu şeklinde etkeni almaktadırlar. Duyarlı hayvanların infekte tavuklarla teması salgınların çıkmasına neden olmaktadır (36, 75, 84, 114, 116). İnfeksiyonu hafif geçiren ve semptom göstermeyen hayvanların hastalığın bulaşmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (11, 31, 54, 56). MacMartin ve ark. (84) kümeslerdeki havalandırmanın artırılmasıyla *M. gallisepticum*' un lateral bulaşmasının azaldığını saptamışlardır. Soeripto ve ark. (111), konjunktival keselerine *M. gallisepticum* inokule ettikleri tavukların solunum yollarında 2 hafta sonra en üst düzeyde bulunan mikroorganizma sayısının, sonra hızla düşmeye başladığını ve 10. haftadan sonra izolasyonun gerçekleşmediğini, bulaşmanın da özellikle solunum yolunda maksimum miktarda etkenin bulunduğu döneme ratladığını bildirmişlerdir.

Ayrıca kontamine su ve yemlerin de infeksiyon kaynağı oldukları belirtilmiştir. Araştırmacılar, etkenin hindilerin semeninde de bulunabileceğini ve bu nedenle suni tohumlama sırasında bulaşmanın olabileceğini vurgulamışlardır (12, 75, 128). Kojima ve ark. (66, 67) ile Stipkovits ve Kempf (114) aşıların, SPF yumurtalarda hazırlanmadığı takdirde birer infeksiyon kaynağı olduklarını vurgulamışlardır. Bulaşmada artropodların rol aldığı rapor edilmiştir (104)

M. gallisepticum' un yüzey epitoplarının alternatif formlarını geliştirebilme yeteneği ile, yüzey proteinlerinde spontan fenotipik değişimler oluşturabildiği, böylece konakçı immun sistemini geçerek dokularında canlı kalabildiği ve bu nedenle de infekte olan bir hayvanın ömür boyu infekte kalacağı ve sağlıklı sürüler için çok önemli tehlike oluşturabileceği bildirilmiştir (62, 114).

Etkenin insan saçında 1-2 gün canlı kalabildiği ve infekte sürülerle çalışan insanların da birer infeksiyon kaynağı oldukları (114), birçok *M. gallisepticum* salgınının insan faktörlerine bağlı olarak ortaya çıktığı vurgulanmıştır (71).

Araştırmacılar, infeksiyonun akut döneminde, *M. gallisepticum*' un oviduct ve ovaryumlara kolonize olarak, infekte yumurtaların oluşmasına neden olduklarını belirtmişlerdir(104, 114). Stipkovits ve Kempf (114) *M. gallisepticum*' un infekte allantoik sıvıda 5°C de 3 hafta, etüvde 4 gün, oda ısısında 6 gün, yumurta sarısında da 37°C de 18 hafta, 20°C de 6 hafta canlılığını koruyabildiğini bildirmişlerdir.

Hayvanlarda infeksiyona neden olan mycoplasmaların birçoğunun belli bir konakçı türüne spesifik olduğu ve hastalık oluşturduğu, ancak ender olarak başka konaklara da kolonize olabildikleri rapor edilmiştir. Tavuklar için patojen olan *M. gallisepticum*' un koyunlardan da izole edildiği, bu nedenle hastalığın kontrol ve eradikasyon programları içerisinde bu konakların da göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır (31).

CRD' nin broylerlerde vücut ağırlığında düşüş (%20-30), yemden yararlanma oranında azalma (%10-20), yumurtacı tavuklarda yumurta veriminde azalma (%10-20) ve embriyo ölümlerinde artışa (%5-10) neden olduğu belirtilmiştir (71, 75, 114).

Araştırmacılar doğal koşullarda infeksiyonun inkubasyon süresinin 3-38 hafta arasında değiştiğini, deneysel koşullarda 6-21 gün arasında olduğunu, klinik belirtilerin genellikle 3 haftalıktan küçük hayvanlarda fazla görülmediğini, yumurta yoluyla infekte olmuş sürülerde klinik semptomların 3.-6. haftalarda oluştuğunu, bazı durumlarda da yumurta üretiminin başlangıcında ortaya çıktığını, egg dipping uygulanmış ise hastalığın komplike oluncaya kadar hiçbir semptom oluşturmayaabildiğini bildirmişlerdir (71, 75, 114, 116).

Hastalığın bilinen patognomik bir semptomu yoktur (45). Hasta tavuklarda tracheal hırıltılar, burun akıntısı, öksürük, solunum güçlüğü, yem tüketiminde azalmaya bağlı kilo kaybı ve tortikollis ile karakterize sinirsel belirtiler gözlenir (71, 75, 90, 97, 104). İnfeksiyon, yumurtacı tavuklarda yumurtlama periyoduna girmeden hemen önce, broylerlerde daha çok 4.-8.

haftalarda, klinik belirtiler ise en çok 3-8 haftalık genç hayvanlarda şekillenir ve kış aylarında özellikle nemli ortamlarda şiddetlidir. Buna karşın hiçbir klinik semptom göstermeksizin serolojik olarak pozitiflik gösteren sürüler olabilir, bunlar genellikle genç yaşlarda infekte olmuş ve kısmen iyileşmiş hayvanlardır. Tüm semptomların horozlarda daha belirgin olduğu vurgulanmıştır (4, 62, 75, 121).

Araştırmacılar, CRD' li hayvanların otopsilerinde hava keselerinde donuklaşma ve kalınlaşma görüldüğünü, ilerlemiş olgularda ve özellikle *E. coli* ile miks infeksiyonlarda fibrinli ya da fibropurulent perihepatitis ve perikarditis gözlemlendiğini bildirmişlerdir (75, 104). Nunoya ve ark. (90) perivasküler ve peribronşial dokulardaki lenfosit birikiminin invaze olan mycoplasmaya karşı immunglobulin üretiminin bir göstergesi olduğundan, tracheal lezyonların bir kısmının, konakçının immun yanıtından kaynaklanabileceğini önermişlerdir. Araştırmacılar, tracheal lezyonların intratracheal inokulasyondan 2 hafta sonra en şiddetli halini aldığını, bu aşamada tracheal mukozanın yoğun hücre infiltrasyonu nedeniyle oldukça kalınlaştığını saptamışlardır.

İyileşen hayvanlarda belli bir düzeyde bağışıklık oluştuğu, ancak bu tip sürülerin etkeni taşıdığı ve horizontal bulaşma ile duyarlı sürülere ya da yumurtayla bir sonraki generasyona etkeni bulaştırdıkları vurgulanmıştır (75). Hücrel ve humoral immunitenin infeksiyonu takiben geliştiği ve koruyucu bağışıklığa yardımcı olduğu, hücrel yanıtın infeksiyondan 1 hafta sonra başlayıp yaklaşık 7. haftada pik düzeye ulaştığı, hemaglutine edici antikorların ise serumda 7. haftada, tracheal yıkantılarda 6. haftada pik düzeye ulaştığı rapor edilmiştir (116). Hassanien ve ark. (37) deneysel olarak infekte ettikleri tavuklarda *M. gallisepticum* 'a karşı immun yanıtı, incelemişler ve agglutinasyon testi ile ilk hafta oldukça yüksek pozitiflik saptandığını, bunun daha sonra giderek azaldığını ve hemagglutinasyonu inhibe edici antikorların özellikle 4. haftadan sonra arttığını saptamışlardır. Yagihashi ve Tajima (126) tavuklara intratracheal *M. gallisepticum* inokulasyonunu takiben ilk 3 hafta içinde, *M. gallisepticum* 'un kolonizasyon derecesi ile tracheal lezyonların şiddeti arasında bir ilişki olduğunu, tracheal yıkama sıvısındaki antikor titresinin bu fazda

arttığını, sonra aniden tracheadan *M. gallisepticum* izolasyon oranının düştüğünü ve lezyonların da azaldığını, inokulasyondan 5 hafta sonra hastalıktan kurtulmuş hayvanlarda belirli bir düzeyde salgısal immunglobulinlerin varolduğunu bildirmişlerdir. Aynı hayvanların tekrar infekte edilmeleri durumunda daha hafif tracheal lezyonların şekillendiğini ve daha hızlı bir şekilde iyileşmenin olduğunu gözlemişlerdir. İnfekte tavukların harder bezi, dalak, oviduct ve solunum yolu sekresyonlarında *M. gallisepticum*'a karşı IgA ve IgG saptadığı rapor edilmiştir(12, 126).

Araştırmacılar, *Mycoplasma gallisepticum* infeksiyonunun tanısının seroloji ve bakteriyolojik kültüre dayandığını, son yıllarda moleküler tanı tekniklerinin gelişimiyle tanı yöntemlerinin de gelişme gösterdiğini bildirmişlerdir (52, 60, 88, 130, 131).

M. gallisepticum'un tavuklarda akciğer, hava keseleri, nasal turbinatlar, palatine fissure gibi solunum sistemine ait organlardan ve oviduct, ovaryum, testis, kloakadan izole edilebildiği rapor edilmiştir (12, 17, 75, 100, 104, 114). Mycoplasmosisten şüpheli hasta hayvanlardan alınan örneklerin soğuk zincir altında kısa sürede ya da dondurularak 24-48 saat içerisinde laboratuvara gönderilmesi önerilmektedir. Örnekler swab ile alınmışsa, içerisinde antibiyotik bulunan transport besiyerlerinin kullanılmasının daha uygun olduğu belirtilmiştir (9, 59, 95, 97, 131).

Aydın ve İzgür (9) ile Güler(35), izolasyon için en uygun örneğin trachea olduğunu bildirirken, bazı araştırmacılar (17, 33) da *M. gallisepticum* izolasyonu için palatine fissure' den daha iyi sonuç alındığını ve aynı zamanda canlı hayvanlarda bu bölgeden örnek alımının daha kolay ve daha az stres yaratıcı olduğunu bildirmişlerdir. Jordan ve Amin (46) *M. gallisepticum*'un en çok solunum sistemine ait dokulardan, kloaka ve ayak lezyonlarından izole edildiğini bildirmişlerdir. Bencina ve ark. (12) trachea, ovidukt ve palatine fissurenin yanısıra Harder bezinden de etken izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Ülgen (120), 137 tavukta *M. gallisepticum* izolasyonu üzerine yaptığı bir araştırmada, trachea (%7.3), hava keseleri(%3) ve akciğerlerden (%0.7) etkeni izole

etmesine karşın infraorbital sinuslardan izolasyon gerçekleşmediğini vurgulamıştır .

İnfeksiyonun başlangıcında henüz serolojik yanıtın oluşmadığı dönemde, etkenin tracheada bol bulunduğu ve bu nedenle izolasyon şansının da arttığı belirtilmiştir. İnfeksiyonun ilerlemesiyle tracheadaki bakteri sayısının azaldığı ve izolasyon şansının da düştüğü, ayrıca antibiyotik sağaltımı sonrasında da aynı şekilde etken sayısının azaldığı ve izolasyonun zorlaştığı araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (47, 71). Kempf ve ark.(52), doğal infeksiyonlarda hayvanların tümünün aynı oranda infekte olamayacaklarını ya da ortamda diğer mycoplasmaların ve bakterilerin bulunabileceğini ve alınan her örnekten *M. gallisepticum*' un izole edilmesinin zor olduğunu, bu nedenle örneklerin sık ve fazla sayıda alınmasını önermişlerdir.

Araştırmacılar, hasta hayvanlardan izolasyon için örnek alınması amacıyla kullanılan swabların çeşitli özellikleri üzerine araştırmalar yapmışlardır (16, 18, 130, 131). Branton ve May (16), daha az absorban olan ve etilen oksitle sterilize edilmiş kalsiyum alginatetipped swab ile steril rayon-tipped swabları karşılaştırdıklarında bu swabların absorpsiyon yeteneklerinin izolasyon oranını etkilemediklerini belirlemişlerdir. Branton ve ark (18), örnekler alınmadan önce besiyeri ile ıslatılmış swablarla, kuru swabları karşılaştırdıklarında da belirli bir fark saptamadıklarını belirtmişlerdir. Buna karşın, Zain ve Bradbury (131), örnek alımında içerisinde diğer bakteriler için inhibitör maddeler içeren besiyerinde ıslatılmış swabların kullanılmasının izolasyon şansını arttırabileceğini önermişlerdir. Zain ve Bradbury (130), swabların inkubasyon süresince besiyerlerinin içerisinde bırakılmasının izolasyon şansını arttırabileceğini bildirmişlerdir. Ancak alüminyum saplı ipek swabların üremeyi inhibe edebileceğini, pamuklu swabların ise doymamış yağ asitleri gibi inhibe edici bileşiklerin oluşmasına ve pH' nın değişmesine yol açabileceklerini ve izolasyonu zorlaştıracaklarını vurgulamışlardır. Ayrıca swabın besiyerinde bırakılması durumunda, swabda bulunabilecek diğer kontaminant bakterilerin üreme ortamı bulacağını ve yine etkenin üremesini önleyebileceği gibi sakıncaları ilave etmişlerdir.

Kleven (59), özen gösterilmesi gereken bir konunun da besiyerine ekimi yapılacak inokulum miktarı olduğunu belirtmiş, doku enzimlerinin glukozu parçalayıp pH'da düşüşe yol açabileceğini ya da ortamda doku inhibitörlerinin olabileceğini, bunların da üremeyi inhibe edebileceğini ve bu nedenle inokulumların dilusyonlarının yapılması gerektiğini vurgulamıştır.

Araştırmacılar dokulardan hazırlanan inokulumların, doku eksudatlarının ve swab örneklerinin uygun katı ve sıvı besiyerlerine ekimlerinin yapılarak, 37°C de nemli bir ortamda, en az 5-7 gün inkube edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. İlk izolasyon için sıvı kültürlerin daha iyi sonuç verdiğini, ancak ilk kültürlerin başarılı olmayabileceğini, 3-5 gün aralıklarla sıvı besiyerine yapılan 2 veya 3 seri pasajların izolasyon şansın arttırabileceği belirtmişlerdir (26, 71, 75, 85). Rosenfield (100), infekte hayvanlardan alınan örneklerin ekimleri sonrasında, *M. gallisepticum'* un izolasyonunun diğer mycoplasmalar tarafından inhibe edilebildiğini ya da etken sayısı az olduğunda izolasyonun gerçekleşemediğini bildirmiştir. Bu nedenle araştırmacı izolasyon için alternatif bir yol olarak canlı hayvana inokulasyonu denemiş ve infekte bir sürüdeki hindinin tracheal örneğinden direkt ekim yaparken, aynı hayvanın nasal sinus eksudatını başka bir hindiye inokule etmiş ve bu işlemi 3 kez tekrarlamış, 3. pasajdan sonra besiyerine ekim yapmıştır. Direkt ekim sonucu etkenin izole edilemediği ancak pasajlar sonrası yapılan ekim ile etkeni saf olarak izole ettiğini rapor etmiştir. Turner ve Kleven (117), *M. synoviae'* nin da solunum yollarında bulunabildiğini ve *M. gallisepticum'* un üremesini önlediğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların çalışmalarının devamında, genellikle kanatlı mycoplasmalarının izolasyonu amacıyla kullanılan besiyerlerine katılan ve *M. synovia'* nin üreyebilmesi için gerekli olan nicotinamid adenine dinucleotide/ cysteine' nin ilave edilmesini bırakmışlar ve bu şekilde *M. synoviae'* nin üremesini önleyerek *M.gallisepticum'* un izolasyonunu gerçekleştirebilmişlerdir

Besiyerlerinde üremenin daha belirginleştirilmesi için tri-fenil tetrazolium ya da fenol red ve glukoz gibi çeşitli indikatör sistemler kullanılabilmektedir (5, 75, 89, 100). Kleven (59), sıvı besiyerinde glukoz fermentasyonu ile renk

değişimi gözlenen kültürlerin bekletilmeden pasajlanması gerektiğini, aksi halde pH' nın düşmesi nedeniyle bakterinin ölebileceğini bildirmiştir.

M. gallisepticum şüpheli kolonilerin sferoblast ve protoplastlardan ayırt edilmeleri için kültürlerin en az üç kez antibiyotiksiz besiyerlerine pasajlarının yapılması gerekmektedir (26, 95). Bu pasajların izolatin tekrar eski formuna dönme yeteneğini kaybetmesi ve kalıcı L-fazına dönüşmemesi için, izolasyonu takiben en kısa sürede, yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (97).

M. gallisepticum' un identifikasyonu amacıyla glukoz, maltoz, sukroz, trehaloz, laktoz ve mannitol gibi birçok karbonhidrat fermentasyonu testleri ile birlikte; fosfataz, arjinin ve jelatin hidrolizi, koagule serum ve kazein sindirim testleri, film ve spot oluşturma testi, tetrazolium redüksiyonu testleri yapılmaktadır (4, 10, 43, 85, 100, 128).

Araştırmacılar *M. gallisepticum* infeksiyonlarının tanısında kültürün çok önemli ve gerekli olduğunu belirtmişler ve sürüde infeksiyonun varlığının saptanmasının yanında, işletmedeki *M. gallisepticum* suşunun özelliklerinin, patojenitesinin, antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanmasının da mümkün olduğunu vurgulamışlardır (18, 51, 56, 106). Ancak izolasyon ve identifikasyon çalışmalarının zorluğu ve uzun sürmesi, ortamdaki apatojen mycoplasmaların ve diğer mikroorganizmaların üremeyi önlemesi nedeniyle, infeksiyonun tanısı ve sağaltımın başlatılması için serolojik testler önem kazanmıştır (2, 15, 22, 56). Araştırmacılar bu amaçla lamaglutinasyon testi, lateks aglutinasyon testi, hemaglutinasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testi, komplement fikzasyon testi, indirek hemaglutinasyon testi, coombs antiglobulin testi, agar-jel diffuzyon testi, fluoresans antikor testi, üreme inhibisyon testi, metabolik inhibisyon testi, flow cytometry, mikroimmunofluoresans, avidin-biotin, dot immunobinding assay, indirekt immunoperoksidaz yöntemleri gibi birçok testin kullanıldığını bildirmişlerdir (14, 15, 56, 83, 95, 98, 114).

Pratikte, lam aglutinasyon testinin işletmedeki infekte hayvanların saptanmasında, HI testinin ise infeksiyonun varlığının doğrulanmasında kullanılmaktadır (27, 45, 56, 71, 105). Araştırmacılar, lam aglutinasyon testinde sıklıkla yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlarla karşılaşıldığını belirtmişler,

bu nonspesifik reaksiyonların kontamine olmuş ya da dondurulduktan sonra kullanılan serumlarda, *M. synoviae* ile infekte ya da *Erysipelothrix rhusiopathiae* bakterini inokule edilmiş tavuklardan alınan serumlarda gözleendiği bildirilmiştir (15, 22, 27, 71, 98, 129). Olson ve ark.(92) *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* arasında antijenik yakınlık olduğunu, *M. synoviae* ile infekte edildikten sonra *M. gallisepticum* antijeni ile test edilen hayvanlarda sıklıkla kross reaksiyonların gözleendiğini saptamışlardır. Ewing ve ark. (28), *M. synovia* izole edilen tavukların kan serumlarının *M. gallisepticum* yönünden lam aglutinasyon testi ile incelendiğinde, %15' inde non-spesifik reaksiyonların görüldüğünü rapor etmişlerdir. Snell ve Gullen (110) lam aglutinasyon testi ile özellikle *M. synoviae* infeksiyonunun ilk devrelerinde kross reaksiyonların görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu nedenle araştırmacılar sonuçların HI testi ile doğrulanması ve farklı zamanlarda birkaç kez örnek alınması gerektiğini vurgulamışlardır (28, 110).

Yetiştiricilikte viral ve bakteriyel hastalıklar için kullanılan inaktif aşılardan, lam aglutinasyon testinde non-spesifik reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (14, 71, 129). Roberts (98), ticari olarak üretilen inaktif avian encephalomyelitis, Newcastle ve infectious bronchitis aşılardan uygulanmasından 1 hafta sonra yapılan lam aglutinasyon testi sonucunda, non-spesifik reaksiyonlar görüldüğünü ve 3 hafta içerisinde bu reaksiyonların sonlandığını saptamışlardır. Cullen ve Timms (22) benzer bir çalışmada, *M. gallisepticum* dan ari tavukları, 4 farklı inaktif adjuvantlı aşı ile aşılamışlar(3., 9., ve 16. haftalarda), 21 hafta boyunca kan serumlarını lam aglutinasyon, HI ve lateks anti-globulin testi ile incelemişler; lam aglutinasyon ve lateks anti-globulin testi ile incelenen serumlarda, hayvanlar 20 haftalık olana kadar yanlış pozitifliğin gözleendiğini rapor etmişlerdir. Mycoplasma infeksiyonları yönünden serolojik testlerin çoğunun hayvanların 20 haftalık olana kadar geçen dönem içerisinde yapıldığını, bu nedenle inaktif aşıardan kaynaklanan yanlış pozitifliklerin pratikte çok önemli olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar lam aglutinasyon testinde yetiştiricilikte kullanılan aşılardan nedeniyle oluşan yanlış pozitifliklerin tanıyı yanıltmasının, sonuçların HI testi ile karşılaştırılmasıyla önlenebileceğini belirtmişlerdir (22, 129)

Bazı araştırıcılar lam aglutinasyon testinde gözlenen yanlış pozitifliklerin başka bir nedeninin, antijenin üretilmesinde kullanılan besiyerinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Besiyerindeki serum bileşiklerindeki globulinlerin mycoplasma hücrelerinin membran yüzeyine absorbe olması ve bu absorbe globulinlerin şüpheli serumdaki anti-globulinlerle reaksiyona girmesi sonucu pozitif reaksiyonların oluştuğunu, bu nedenle *M. gallisepticum* antijeni hazırlanmasında globulin içermeyen besiyerlerinin kullanılmasının daha uygun olduğunu belirtmişlerdir (1, 8, 59). Ahmad ve ark.(1, 2), serum yerine yapay lipozom ve bovine serum albumin ilave edilmiş besiyerlerinde üretilen antijenlerle uyguladıkları lam aglutinasyon testi ile bu görüşü doğrulayan sonuçlar almışlardır. Snell (109) lam aglutinasyon testi antijeninin hazırlanması amacıyla kullanılan besiyerindeki glukoz ve serum oranlarının, lam aglutinasyon testinin spesifitesi ve sensitivitesi üzerine etkisini incelemiş ve bu oranların testin sensitivitesinde az da olsa etkisi olduğunu ancak spesifitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını saptamıştır.

Bazı araştırıcılar lam aglutinasyon testindeki non-spesifik reaksiyonları önlemek için, serumun ısıyla inaktivasyonunu, 2-mercaptoetanol ile ya da FTS ile dilusyonunu önermişlerdir (22, 52, 59, 114, 129). Ancak, Cullen ve Timms (22) antikor oluşumunun yeni başladığı ya da düşük olduğu hayvanlara ait serumlarda, bu dilusyon işlemleri sonrasında yanlış negatifliklerin oluşabileceğini vurgulamışlardır.

Araştırıcılar lam aglutinasyon testinin, hastalığın erken devrelerinde pozitifliği saptamada hemaglutinasyon inhibisyon ve ELISA' ya oranla daha üstün olduğunu, bunun nedeninin de lam aglutinasyon testi ile IgM' lerin saptanması olduğunu bildirmişlerdir. İnfeksiyonun daha ileri devrelerinde diğer testlerin de aynı oranda duyarlı sonuçlar verdiğini ve bunun yanında lam aglutinasyon testine oranla daha spesifik olduklarını belirtmişlerdir (8, 56, 94). Hemaglutinasyon-inhibisyon testinin, lam aglutinasyon testine oranla zaman alıcı ve daha pahalı bir test olmasına karşın daha duyarlı olduğunu belirten Sahu ve Olson (101), 43.040 kan serumunu lam aglutinasyon testi ile, pozitif bulunan 53 serumun hepsini ve negatif olan serumların da tesadüfi olarak seçtikleri 1233

adedini HI testi ile incelemişlerdir. Lam aglutinasyon ile pozitif 53 serumdan sadece 5' inin HI titrelerinin pozitif olduğunu, ayrıca lam aglutinasyon testi ile negatif bulunan serumların da %2.86' sının HI testi ile pozitif olduğunu saptamışlardır.

Tavuklarda doğal infeksiyonların hepsinin tipik *M. gallisepticum* suşlarından kaynaklanmadığı ve varyant suşların da hastalığa neden olabilecekleri ve bu durumun tanıda sorun yaratabileceği bildirilmiştir (52, 57). Tipik *M. gallisepticum* suşları ile infekte edilen tavukların kan serumları, ELISA ve ticari lam aglutinasyon antijenleri ile incelendiğinde, yüksek oranda pozitiflik saptanırken aynı kitlerle variant *M. gallisepticum* inokule edilmiş hayvanlarda düşük bir pozitiflik saptandığı rapor edilmiştir (52).

Ewing ve ark. (28), prevelansın yüksek olduğu işletmelerde *M. gallisepticum* infeksiyonunun tanısında kullanılan HI testi ve ELISA arasında istatistiki olarak fark bulunmadığını, ancak günümüzde ticari ELISA kitlerinin çıkması ve kullanım kolaylığı ve HI testinde kullanılacak antijeninin hazırlanmasındaki zorluklar nedeniyle, ELISA' nın daha çok tercih edilebileceğini bildirmişlerdir. Prevelansın orta derecede ve düşük olduğu popülasyonlarda ise, ELISA' nın daha güvenilir olduğunu vurgulamışlardır.

Lam aglutinasyon testinde gözlenen yüksek orandaki non-spesifik reaksiyonlar, tüp aglutinasyon testinde çok miktarda antijen gereksinimi, HI testinin de diğerlerine göre daha az duyarlı olması, kanatlı mycoplasmalarının tanısını oldukça zorlaştırmakta ve başka serolojik testlerin araştırılmasına gerek duyulmaktadır (15, 80, 83). Nonomura ve Yoder (89), bu tanı yöntemlerine alternatif olarak AGP' yi, Lin ve Kleven (80) mikroaglutinasyon (MA) testini, May ve ark. (80) flow cytometry yöntemini, Esendal ve ark.(27) Immunocomb test kitini kullanmışlardır. Patten ve ark. (94), *M. gallisepticum* ve *M. synoviae*' ye karşı oluşan spesifik antikorları saptamak için, ureaz konjuge koyun anti-tavuk IgG kullanılarak yapılan ELISA' nın lam aglutinasyon testi kadar duyarlı ve ondan daha spesifik olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmacılar, serolojik testlerde poliklonal antikorlar kullanıldığında, sonuçların yanıltıcı olduğunu saptamışlar, bu nedenle monoklonal antikorları

kullanmayı ve özellikle de *M. gallisepticum*’un değişmeyen epitoplarının saptanıp bunlara karşı üretilen monoklonal antikorların kullanılmasını tercih etmişlerdir(82, 86). Morsy ve ark. (86), lamaglutinasyon testinde kullanılmak amacıyla BALB/c farelerinde *M. gallisepticum* PG31 suşuna karşı ürettikleri monoklonal antikor *M. gallisepticum* antijenlerindeki 35, 90, 95 ve 98 kDa moleküler ağırlığındaki epitopla reaksiyona bırakmışlar ve bunların dot-blot ELISA ve western blot deneyleri ile incelenmesi sonucunda, monoklonal antikorun tüm *M. gallisepticum* suşlarını aglutine ettiğini, kontrol olarak kullanılan 5 farklı Mycoplasma türünü ise aglutine etmediğini saptamışlardır. May ve Branton (82) da tanıda tür spesifik monoklonal antikor kullanarak ELISA yapmışlardır.

Serolojik testlerden bir diğeri olan flouresans antikor tekniğinin (FA) hızlı, duyarlı ve spesifik yöntemlerden biri olmasının yanında, izolatların serotiplendirilmesi için de önerilen bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Bencina ve Dorrer (11), doğal koşullarda infeksiyona yakalanmış ve iyileşmiş, ancak aylarca hastalığın taşıyıcısı olmuş tavukların trachealarından etkeni izole ederken, tracheal mukuslarından hazırlanan frotilerde de FA tekniği ile etkeni serotiplendirdiklerini, infeksiyondan 57 hafta sonra da FA testi ile etkeni saptayabildiklerini belirtmişlerdir. May ve Branton (82), FA ve ELISA’ yı karşılaştırdıklarında, FA ile daha çok identifikasyon gerçekleştirdiklerini ancak ELISA ile daha kısa sürede sonuç aldıklarını, Nonomura ve Yoder (89), FA tekniğinin kompleks ayıraçlara gerek duyması, prosedürünün oldukça detaylı ve pahalı olması, sonuçların hatalı yorumlanma olasılığı gibi dezavantajları olduğunu vurgulamışlardır.

M. gallisepticum kolonilerinin identifikasyonu için de serolojik testlerden yararlanılabilmektedir. Bu amaçla, üreme inhibisyon, koloni inhibisyon, agar jel presipitasyon, immunoperoksidaz, flouresans antikor, immunobinding assay (IBA) teknikleri kullanılabilmektedir (12, 42, 68, 75, 105). Kotani ve McGarrrity (68), IBA tekniğinin her tip kültürde uygulanabilen, bir petri kutusundaki kolonilerden en az 30 farklı antiserumla çalışılabilen ve kısa sürede sonuç alınabilen kolay ve spesifik bir test olduğunu bildirmişlerdir. Imade ve ark. (42),

fluoresans antikor tekniğinde, non-spesifik reaksiyonların görülebildiğini, sonuçların kültür saflaştıktan sonra üreme inhibisyon testi ile doğrulanması gerektiğini, değerlendirmek için özel mikroskoba gerek duyulduğunu bildirmişler ve kolonilerin identifikasyonunda alternatif olarak immünoperoksidaz yöntemini önermişlerdir. Türkarlan(118), mycoplasmaların üremelerinin homolog antikorlar tarafından inhibe edildiğini bildirmiş, kanatlılardan izole edilen *M. gallisepticum* suşları ile keçilerden izole edilen F38 suşlarının identifikasyonunu üreme inhibisyon testi ile yaptıklarında herhangi bir kross reaksiyon saptanmadığını vurgulamıştır. Jordan(44), üreme inhibisyon testi ile üreme presipitasyon testini aynı besiyerinde uyguladığında, özellikle üreme inhibisyon testi ile zonların iyi görülemediği suşların değerlendirilmesinde, presipitasyon testinin çok yarar sağladığını saptamıştır.

Araştırmacılar kültür yönteminin günümüzde hala en güvenilir tanı yöntemlerinden biri olduğunu ve birçok araştırmacının yeni geliştirilen yöntemleri değerlendirirken referans olarak kültürü kullandığını; hastalığın kontrol programlarının geleneksel olarak serolojik testlere ve izolasyona dayandığı ancak her iki yöntemin de dezavantajları bulunduğunu bildirmişlerdir. İzolasyon ve identifikasyon çalışmaları uzun sürmesi, antibiyotik kullanılmış ya da kronik infekte hayvanlardaki izolasyonun daha da zorluğu ve diğer mycoplasmalar tarafından üremenin önlenemediğini vurgulamışlardır (47, 51, 56, 57, 88). Serolojik testlerin sensitivitesi ya da spesifitesinin düşük olduğu ve lam aglutinasyon testinde, etkenin antijenik özelliği nedeniyle *M. gallisepticum* izole edilen hayvanlarda bile yanlış negatifliklerin görülebileceği rapor edilmiştir (83). Bu nedenle de birçok araştırmacı son yıllarda moleküler tanı yöntemlerinden yararlanmışlar ve özellikle PCR yöntemini kullanmaya başlamışlardır (41, 54, 56, 71, 88, 106). Araştırmacılar, sonucun kısa sürede alınması ve güvenilirliği, antibiyotik kullanımıyla ilgili yanıltıcı sonuçlardan ve sekonder bakteriyel kontaminasyonlardan etkilenmemesi, kültür ya da serolojik yöntemlerle tür ayrımı yapılamayan *M. imitans* ve *M. gallisepticum* un ortaya konması ayrıca *M. gallisepticum* un saha suşları ile F aşısı suşunun ayrımının yapılabilmesi gibi çok

önemli nedenlerden dolayı PCR yöntemini tercih etmektedirler (71, 87, 105, 106).

Kleven (60), aynı görüşleri paylaşmış ancak inceledikleri olguların %5' inde serolojik sonuçların PCR yöntemini doğrulamadığını vurgulamıştır. Araştırmacı *M. gallisepticum* saha izolatlarının doku tropizmi, virulensi, antijenik ve genetik yapısı arasında farklılıklar olabileceğini ve düşük virulense sahip birçok *M. gallisepticum* suşun az antikor uyarımı oluşturabileceğini ve bu nedenle diğer yöntemlerle saptanamayıp, PCR ile saptanabilen bazı *M. gallisepticum* saha suşlarının olabileceğini bildirmiştir.

Slavik ve ark. (108) deneysel olarak infekte edilen tavuklarda kültür ile PCR sonuçlarını karşılaştırdıklarında 3. ve 5. haftalardaki sonuçların birbirlerine yakın olduğunu, PCR' in daha kısa sürede sonuçlanması ve daha spesifik olması nedeniyle kültürün yerine geçebilecek bir tanı yöntemi olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar *M. gallisepticum*' un PCR ile tanısında tracheal swab örneklerinin trachea yıkantı sıvılarından daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Kempf ve ark.(55) PCR ile % 97 oranında pozitiflik saptarken, kültür ile belirlenen pozitiflik oranının % 67 olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle kültür ile saptanamayacak kadar az bakterinin olduğu durumlarda PCR yöntemi ile pozitifliğin ortaya konduğunu ve bu nedenle PCR'in duyarlı bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır.

Kempf ve ark. (54) *M. gallisepticum* ile infekte edilmiş ve sonra da antibiyotikle sağaltıma başlanmış tavuklardan farklı zamanlarda alınan 80 tracheal swab örneklerinden kültür ile 14, PCR ile 20 pozitif sonuç elde ettiklerini ve bu sonuçların birbirine yakın olduğunu ancak önemli noktanın, kültür çalışmaları ile pozitifliğin en son olarak inokulasyondan 26 gün sonra alınması, bundan sonra sürüdeki infeksiyonun belirlenememesi, buna karşın PCR ile son pozitifliğin 54. günde saptanabilmesi olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonucu PCR' in yüksek sensitivitesine ve üreyemeyecek kadar az etken ya da sağaltım sonrası ölmüş bakterileri saptayabilme yeteneğine bağlamışlardır.

Khan ve Kleven (57) infekte bir çiftlikteki tavukların kan serumlarını aglutinasyon testi ile incelediklerinde *Mycoplasma synoviae* ile kross reaksiyon

vermelerine karşın, tracheal yıkıntı sıvılarından PCR ile hiçbir sorun yaşanmaksızın etkeni saptamışlardır. Salisch ve ark. (106), tanıda serolojik sonuçların ve patolojik bulguların yanıltıcı olabileceğini, serolojik bulguları pozitif olan 42 tavuktan etken izolasyonunun gerçekleşmediğini ve PCR sonuçlarının da negatif olduğunu rapor etmişlerdir. Sağlıklı piliçlerin, infeksiyonun enzootik olarak seyrettiği kümeslere katıldığında çok kısa sürede infekte oldukları ve bu durumun ilk birkaç hafta serolojik testler ve kültür ile ortaya çıkarılamadığı, ancak moleküler tanı yöntemlerinin iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (55, 57). Araştırmacılar, kontamine hücre kültürlerinde mycoplasmaların saptanmasında ve canlı virus aşılarında *M. gallisepticum* kontaminasyonunun belirlenmesinde PCR' in oldukça spesifik, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu önermişlerdir (41, 66, 67,96).

Araştırmalar PCR yönteminin avantajlarını ortaya çıkardıkça, konu üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır. Bu amaçla birçok araştırmacı farklı primer setleri kullanarak spesifiteyi arttırmaya çalışmışlardır (70, 87). Wang ve ark. (125), 4 farklı oligonukleotid primerleri kullanarak tek bir PCR reaksiyon karışımı ile hem cins hem de kanatlılarda infeksiyona yol açan 4 türün ayrımını yapmışlardır. Santha ve ark.(107) PCR yönteminde 800 bp (base-pair)' lik DNA parçasını kullandıklarında, farklı 9 mycoplasma türü ile herhangi kross reaksiyon gözlenmediğini saptamışlardır. Keeler ve ark. (50) ile Dohms ve ark. (24) PCR yönteminde cytoadhesin genini kullandıklarını bildirmişlerdir. Fernandez ve ark. (30) *M. gallisepticum* ve *M. synoviae*' nin sahip olduğu 16S rRNA' nın değişken bölgesini tamamlayan iki oligonukleotid probunu hibridizasyon çalışmalarında başarıyla kullanmışlardır. Liu ve ark. (79), moleküler tiplendirme amacıyla, faz-değişken putative adhezin protein(PvpA)'i kodlayan *M. gallisepticum* spesifik genini saptamak için PCR yöntemini kullandıklarını bildirmişlerdir. Nascimento ve ark. (87), sürüdeki *M. gallisepticum* şusunun aşılarında kullanılan F suşundan ayrımını yapabilmek amacıyla PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Kempf ve ark. (54), infeksiyonun görüldüğü bir işletmede sağaltıma yanıtın çok daha iyi anlaşılması için mRNA' nın incelenmesi gerektiğini, çünkü mRNA' nın ömrünün çok kısa

olduğunu ve PCR ile saptanmasının hala canlı mikroorganizmanın bulunduğunun göstergesi olduğunu vurgulamışlardır.

PCR yönteminin gelişmesiyle birlikte, ticari kitlerin de üretimi başlamıştır (60, 61, 76, 78, 96). IDEXX DNA probe based kiti ile çalışan Ley ve ark. (76, 78) kitin, kit içerisinde tanımlanmayan (Probu olmayan) hiçbir mycoplasmayı tanınamaması yani kross reaksiyonun olmaması, sonucu yanlış kontaminant bakterilerle karışmaması, izole edilemeyecek sayıdaki bakterilerin saptanması gibi birçok önemli özellikleri olduğunu ortaya koymuş, ancak bazı araştırmacılar tarafından ekonomik yönden pahalı bulunduğunu belirtmişlerdir. Salisch ve ark.(105) da kitin özellikle diğer mycoplasmalarla miks infeksiyonların tanısında önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Tüm bu avantajlarının yanı sıra, araştırmacılar PCR yöntemi ile sadece bilinen Mycoplasma türlerinin identifiye edilebildiğini, yeni türler, patojenite ve antibiyotik duyarlılığı gibi biyolojik özelliklerini saptamak için konvansiyonel yöntemlerin kullanılması gerektiğini vurgulamıştır (51,130).

Ülkemizde CRD infeksiyonunun varlığı ilk kez 1956 yılında Özkal tarafından bildirilmiştir (5). Atılgan ve Yeşilada (6), 415 tavuk serumunun 130 adedinde (% 31.3) pozitiflik saptamışlardır. Esendal (26), Ankara çevresinde incelenen 900 tavuk serumunun lam aglutinasyon testi ile 182 (%20.22)' sinde, hemaglutinasyon inhibisyon testi ile 128 (%14.22)' sinde, agar jel presipitasyon ile 51(%5.67)' sinde, ELISA ile de 543 (%60.35)' inde pozitiflik saptadığını bildirmiştir. Ülgen (120), Bursa ve çevresinde incelenen 137 tavuğa ait örneklerden 15' inden *M. gallisepticum* izole edildiğini, yine aynı çalışmada incelenen 499 kan serumundan, lam aglutinasyon testi ile 242, hemaglutinasyon testi ile 263 pozitif serum saptandığını bildirmiştir. Güler(35), Konya yöresinde hastalıktan şüpheli 40 işletmeden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda 126 tavuğun 19 (%15.06)' undan *M. gallisepticum* izole edildiğini rapor etmiştir.

M. gallisepticum sağaltımında fluoroquinolonlar ve erythromycin oldukça etkili bulunmaktadır (53, 97). Ortiz ve ark. (93) enrofloxacin ve daha az etkili olmakla birlikte lincomycin/ spectinomycin kombinasyonunun yumurta yolu ile bulaşmayı önemli oranda azalttığını bildirmişlerdir. Antibiyotiklerin devamlı

kullanılmasıyla direncin oluştuğunu, bu nedenle de alternatif antibiyotiklerin bulunmasının yararlı olacağını bildiren Jordan ve ark. (1996) tilmicosin ve tylosin' i karşılaştırdıklarında tilmicosin' in, bunu takip eden yıllarda yaptıkları başka bir çalışmada valnemulin' in daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (47, 48, 49, 72). Japonya' da tylosin'e dirençli suşların gözlendiği rapor edilmiştir (116).

CRD' nin kontrolü, tanı konularak hastalıklı hayvanların ayrılması, aşılama ve antibiyotik sağaltımına bağlı olarak bulaşmanın ve hastalık semptomlarının en aza indirilmesi ile sağlanır (45). Hastalığın kontrolünde en tercih edilen yöntem hastalığın eradikasyonudur. Bu da genellikle sürünün serolojik testlerle devamlı kontrolü ve hasta sürülerin imhası ile yapılmaktadır (24, 61, 103). Ancak özellikle az gelişmiş ülkelerde tavukçuluk sektöründe faklı yaştaki hayvanların birarada bulundurulması, eradikasyonu oldukça zorlaştırmaktadır (65, 103, 105).

M. gallisepticum 'a karşı bağışıklık oluşturmak için canlı aşıların yanısıra bakterinler de kullanılmaktadır. Aşı, yumurtacı tavuklarda yumurta verimindeki düşüşü ve damızlıklarda yumurta yolu ile bulaşmayı azaltmak amacıyla kullanılmakta, aynı zamanda solunum belirtileri ve hava kesesi infeksiyonlarından korunmayı sağlamaktadır (61, 64, 123).

Virulent *M. gallisepticum* S6 ve R suşları canlı aşı hazırlanmasında kullanılmış, yüksek oranda bağışıklık oluşturdıkları saptanmış ancak bu suşların sistemik invazyon özellikleri aşılar da kullanımlarını önlemiştir (123). En sıklıkla kullanılan canlı aşı suşu *M. gallisepticum* F suşudur (58, 64). Doğal koşullarda *M. gallisepticum* F suşunun tavuklar için orta derecede virulent olduğu, üst solunum yolunu etkilediği, sürüler arasında daha yavaş yayıldığı bildirilmiştir. Devamlı canlı aşı kullanılması sonucu F suşunun orijinal saha suşlarının yerine geçtiği, bir süre sonra işletmede sadece F suşunun görüldüğü, daha az virulent olması ve kullanılan antibiyotiklerin çoğuna duyarlı olması nedeniyle bu yer değiştirmenin eradikasyon çalışmalarının ilk aşaması olarak sayılabileceği belirtilmiştir (34, 58, 61, 64, 65, 123). Broyler yetiştiriciliğinde hayvanların 45-50. günlerde kesime sevk edilmesi nedeniyle ve işletme ekonomisi düşünülerek aşı uygulaması çoğu kez yapılmamaktadır (65).

Gibbs ve ark. (34), bazı araştırıcıların F suşu ile aşılanmış kümeslere sonradan katılan tavukların hastalanmalarından aşının sorumlu olabileceğini bildirmelerine karşın, yaptıkları araştırmada F suşu aşılarının sahadaki *M. gallisepticum* salgınlarının başlıca kaynağı olmadığını vurgulamışlardır. Levisohn ve ark. (74), yumurtacı tavukların F suşu ile aşılanmalarının herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını, aşılanmış hayvanların bulunduğu bir kümese aşılanmamış hayvanların katılmasını takiben ancak 17 hafta sonra bulaşma olduğunu saptamışlardır. Canlı aşıların patojeniteleri üreticiler için sorun oluşturmakta bu nedenle daha güvenilir aşılara gereksinim duyulmaktadır. Araştırıcılar, tavuklarda nasal boşluk ve alt solunum yolu ısılarının farklı olmasından yola çıkarak, *M. gallisepticum*' un S6 suşunu nitrosoguanidine ile zayıflatıp ısıya duyarlı ts37, ts102 ve ts 100 mutantlarını oluşturmuşlardır. Bu apatojen ve orta derecede patojen ısıya duyarlı mutantların üst solunum yolu sıcaklığında reyebildikleri ve immun yanıt oluşturdukları, ancak alt solunum yolu mukozası sıcaklığında reyemedikleri, bu nedenle hastalık oluşturamadıkları ve böylece yeterli korumanın sağlanabileceği önermişlerdir (69, 112, 116, 123). Araştırıcılar, F suşu ile hazırlanan aşıların dışında, apatojen ve diğer sürülere yayılma tehlikesi olmayan ts-11 ve 6/85 suşları ile hazırlanan canlı aşıların bulunduğunu belirtmişlerdir (60, 103, 117). Turner ve Kleven (117) ts-11 suşunun özellikle daha önce F suşu ile aşılanmış sürülerde hastalığın kontrolü açısından oldukça iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Bazı araştırıcılar da l aşıların etkisi üzerinde çalışmalara yönelmiştir. Hayatsu ve ark. (38), araştırıcıların formalinle öldürülmüş mycoplasma aşılarının 1 günlük civcivlerin hava keselerine inokulasyonları sonucunda, hava kesesi infeksiyonlarının nlendiğini saptadıklarını bildirmişler, l *M. gallisepticum* aşısının intramuskuler (IM) uygulanmasının belirgin bir koruma sağlamadığını, aşının solunum yolu içerisine verilmesiyle deneysel infeksiyonlarda koruma sağladığını belirtmişlerdir. Hildebrend ve ark. (39), deneysel olarak bakterin uygulanmış hayvanlarda, *M. gallisepticum* S6, R, PG31 ve 1150 suşlarının sinus içi inokulasyonları sonrasında klinik bulguların oluşmasının nlendiğini saptamışlardır.

Saha çalışmalarında, bakterinler ile aşılanmış tavukların, düşük virulensli F suşu aşilarla aşılanan hayvanlara oranla yumurta veriminin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (39, 65). IM ve intratracheal yolla oluşturulan bağışıklığın, sadece IM uygulamaya oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (127)

Avaikan ve Ley (7) *M. gallisepticum* inokule edilmiş tavuklarda, etkenin üst ve alt solunum yolu ve nasal sinüslara yerleştiğini ve tavuklarda bu bölgelerde IgA, IgG ve IgM üretildiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu antikorların bulunduğu alt ve üst solunum yolu yıkantı sıvılarının alınarak tracheal organ kültürlerinde bulunan silialı epitellerin *M. gallisepticum* ile ilişkisini incelediklerinde, organ kültüründeki epitellerin antikorlar sayesinde etkenden zarar görmediklerini belirlemişler ve bu çalışmaların hastalıktan korunmada önemini vurgulamışlardır.

Jordan (45), bir işletmenin mycoplasmadan arı olduğunun söylenebilmesi için, sürüde ve onu takip eden iki generasyonda da infeksiyon görülmemesi gerektiğini bildirmiştir.

National Poultry Improvement Plan (NPIP)' a göre, koruma ve kontrol için, yetiştiricilik yapılan kümeslerde sürüye sonradan hayvan katılmaması, gerekli olan serolojik testlerin rutin olarak uygulanması ve infekte sürülerin kesime gönderilmesi gerektiği belirtilmiştir (71). Ülkemizde *M. gallisepticum* infeksiyonunun kontrolü için Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı' nın kuluçkahane ve damızlık işletmelerinin sağlık kontrol yönetmeliği uygulanmaktadır (115).

Günümüzde ticari işletme sayısının düzensiz olarak artması, farklı yaşta ve türde hayvanların bir arada bulundurulması, sürüye sonradan hayvan katılması sonucunda birçok olumsuzluklar ortaya çıkabilmektedir. Bu tür çiftliklerde antibiyotikle sağaltım yapılarak verim kaybı ve diğer klinik semptomlar azaltılmaya çalışılmaktadır. Ancak araştırmacılar antibiyotik sağaltımının infeksiyonu yok etmediğini sadece sorunları geçici olarak çözdüğünü vurgulamaktadırlar (71, 123).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasında gereç ve yöntem aşağıdaki plana göre uygulanmıştır.

3.1. GEREÇ

3.1.1. Örnekler

A. *Trachea örnekleri*

swab ile sürüntü alındı



Mycoplasma buyyon içerisinde 30 sn karıştırıldı.



1.5 ml' si PCR için ayrıldı. -20° C de saklandı



1 ml'si kültür için ayrıldı

B. *Kan serumu örnekleri*

3.1.2. PCR

Flockcheck™ *Mycoplasma gallisepticum*

DNA-probe Based Test Kit

3.1.3. Besiyerleri

A. *İzolasyon besiyerleri*

A.1. Mycoplasma buyyon

A.2. Mycoplasma agar

B. *Biyokimyasal test besiyerleri*

B.1. Glukoz fermentasyon test besiyeri

B.2. Tetrazolium redüksiyon testi besiyeri

B.3 Arjinin hidroliz testi besiyeri

B.4. Film ve spot oluşturma test besiyeri

B.5. Digitonine duyarlılık test besiyeri:

C. *Hiperimmunizasyon antijeni*

hazırlama besiyeri

3.1.4. Referans Suşlar

3.1.5. Boyalı Plate Test Antijeni

Mycoplasma plate test antijeni (MG Antigen -Nobilis)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. PCR

- A. DNA ekstraksiyonu
- B. DNA'nın amplifikasyonu
- C. DNA'nın saptanması

3.2.2. Kültür

A. İzolasyon çalışmaları

Mycoplasma buyyona ekim

↓ 3 gün inkubasyon

Mycoplasma buyyona pasaj

↓ 3 gün inkubasyon

üreme varsa Mycoplasma agara pasaj

üreme yoksa Mycoplasma buyyona pasaj (*)

↓ 3 gün inkubasyon

Mycoplasma agara pasaj

Agarlar 4. günden sonra koloni oluşu yönünden incelendi.

Üreme varsa Mycoplasma agara pasaj

14 güne kadar üreme olmayan kültürler negatif

L-formlarından ayırtetmek için pensilinsiz Mycoplasma agara pasaj (3 kez)

biyokimyasal testler için Mycoplasma buyyona pasaj

(*)= Bu işlem üreme olmadığı durumlarda 3 kez tekrarlandı.

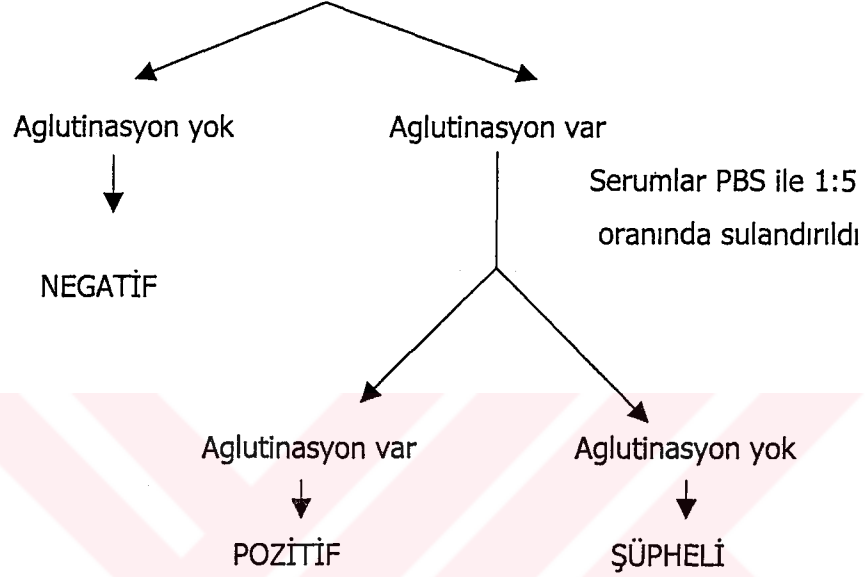
B. İdentifikasyon çalışmaları

B.1. Biyokimyasal testler

B.2. Üreme İnhibisyon testi

3.2.3. Serolojik Test (Lam aglutinasyon testi)

Kan serumu örnekleri ile lam aglutinasyon testi



3.1. GEREÇ

3.1.1 ÖRNEKLER

Marmara Bölgesi' nde infeksiyonun tahmini prevelansı % 50 kabul edilerek, % 95 güven düzeyi ve % 10 absolut kesinliğe göre (23), tesadüfi örnekleme ile 54' ü Akyazı, Silivri, Çatalca ve Kaynarca yörelerindeki değişik işletmelerden İstanbul kesimhanesine ve Bandırma yöresinden Bandırma kesimhanesine gönderilen, 42' si Çatalca, Gebze ve Malkara' daki çeşitli işletmelerden olmak üzere toplam 96 tavuğun tracheayı kapsayan boyun kısımları ve kan örnekleri kesim sırasında alındı. Örnek alınan tavuklar 2-7 haftalık yaşlardaydı. Örnek alınan tavukların yaşları ve kaynaklarına göre dağılımı Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

A. Trachea örnekleri: Tracheayı kapsayan boyun kısımları gamma steril örnek poşetlerine konularak soğuk zincir altında laboratuvara getirildi ve steril petri kutularına aktarıldı. Boyun derisi yüzülerek trachea açığa çıkarıldı. Tracheanın orta bölgesinin yüzeyi spatül ile dağlandıktan sonra, steril bistüri ile kesit açılarak bir gece önceden Mycoplasma buyyon içinde bekletilmiş swablar ile trachea mukozasından sürüntü alındı ve 3 ml Mycoplasma buyyon içeren tüplere aktarılaraq 30 saniye süreyle vorteksle karıştırıldı. Elde edilen süspansiyonun 1 ml' si *Mycoplasma gallisepticum* izolasyonu için bakteriyolojik olarak, 1 ml' si spesifik DNA' nın saptanması amacıyla PCR yöntemi ile incelendi (105).

B. Kan serumu örnekleri: Kan örnekleri de soğuk zincir altında Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi, santrifüje edilerek serumları ayrıldı ve bekletilmeden lam aglutinasyon testi ile incelendi

Tablo 3.1 Örnek alınan tavukların yaşları ve kaynaklarına göre dağılımı

GRUP NO	KAYNAK	YAŞ	SAYI
1	Akyazı	6,5 haftalık	6
2	Silivri	6 haftalık	6
3	Çatalca	2 haftalık	6
4	Çatalca	3,5 haftalık	6
5	Gebze	3,5 haftalık	6
6	Gebze	5,5 haftalık	6
7	Bandırma	6 Haftalık	12
8	Çatalca	7 haftalık	10
9	Akyazı	6 Haftalık	10
10	Adapazarı	6,5 haftalık	10
11	Malkara	4 haftalık	10
12	Malkara	3,5-4 haftalık	8

3.1.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tracheal swab örneklerinde *Mycoplasma gallisepticum*'a ait spesifik DNA'nın saptanması amacıyla *Mycoplasma gallisepticum* DNA based Probe Test Kit (Flockcheck, IDEXX) kullanıldı.

PCR kitinin içeriği

Mycoplasma gallisepticum DNA based Probe Test Kit (Flockcheck, IDEXX):

- Naylon membran
- Blocking solusyonu
- 6 X Blot Wash 1 Solusyonu
- 6 X Blot Wash 2 Solusyonu
- 6 x Substrate Buffer
- *M. gallisepticum* Vir/F Conjugate

- *M. gallisepticum* PCR Mix-1
- *M. gallisepticum* PCR Mix-2
- Sample Wash Solusyonu
- Substrate A
- Substrate B
- Pozitif kontrol

Diğer gereçler

- 1.5 ml' lik vidalı kapaklı mikrosantrifüj tüpü (Deltalab-409110.2)
- 0.5 ml' lik PCR tüpü, DNase ve RNase free (Deltalab-4092.1N)
- Mineral yağ (Sigma- M5904)
- Isıya dayanıklı poşet (Deltalab-200303)
- Thermocycler (Biometra)

3.1.3. BESİYERLERİ

A. İzolasyon Besiyerleri

A.1. Mycoplasma Buyyon

Trachea mukozasından örnek alınmasında kullanılan swabların ıslatılması, tracheal örnek süspansiyonlarının hazırlanması ve izolasyon çalışmaları için Mycoplasma Buyyon hazırlandı. Bu amaçla Mycoplasma Broth Base' e at serumu, yeast ekstrakt, fenol red (% 0.1), glukoz, talyum asetat (% 10) ve penisillin G ilave edildi .

Mycoplasma Buyyon

Mycoplasma Broth Base (Oxoid, CM403)	25.5 g
Glukoz (Oxoid, L 71)	10 g
At serumu (Biochrom KG, S 9135)	150 ml
Yeast ekstrakt(Oxoid, L21)	100 ml
Fenol red (% 0.1) (Sigma,P-3532)	25 ml

Talyum asetat(%10) (Sigma, T-8266)	4 ml
Penicillin G Potassium (Sigma Pen-K)	2x10 ⁶ unite
Distile su	750 ml

Hazırlanışı: Mycoplasma Broth Base, glukoz ve fenol red belirtilen miktarlarda tartıldı, 750 ml distile suda eritildi. % 20' lik NaOH ile pH'sı 7.8' e ayarlandı. 121°C de 15 dakika süreyle sterilize edildi. 50°C ye kadar soğutulduktan sonra, talyum asetat, yeast ekstrakt, at serumu ve penicillin G potasyum ilave edildi. Besiyerleri vidalı kapaklı cam tüplere dağıtıldıktan sonra, sterilit kontroleri yapılarak kullanıldı. Sterilit kontrolü için rastgele seçilen tüpler 37°C de iki gün inkubasyondan sonra kontaminasyon sonucu üremeye bağlı renk değişimi ve bulanıklık yönünden incelendi (59).

A.2. Mycoplasma Agar

M. gallisepticum' un izolasyonu, bazı biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testi için kullanıldı. Mycoplasma Agar Base' e at serumu, yeast ekstrakt, glukoz, talyum asetat (%10) ve penisillin G potasyum ilave edildi.

Mycoplasma Agar

Mycoplasma Agar Base (Oxoid, CM401)	35.5 g
Glukoz	10 g
At serumu	150 ml
Maya özü	100 ml
Talyum asetat (%10)	4 ml
Penicillin G Potassium	2x10 ⁶ unite
Distile su	750 ml

Hazırlanışı: Mycoplasma Agar Base ve glukoz belirtilen miktarlarda tartıldı, 750 ml distile suda eritildi. % 20' lik NaOH ile pH' sı 7.8' e ayarlandı. 121°C de 15 dakika süreyle sterilize edildi. 50°C ye kadar soğutulduktan sonra, talyum asetat, yeast ekstrakt, at serumu, penicillin G potasyum ilave edildi. Steril petri kutularına 25' er ml miktarlarında döküldü. Sterilit kontrolü için

rastgele seçilen petri kutuları 37°C de 3 gün süreyle inkubasyondan sonra, kontaminasyon yönünden incelendi (59).

B. Biyokimyasal test besiyerleri

B.1. Glukoz fermentasyon test besiyeri: Glukoz fermentasyonunu saptamak için izolasyon amacıyla hazırlanan Mycoplasma Buyyon kullanıldı (85).

B.2. Tetrazolium redüksiyon testi besiyeri: Bu amaçla glukoz ilave edilmemiş Mycoplasma Agar hazırlandı. Steril distile su içerisinde % 1' lik 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (Sigma T-8877) solusyonu hazırlanarak 0.45 µm membran filtre (Schleicher&Schuell 7P 30/0.45 CA-S) ile sterilize edildi ve Mycoplasma agara son konsantrasyonu % 2 olacak şekilde ilave edildi (85). Tamamen karıştırıldıktan sonra petri kutularına dağıtıldı.

B.3. Arjinin hidroliz testi besiyeri: Glukoz ilave edilmemiş Mycoplasma Buyyona % 1 oranında Arjinin (Sigma A-5131) ilave edilerek besiyerinin pH' sı 7.3' e ayarlandı (85). Vidalı kapaklı tüplere 5' er ml dağıtıldı, sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra +4°C de saklandı.

B.4. Film ve spot oluşturma test besiyeri: Bu amaçla % 20 oranında serum katılmış Mycoplasma Agar kullanıldı (85).

B.5. Dijitonin duyarlılık test besiyeri: Mycoplasma Agar kullanıldı(59, 85).

C- Hiperimmunizasyon Antijeni için selektif besiyeri

Bu amaçla glukoz ve fenol red ilave edilmemiş, at serumu yerine domuz serumu (Sigma,P 9783) ile hazırlanmış Mycoplasma Buyyon kullanıldı (59).

3.1.4. Referans Suşlar

Çalışmada hiperimmunizasyon antijeni hazırlanması için ve biyokimyasal testlerde kontrol olarak *Mycoplasma gallisepticum* PG31 suşu kullanıldı.

PCR' in spesifitesini saptamak için *Mycoplasma gallisepticum* PG31, *Mycoplasma gallinarum* PG16, *Acheloplasma axanthum*, *Mycoplasma synovia* WVU 1853 suşları kullanıldı. Tüm suşlar Dr. Janet Bradbury (University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology)' den sağlandı.

3.1.5. Lam aglutinasyon test antijeni

Lam aglutinasyon testi için antijen olarak boyalı *Mycoplasma* plate test antijeni (MG Antigen -Nobilis) kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1 PCR

PCR yöntemi 3 aşamada gerçekleştirildi.

A. DNA ekstraksiyonu

Trachea örnekleri ve referans suşlardan (*Mycoplasma gallisepticum* PG31, *Mycoplasma gallinarum* PG16, *Acheloplasma axanthum*, *Mycoplasma synovia* WVU 1853) birer ml miktarında hazırlanan süspansiyonlar 1.5 ml' lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 16.000 x g de 10 dakika santrifüje edildi. Üst sıvı döküldü ve dipte kalan tortu üzerine 1 ml *sample wash solusyonu* eklendi. Pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra 16.000 x g de 10 dakika daha santrifüje edildi. Üst sıvı döküldü ve dipte kalan tortu üzerine tekrar 1 ml *sample wash solusyonu* eklendi. 16.000 x g de 10 dakika santrifüje edildi. Üst sıvı, mikrosantrifüj tüpünün içerisinde 10-20 µl' den fazla sıvı kalmayacak şekilde döküldü. Her mikrosantrifüj tüpüne 25 µl *sample wash solusyonu* eklendi. Tüpler 120°C de 10 dakika bekletildikten sonra hemen buz içersine yerleştirildi

ve 10 dakika daha bekletildi. Daha sonra 2 dakika süreyle 16.000 x g' de santrifüje edildi ve DNA ekstraksiyon işlemi tamamlandı. DNA ekstraktlarından 20 µl alınarak steril 0.5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve tüpler tekrar buz içine yerleştirildi.

B. DNA' nın amplifikasyonu

Steril mikrosantrifüj tüplerine 25 µl miktarlarında *PCR Mix-1* ve *PCR Mix-2* konuldu. Üzerlerine birer damla mineral yağ damlatıldı. Bu karışıma buz içerisinde bekletilen DNA ekstraktlarından 3µl ilave edildi. Pozitif ve negatif kontroller de aynı miktarlarda kullanıldı. Tüm mikrosantrifüj tüpleri thermocycler'a yerleştirildi. DNA amplifikasyonu 94°C de 10 dakika, 94°C de 1 dakika (35 siklus), 55°C de 2 dakika (35 siklus), 72°C de 1 dakika (35 siklus) süreyle gerçekleştirildi. 72°C de 1 dakikalık süre 16. – 35. sikluslar arasında her siklus için 5 saniye ilave edilerek 2 dakika 40 saniyeye uzatıldı. Tüpler kullanılıncaya kadar thermocycler içerisinde +4°C de bekletildi.

C. DNA' nın saptanması

Blocking solusyonu, 6 x blot wash 1 solusyonu, 6 x blot wash 2 solusyonu ve substrat solusyonunun ısıları oda ısısına getirildi. 6 x blot wash 1 solusyonundan 40 ml alınıp 200 ml distile su ile karıştırıldı ve *1 x stock wash 1 solusyonu* hazırlandı. Aynı şekilde *1 x stock wash 2 solusyonu* hazırlandı. Her iki solusyon 55°C lik su banyosuna yerleştirildi. 6 x substrat buffer'dan 40 ml alınıp 200 ml distile su ile karıştırıldı, *1 x stok substrate buffer* hazırlandı, kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi. Steril eldiven yardımıyla alınan naylon membran, steril makas yardımıyla 1x11 cm boyutlarında kesilerek üzeri toplam 10 örnek ve 2 kontrolü alacak şekilde kurşun kalemle işaretlendi. Her işaretli bölmeye 3 µl amplifiye edilmiş PCR ürünüden konuldu. Membran, örnekler üstte kalacak şekilde 0.4 N NaOH (Merck,Art.6462) emdirilmiş filtre kağıdı üzerine yerleştirildi, 5 dakika bekletildi. Steril pens yardımıyla alınan naylon membran ısıya dayanıklı poşet içerisine yerleştirildi ve içerisine 5 ml *blocking solusyonu* ilave edildi. Hava kabarcıklarının uzaklaştırılmasından sonra 55°C lik su banyosunda 30 dakika inkubasyona bırakıldı. 50 µl konjugat 5 ml blocking solusyonu ile karıştırıldı. Isıya dayanıklı poşetin içindeki solusyon

döküldü ve *konjugate solusyonu* ilave edildi. 55°C lik su banyosunda 30 dakika daha inkube edildikten sonra poşet içerisindeki sıvı döküldü, naylon membran düz ve derin bir plaka içerisine örnekler altta kalacak şekilde yerleştirildi. Üzerine 120 ml *1 x blot wash 1 solusyonundan* konuldu ve 5 dakika süreyle karıştırıcı üzerinde (Plate Shaker-Cenco) yavaşça karıştırıldı. Solusyon döküldü ve tekrar 120 ml *1 x blot wash 1 solusyonu* konuldu, 5 dakika süreyle karıştırıldı. Solusyon dökülüp yerine 120 ml *1 x blot wash 2 solusyonu* ilave edildi ve 5 dakika süreyle karıştırıldı. Solusyon döküldü ve tekrar 120 ml *1 x blot wash 2 solusyonu* konuldu, 5 dakika süreyle karıştırıldı. Membran farklı bir plaka içerisine yerleştirilip üzerine 120 ml *1 x stok substrate buffer* konuldu ve 5 dakika süreyle karıştırıldı. Solusyon döküldü ve tekrar *1 x stok substrate buffer* konuldu, 5 dakika süreyle karıştırıldı. Son yıkama devam ederken substrat solusyonu hazırlandı. Bu amaçla 25 µl Substrate A ve 25 µl Substrate B, 5 ml 1x Substrate buffer ile karıştırıldı. Yıkama işleminden sonra membran steril pens yardımıyla alınarak temiz bir poşete yerleştirildi. Üzerine substrate solusyonu eklendi. Işıktan korumak amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak 37°C de 30 dakika inkubasyona bırakıldı. Membran poşetten çıkarıldı ve taze hazırlanmış %1' lik glacial acetic asit solusyonu (Carlo Erba reagent, code no:302011) ile hafifçe yıkandı. Membran kuruyana kadar absorban kağıt üzerinde örnekler üstte kalacak şekilde bekletildi.

Değerlendirme

Naylon membran üzerinde renk değişiminin oluşması, *Mycoplasma gallisepticum* DNA' sının varlığını gösterdi. Buna göre membranda örneklerin konulduğu bölümlerde mor renk oluşumu pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirildi.

3.2.2 Kültür

A. İzolasyon çalışmaları

M. gallisepticum' un izolasyonu amacıyla, trachea örneklerinden hazırlanan süspansiyonlardan Mycoplasma buyyonlara ekim yapılarak mikroaerobik koşullarda, 37°C de inkubasyona bırakıldı. Besiyerleri üreme ve kontaminasyon yönünden hergün kontrol edildi. 3 günlük inkubasyon süresince üreme gözlenmeyen besiyerlerinden Mycoplasma buyyonlara pasaj yapıldı ve tekrar aynı koşullarda inkubasyona bırakıldı. Birinci pasajlarda üreme görülmemesi durumunda, aynı işlem iki kez daha tekrar edildi. Son pasajdan 3 gün sonra Mycoplasma agarlara pasaj yapılarak 37°C de, mikroaerobik koşullarda inkubasyona bırakıldı. Mycoplasma buyyonlarda üreme görüldüğü durumlarda direkt olarak Mycoplasma agarlara ekim yapılarak aynı koşullarda inkubasyona bırakıldı. İlk ekimi takiben kontaminasyon gözleendiği durumlarda, kontaminasyonu gidermek amacıyla kültürler 0.45 µm' lik filtre ile süzöldükten sonra aynı şekilde Mycoplasma buyyonlara ve Mycoplasma agarlara pasajları yapıldı.

Tüm Mycoplasma agarlar 4. günden itibaren koloni oluşumu yönünden stereo mikroskopla incelendi. Şüpheli kolonilerden tekrar Mycoplasma agarlara pasajlar yapıldı. Bunun için, koloni bulunan kısımlar besiyeriyle birlikte blok halinde kesilerek, ters çevrilip Mycoplasma agara aktarıldı ve tüm agar yüzeyine süröldükten sonra Mycoplasma agarlar inkubasyona bırakıldı ve koloni morfolojileri incelendi. Şüpheli kolonileri L-formlarından ayırt etmek için, 3 kez üst üste penisilinsiz Mycoplasma agarlara pasajlar yapıldı. Koloni morfolojisinde değışiklik gözlenmeyen kültürlerden etkenin biyokimyasal özelliklerinin saptanması amacıyla tekrar Mycoplasma buyyonlara pasaj yapılarak 72 saat süreyle inkube edildi (120)

B. İdentifikasyon çalışmaları

B.1.Biyokimyasal testler

İzolatların identifikasyonu amacıyla glukoz fermentasyonu, arjinin hidrolizi, dijitonin duyarlılık ve film-spot oluşturma testleri yapıldı. Her izolatin 72

saatlik sıvı kültürü 0.45  m' lik filtrelerle filtre edildikten sonra biyokimyasal testler için uygun besiyerlerine ekimleri yapıldı (59, 85).

a- Glukoz fermentasyon testi

 zolatlardan glukoz fermentasyon besiyerlerine 0.2 ml miktarında ekim yapıldı. 37 C de mikroaerobik koşullarda, 3 gün süreyle inkube edildi. Besiyerinde glukoz fermentasyonunu takiben pH değişimine bağlı olarak sarı rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (85, 120).

b- Tetrazolium redüksiyon testi

 zolatlardan Tetrazolium redüksiyon test besiyerine 0.1 ml ekim yapıldı. Sıvının emilmesi beklendikten sonra, mikroaerobik koşullarda inkubasyona bırakıldı. 3. günden sonra üreme kontrolü yapılmaya ba landı. Üremenin olduğu yerde kırmızı rengin oluşması pozitif olarak değerlendirildi (85).

c- Arginin hidrolizasyon testi

 zolatlardan Arginin hidrolizasyon test besiyerine 0.2 ml miktarlarında ekim yapıldı. 37 C de mikroaerobik koşullarda, 7 gün süreyle inkube edildi. Ekim yapılmamış besiyeri de kontrol olarak inkubasyona bırakıldı. Son gün turnusol kağıdı yardımıyla kültürlerin ve ekim yapılmamış besiyerinin pH' sı kontrol edildi. pH' nın yükselmemesi negatif olarak değerlendirildi. (85).

d- Film ve spot oluşturma testi

Mycoplasma agarlar ekim yapılmadan önce 37 C de 1 saat süreyle yüzeyinin kuruması için bekletildi. Kuruduktan sonra izolatlardan 0.2 ml miktarında ekim yapıldı. Mikroaerobik koşullarda 2 hafta inkubasyona bırakıldı. 48 saat arayla mikroskop altında kolonilerin çevresinde spot oluşumu incelendi.

Son gün, agarın yüzeyine steril distile su dökülerek agar yüzeyinden film tabakasının kalkıp kalkmadığı gözlemlendi (85).

e- Dijitonine duyarlılık testi

Dijitonin emdirilmiş diskler: % 95' lik etil alkol ile % 1' lik dijitonin solusyonu hazırlandı. Bu solusyon, dijitoninin (Sigma D-5628)'i çözündürülmesi amacıyla 55°C lik su banyosunda dijitonin tamamen çözülünceye kadar bekletildi. 0.45 µm' lik filtre ile sterilize edildi. 6 mm çapında kesilen filtre kağıtları 121°C de 15 dakika süreyle sterilize edildikten sonra, her bir diske 25 µl dijitonin solusyonu emdirildi. 37°C de kurutuldu. Kullanılincaya kadar +4°C de saklandı (59, 85).

Testin yapılışı: Mycoplasma agar ekim yapılmadan önce 37°C de 1 saat yüzeyinin kuruması için bekletildi. İzolatların 10⁻² lik dilusyonlardan 0.2 ml alınarak agar yüzeyine yayıldı ve üzerine steril pens yardımıyla dijitonin emdirilmiş diskler yerleştirildi. 37°C de mikraerobik koşullarda inkubasyona bırakıldı. Her gün disklerin çevresinde üreme inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Oluşan zon 5 mm ve daha yukarı çapta ise pozitif olarak değerlendirildi (59, 85).

B-2 Üreme-inhibisyon testi

Hiperimmunizasyon antijeninin hazırlanması: *M. gallisepticum* PG31 suşundan selektif Mycoplasma buyyona ekim yapıldı ve 37°C de 72 saat inkube edildi. Kültürler 16.000 rpm de 1 saat santrifüje edildi. Steril fizyolojik tuzlu su ile 3 kez yıkandı. Son santrifüj işleminden sonra üst sıvı döküldü ve orjinal hacmine göre 100 katı sulandırıldı. Sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra +4°C de saklandı (118).

Hiperimmun serum elde edilmesi : Bu amaçla İstanbul Üniversitesi Deneyisel Tıp Araştırma Merkezi' nden sağlanan 2-2.5 kg ağırlığında tavşan

kullanıldı. Tavşanda antimikoplazma antikoru olup olmadığı üreme inhibisyon testiyle kontrol edildi.

Hiperimmün serum elde etmek için, tavşana toplam 4 kez injeksiyon yapıldı. Birinci injeksiyon için 2 ml immunizasyon antijeni 2 ml Freund'un complete adjuvanı (Sigma T-5881) ile karıştırıldı ve subkutan olarak injekte edildi. İmmünizasyon antijeni, 21 gün sonra birer hafta arayla 0.5 ml miktarlarında intravenöz olarak injekte edildi. Son injeksiyondan 7 gün sonra kan alınarak üreme inhibisyon testi ile kontrol edildi.

Hiperimmün serum 6 mm çapında kesilmiş steril filtre kağıtlarına 25 µl miktarlarında emdirilerek kurutuldu ve kullanılıncaya kadar +4°C de saklandı (118).

Üreme İnhibisyon testinin yapılışı: Mycoplasma agar, yüzeyinin kuruması için kullanılmadan önce 37°C de 1 saat bekletildi. İzolatların 10⁻²' lik dilusyonları hazırlandı. Bu dilusyonların 0.2 ml' si agar yüzeyine yayıldı ve üzerine, steril pens yardımıyla hiperimmün serum emdirilmiş diskler yerleştirildi. 37°C de mikroaerobik koşullarda inkubasyona bırakıldı. 7 gün süreyle her gün disklerin çevresinde üreme inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığı gözlemlendi. 2 mm ve daha geniş çapta zon oluşumu pozitif olarak değerlendirildi(59, 118).

3.2.3 Lam Aglutinasyon Testi

Kan serumu örnekleri 56°C de 30 dakika süreyle inaktive edildi. Mycoplasma plate test antijeni ve test serumları oda ısısına getirildikten sonra, temiz bir fayans üzerinde 0.025 ml miktarlarındaki serum örneklerine eşit miktarda antijen ilave edildi. Dairesel hareketlerle karıştırılarak 2 dakika içinde aglutinasyon oluşumu yönünden incelendi. Bu süre içinde aglutinasyon oluşturmayan serumlar negatif olarak değerlendirildi. Aglutinasyon oluşturan serumlar steril PBS (pH 7) ile 1:5 oranında sulandırıldı ve test tekrar edildi. İkinci kez aglutinasyon oluşturan serumlar pozitif olarak değerlendirildi. İlk testte aglutinasyon reaksiyonu pozitif olup, dilusyondan sonra tekrarlanan ikinci testte aglutinasyon oluşturmayan serumlar şüpheli olarak kabul edildi (52).

4. BULGULAR

4.1. PCR Bulguları

Spesifitenin saptanması amacıyla, DNA' ları ekstrakte edilerek amplifikasyonu sağlanan *Mycoplasma gallisepticum* PG31, *Mycoplasma gallinarum* PG16, *Acheloplasma axanthum*, *Mycoplasma synovia* WVU 1853 referans suşları ile uygulanan PCR sonucunda, membran üzerinde sadece *M. gallisepticum* PG31 suşuna ait DNA ekstraktının konulduğu bölümde mor renk oluştuğu, diğer suşlara ait bölümlerin renksiz kaldığı gözlemlendi.

M. gallisepticum DNA' sının varlığı yönünden PCR ile incelenen 96 tavuğa ait trachea örneğinden 47 (% 49)' sinde spesifik DNA saptandı. Kesime gönderilen 54 tavuktan 26 (% 48)' sinin ve işletmelerde örnek alınan 42 tavuktan 21 (% 50)' inin trachea örneklerinin PCR ile pozitif olduğu belirlendi. PCR ile *M. gallisepticum* DNA' sı saptanan tavukların kaynakları ve yaşlarına göre dağılımları Tablo 4.1 de gösterilmiştir.

4.2. Kültür Bulguları

Tracheal swab örneklerinden *Mycoplasma* buyyonlara yapılan ilk ekimler sonucunda örneklerin hiçbirinden üreme olmadı. Bu nedenle *Mycoplasma* buyyonlara pasaj yapıldı. Ancak birinci pasajlar sonucunda da üreme gözlenmedi. İkinci pasajlarda sadece 37 numaralı tavuğa ait tracheal swab kültüründe inkubasyonun ikinci gününde üreme belirlenmesi üzerine *Mycoplasma* agara pasaj yapılarak inkubasyona bırakıldı. 4. günden itibaren oluşmaya başlayan kolonilerin 6. günde ortası düğmeli, kenarları yuvarlak görünümde olduğu gözlemlendi.

Diğer trachea örneklerinden *Mycoplasma* buyyonlara yapılan 3. pasajlar sonucunda da üreme gözlenmedi. Bu örneklerin 3. pasajı takiben *Mycoplasma* agarlara yapılan pasajlarında, 46 ve 48 no' lu tavuklara ait tracheal swab kültürlerinde inkubasyonun 6. gününde çok küçük koloniler gözlenmesi üzerine,

bu kolonilerden tekrar Mycoplasma agarlara pasaj yapıldı ve her ikisinde de 5 gün sonra tipik koloniler şekillendiği gözlemlendi.

Kontaminasyon belirlenen toplam 7 tavuğa ait tracheal swab kültürü, filtre ile süzülüp, Mycoplasma buyyonlara pasajlandı. Son olarak Mycoplasma agara yapılan ekimden sonra herhangi bir üreme olmadı.

Mycoplasma gallisepticum şüpheli üç izolattan, L- formlarından ayırt etmek amacıyla penisilinsiz Mycoplasma agarlara yapılan her üç pasajın sonucunda da tipik Mycoplasma kolonilerinin şekillendiği gözlemlendikten sonra, izolatların identifikasyonu için biyokimyasal testler ve üreme inhibisyon testi yapıldı.

Tablo 4.1 PCR ile *M. gallisepticum* DNA' sı saptanan tavukların kaynakları ve yaşlarına göre dağılımları

GRUPNO	ÖRNEK NO	KAYNAK	YAŞ
1	1, 2, 5, 6	Akyazı	6,5 haftalık
2	11,12	Silivri	6 haftalık
3	13, 14, 15, 16, 18	Çatalca	2 haftalık
4	20, 24	Çatalca	3.5 haftalık
5	25, 27, 28, 29, 30	Dilovası- Gebze	3.5 haftalık
6	31, 32	Dilovası- Gebze	5.5 haftalık
7	37, 38, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48	Bandırma	6 haftalık
8	54, 58	Çatalca	7 haftalık
9	59, 63, 66, 68	Akyazı- Dokuncu	6 haftalık
10	69, 70, 76, 78	Kaynarca Adapazarı	6,5 haftalık
11	81, 82, 85, 86	Malkara	4 haftalık
12	89, 91, 93	Malkara	3,5-4 haftalık

İdentifikasyon çalışmaları

A. Biyokimyasal Test Bulguları

a- Glukoz fermentasyon testi

Glukoz fermentasyon besiyerinde 3 gün inkubasyondan sonra, 3 izolatın da glukozu fermente ettiği ve besiyerinin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi (Şekil-1).

b- Tetrazolium redüksiyon testi

Tetrazolium redüksiyon test besiyerinde, üç izolatın da ürettiği yerlerde kırmızı renk oluştuğu gözlemlendi (Şekil-2)

c- Arginin hidrolizasyon testi

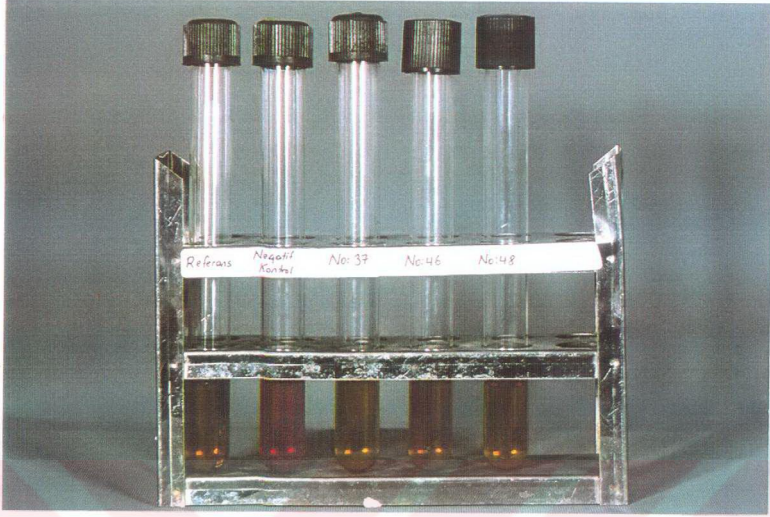
İzolatların, arjinin hidrolizasyon test besiyerinde 7 gün inkubasyondan sonra, besiyerinin pH'ında herhangi bir değişikliğe neden olmadıkları için arjinini hidrolize etmedikleri saptandı.

d- Film ve spot oluşturma testi

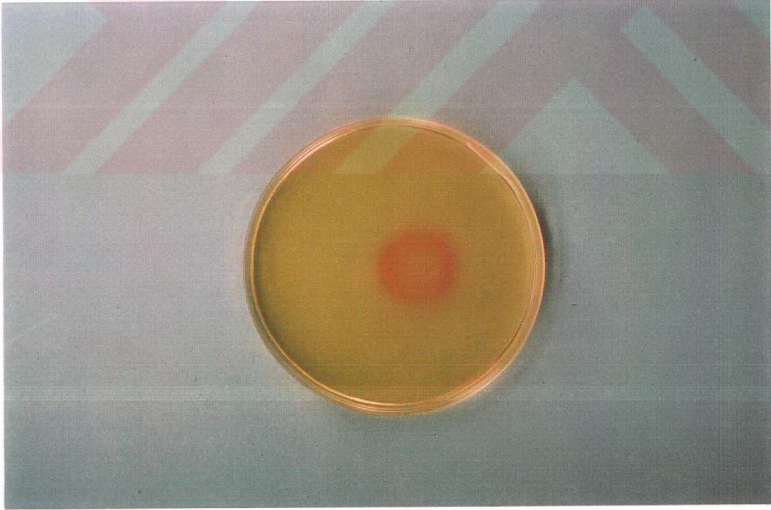
İzolatlara ait kolonilerin çevresinde spot oluşmadığı ve agar yüzeyinde film tabakası oluşturmadığı saptandı.

e-Dijitonine duyarlılık testi

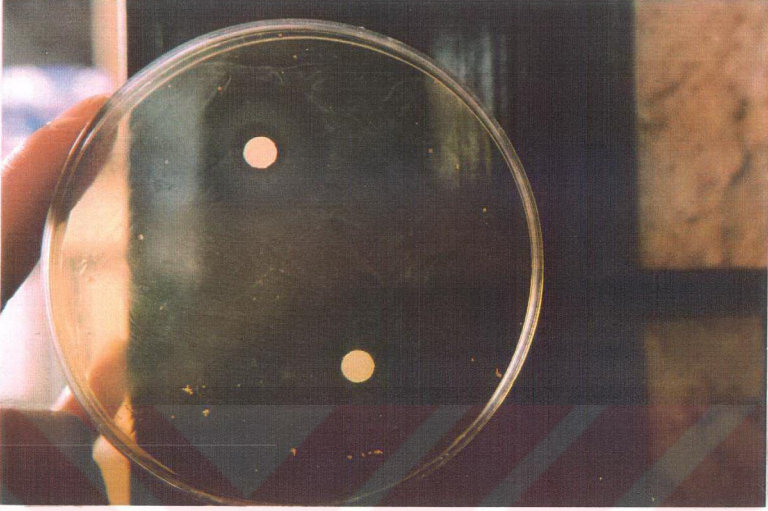
Tüm izolatların dijitonin emdirilmiş disklerin çevresinde üreme-inhibisyon zonu oluşturduğu ve dijitonine duyarlı oldukları saptandı. (Şekil-3).



Şekil-1: Glukoz fermentasyon testi bulguları



Şekil-2: Tetrazolium-redüksiyon testi pozitif izolat.



Şekil-3: Digitonine duyarlılık testi

B. Üreme İnhibisyon test bulguları

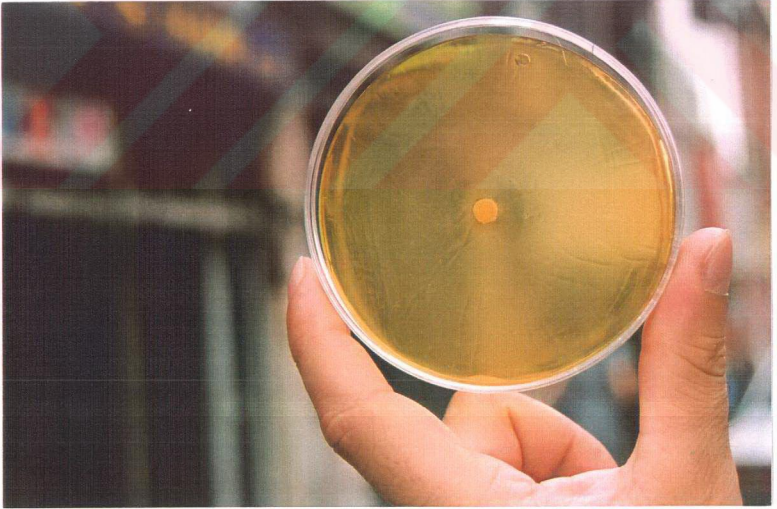
Referans suşla yapılan test sonucunda, 12 mm çapında üreme inhibisyon zonu olduğu gözlemlendi (Şekil-4). Üreme inhibisyon zonunun 37 numaralı izolatta 7 mm, 46 ve 48 numaralı izolatlarda 3-5 mm arasında olduğu belirlendi.

İzole edilen suşların ve referans *M. gallisepticum* PG31 suşunun identifikasyon test sonuçları Tablo 4.2 de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 İzolatların ve referans suşun biyokimyasal özellikleri

Örnek No	<i>M. gallisepticum</i> PG31	No-37	No-46	No-48
Glukoz fermentasyonu	+	+	+	+
Arjinin hidrolizi	-	-	-	-
Tetrazolium reduksiyonu	+	+	+	+
Film-spot oluşumu	-	-	-	-
Digitonine duyarlılık (Zon çapı mm)	Duyarlı (15 mm)	Duyarlı (10 mm)	Duyarlı (5 mm)	Duyarlı (7 mm)
Üreme inhibisyon testi (Zon çapı mm)	+	+	+	+
	(12 mm)	(7 mm)	(3-5 mm)	(3-5 mm)

+: pozitif, -: negatif



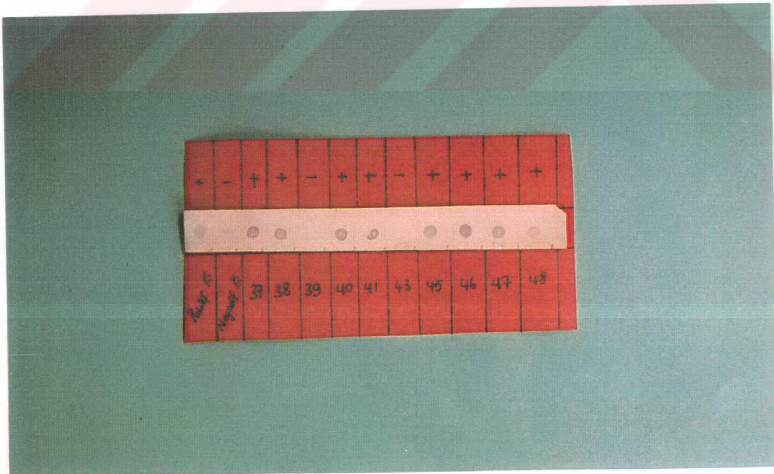
Şekil-4: Referans suş ile yapılan Üreme İnhibisyon Testi

İdentifikasyon çalışmaları sonucunda, tracheal swab örneklerinden izole edilen 3 (%3.1) izolatin da *M. gallisepticum* olduğu belirtildi. *M. gallisepticum* izole edilen trachea örnekleri, Bandırma yöresindeki bir işletmeden aynı yöredeki kesimhaneye gönderilen 12 tavuktan 3' üne aitti. Bu örneklerin PCR bulguları incelendiğinde, PCR ile de pozitif oldukları gözlemlendi (Şekil-5, Tablo 4.3).

Tablo 4.3. İzolasyonun gerçekleştiği işletmenin PCR ve kültür sonuçları bulguları

Örnek No	PCR	Kültür
37	+	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
38	+	-
39	-	-
40	+	-
41	+	-
42	+	-
43	-	-
44	+	-
45	+	-
46	+	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
47	+	-
48	+	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>

+:pozitif, -:negatif



Şekil-5: İzolasyonun gerçekleştiği işletmenin PCR bulguları

PCR ile spesifik *M. gallisepticum* DNA' sı saptanan 47 tavuğa ait trachea örneğinin kültür sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, yalnızca 3 (% 6.4) örnekten izolasyon gerçekleştirilirken, geri kalan 44 (%93.6) örnekten ve PCR bulguları negatif 49 tavuğa ait tracheal örneklerin hiçbirinden etken izole edilmedi.

4.3. Lam Aglutinasyon Testi Bulguları

Trachea örneği alınan 96 tavuğun serumları ile yapılan lam aglutinasyon testi sonucunda, 10 (% 10.4) serum örneği pozitif, 10 (%10.4) serum örneği şüpheli olarak değerlendirildi. 76 (%79.2) serumda ise aglutinasyon gözlenmedi ve negatif olarak değerlendirildi.

Trachea örneklerinden *M. gallisepticum* izole edilen ve PCR ile de pozitif olduğu saptanan 3 tavuktan ikisinin kan serumlarının lam aglutinasyon testi ile negatif, birinin şüpheli olduğu gözlemlendi. *M. gallisepticum*' un izole edilmediği 93 tavuğun 10 (%10.7)' u sero-pozitif; 74 (%79.6)' ü sero-negatif, 9 (%9.7)' u şüpheli olarak değerlendirildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 İncelenen serumların lam aglutinasyon testi bulguları

GRUP NO	KAYNAK	YAŞ	SONUÇ		
			+	-	Ş
1	Akyazı	6,5 haftalık	2	4	-
2	Silivri	6 haftalık	1	3	2
3	Çatalca	2 haftalık	-	6	-
4	Çatalca	3,5 haftalık	-	6	-
5	Gebze	3,5 haftalık	-	6	-
6	Gebze	5,5 haftalık	-	6	-
7	Bandırma	6 Haftalık	3	7	2
8	Çatalca	7 haftalık	2	7	1
9	Akyazı	6 Haftalık	1	9	-
10	Adapazarı	6,5 haftalık	-	10	-
11	Malkara	4 haftalık	1	7	2
12	Malkara	3,5-4 haftalık	-	5	3

+:pozitif, -:negatif, Ş:Şüpheli

PCR ile pozitif saptanan tavukların serolojik test sonuçları incelendiğinde, 47 PCR pozitif tavuğun 4 (% 8.5)' ü sero-pozitif, 40 (% 85.1)' ı sero-negatif, 3 (%6.4)' ü şüpheli olarak değerlendirildi. PCR ile negatif saptanan tavukların serolojik test sonuçları incelendiğinde, 49 PCR negatif tavuğun 6 (%12.2)' sı sero-pozitif, 36 (%14.3)' sı sero-negatif, 7 (%14.3)' si şüpheli olarak değerlendirildi (tablo 4.5).

Tablo 4.5: Araştırmadaki tavukların PCR, kültür ve serolojik test bulguları

KAYNAK	YAŞ	NO	PCR	KÜLTÜR	SEROLOJİ
Akyazı	6,5 haftalık	1.	+	-	-
		2.	+	-	+
		3.	-	-	-
		4.	-	-	-
		5.	+	-	-
		6.	+	-	+
Silivri	6 haftalık	7.	-	-	\$
		8.	-	-	\$
		9.	-	-	-
		10.	-	-	+
		11.	+	-	-
		12.	+	-	-
Çatalca	2 haftalık	13.	+	-	-
		14.	+	-	-
		15.	+	-	-
		16.	+	-	-
		17.	-	-	-
		18.	+	-	-
Çatalca	3.5 haftalık	19.	-	-	-
		20.	+	-	-
		21.	-	-	-
		22.	-	-	-
		23.	-	-	-
		24.	+	-	-
Dilovası- Gebze	3.5 haftalık	25.	+	-	-
		26.	-	-	-
		27.	+	-	-
		28.	+	-	-
		29.	+	-	-
		30.	+	-	-
Dilovası- Gebze	5.5 haftalık	31.	+	-	-
		32.	+	-	-
		33.	-	-	-
		34.	-	-	-
		35.	-	-	-
		36.	-	-	-
Bandırma	6 haftalık	37.	+	+	-
		38.	+	-	+
		39.	-	-	-
		40.	+	-	-
		41.	+	-	+
		42.	+	-	-
		43.	-	-	+
		44.	+	-	\$
		45.	+	-	-
		46.	+	+	\$
		47.	+	-	-
		48.	+	+	-

KAYNAK	YAŞ	NO	PCR	KÜLTÜR	SEROLOJİ
Çatalca	7 haftalık	49.	-	-	-
		50.	-	-	+
		51.	-	-	-
		52.	-	-	-
		53.	-	-	+
		54.	+	-	-
		55.	-	-	-
		56.	-	-	\$
		57.	-	-	-
		58.	+	-	-
Akyazı- Dokuncu	6 haftalık	59.	+	-	-
		60.	-	-	-
		61.	-	-	-
		62.	-	-	-
		63.	+	-	-
		64.	-	-	-
		65.	-	-	+
		66.	+	-	-
		67.	-	-	-
		68.	+	-	-
Kaynarca Adapazarı	6,5 haftalık	69.	+	-	-
		70.	+	-	-
		71.	-	-	-
		72.	-	-	-
		73.	-	-	-
		74.	-	-	-
		75.	-	-	-
		76.	+	-	-
		77.	-	-	-
		78.	+	-	-
Malkara	4 haftalık	79.	-	-	-
		80.	-	-	-
		81.	+	-	-
		82.	+	-	-
		83.	-	-	-
		84.	-	-	+
		85.	+	-	-
		86.	+	-	-
		87.	-	-	\$
		88.	-	-	\$
Malkara	3,5-4 haftalık	89.	+	-	-
		90.	-	-	-
		91.	+	-	-
		92.	-	-	\$
		93.	+	-	\$
		94.	-	-	\$
		95.	-	-	-
		96.	-	-	-

+:pozitif, -:negatif, \$:Şüpheli

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mycoplasma gallisepticum tüm dünyada ve ülkemizde tavuk ve hindi yetiştiriciliğinin çok önemli solunum yolu patojenlerinden biri olup, CRD' nin primer etkenidir (67, 78). En belirgin klinik bulguları hırıltılı solunum, öksürük, burun akıntısı ve sinusitistir. Hastalık Newcastle ve Infeksiyöz Laryngotracheitis gibi infeksiyonlarla birlikte seyrettiğinde ya da *E. coli* ve *H. gallinarum* gibi etkenlerle miks infeksiyon oluşturduğunda daha önemli sorunlara neden olabilmektedir (4, 5, 26, 28, 52, 56, 75). Bulaşma horizontal ve vertikal olabilmektedir. Horizontal bulaşmada hasta hayvanlarla temas oldukça önemlidir. Üst solunum yollarına kolonize olan *M. gallisepticum*, burun akıntısı ve öksürük ile çevreye saçılmakta, duyarlı hayvanlara damlacık infeksiyonu şeklinde bulaşmaktadır (75, 84, 111, 116). Vertikal bulaşma yumurta ile olmaktadır. İyileşen hayvanlarda belli bir düzeyde bağışıklık olduğu, ancak bu portör sürülerin de etkeni horizontal yolla duyarlı sürülere ya da yumurta aracılığıyla bir sonraki nesillere bulaştırdıkları bildirilmiştir (75, 114, 120).

Etkenin, konakçı immun sistemini kolaylıkla geçerek dokularında uzun süre canlı kalabildiğinden, sürüde bir hayvan *M. gallisepticum* ile infekte olduğunda ömür boyu kronik infekte olabileceği, bu nedenle de yetiştiricilikte infekte sürülerin her zaman yeni infeksiyonların kaynağı oldukları kabul edilmektedir (5, 62, 114). Hastalıktan korunmanın en iyi yöntemi sağlıklı sürü ile yola çıkmaktır (65, 103, 105). Bunun için spesifik ve duyarlı tanı yöntemleri kullanılarak güvenilir sonuçların alınması gerekmektedir. Araştırmacılar miks infeksiyonlarda ve antibiyotik sağaltımı yapılmış hayvanlarda, "altın standart" olarak değerlendirilen etken izolasyonunun zorluğunu vurgulamışlardır (54, 57, 71). Bu nedenle tanıda, başta kan serumu olmak üzere, tracheal yıkantı ve bazı vücut sıvıları ile yapılan, ve *M. gallisepticum* a spesifik antikorların ortaya konmasını amaçlayan serolojik testlerin kullanımı önem kazanmıştır. Bu testlerden en yaygın olarak kullanılanlar, lam aglutinasyon testi, hemaglutinasyon inhibisyon testi ve ELISA' dır (22, 52, 56, 80, 89). Moleküler

düzeydeki gelişmelerin sonucunda başta PCR olmak üzere birçok yeni tanı yöntemleri laboratuvarlarda kullanılmaya başlamıştır (41, 54, 71, 88, 106).

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi' ndeki işletmelerden ve mezbahalardan toplanan toplam 96 tavuğa ait trachea örneklerinden PCR ile spesifik *M. gallisepticum* DNA' sının varlığı araştırıldı ve etken izolasyonu için bakteriyolojik incelemeler yapıldı. Ayrıca bu tavukların kan serumu örnekleri, ile *M. gallisepticum*' a karşı antikorların varlığı yönünden serolojik testler arasında en sıklıkla kullanılan lam aglutinasyon testi ile araştırıldı.

Ülkemizde *M. gallisepticum*' un bakteriyolojik ve serolojik tanısıyla ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Atılgan ve Yeşilada (6), İzmir, Manisa ve Aydın illerinde, 8-10 haftalık et piliçleri, yumurtacı ve damızlık olmak üzere toplam 415 tavuğa ait kan serumu örneğini lam aglutinasyon testi ile incelediklerinde, %31.3 oranında pozitif reaksiyon saptadıklarını, her kümeste pozitif reaktörlerin bulunduğunu ve hastalığın bölgede yaygın olduğu kanısına vardıklarını bildirmişlerdir.

Güler (35), Konya yöresinde 7 işletmeden 675 tavuğa ait kan serumu örneklerinin lam aglutinasyon testi ile incelendiğini, her işletmeden tesadüfi olarak 5' er adet seçtikleri toplam 35 tavuğun çeşitli organlarından da bakteriyolojik olarak etken izolasyonu yaptıklarını, sonuçta lam aglutinasyon testi ile 481 tavukta pozitiflik saptanmasına karşın, 7 tavuktan *M. gallisepticum* izole edildiğini bildirmiştir. Aynı şekilde klinik bulguları nedeniyle hastalıktan şüphe edilen 33 işletmeye ait toplam 91 tavuktan kan serumu ile lam aglutinasyon testi ve organlardan etken izolasyonu çalışmaları yapıldığında, 20 işletmede seropozitiflik saptanırken, 9 işletmeye ait toplam 12 tavuktan *M. gallisepticum* izole ve identifiye edildiğini rapor etmiştir.

Esendal (26), Ankara çevresinde yapılan serolojik çalışmada, 900 tavuk serumunu incelemiş, lam aglutinasyon testi ile 182 (%20.22)' sinde, hemaglutinasyon inhibisyon testi ile 128 (%14.22)' sinde, agar jel presipitasyon ile 51 (%5.67)' inde, ELISA ile de 543 (%60.35)' ünde pozitiflik saptamıştır.

Ülgen (120), Bursa ve çevresinde incelenen 137 tavuğa ait örneklerin 15' inden *M. gallisepticum* izole ve identifiye edildiğini; yine aynı çalışmada 499

kan serumundan, lam aglutinasyon testi ile 242, hemaglutinasyon testi ile 263 pozitif serum saptandığını bildirmiştir.

Bu tez çalışmasında, Marmara Bölgesi' nde 96 tavuğa ait trachea örneğinden 47 (%49)' sinde spesifik DNA saptanırken, 3 (%3.1)' ünden *M. gallisepticum* izole edildi. Aynı tavukların lam aglutinasyon ile incelenen kan serumu örneklerinden 10 (% 10.4) serum örneğinin pozitif, 10 (%10.4) serum örneğinin de şüpheli olduğu saptandı. İncelenen her işletmede spesifik DNA' nın saptanmasına bağlı olarak hastalığın bu bölgede sorun olmaya devam ettiği belirlendi.

Kümeslerde sağaltım yöntemlerinin başında gelen antibiyotik uygulamaları, hem kültür hem de serolojik tanıyı olumsuz etkilemektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda, antibiyotikle sağaltılmış sürülerde, sağaltılmamışlara oranla daha az immün yanıt oluştuğunun gözlemlendiği bildirilmiştir (71). Türkarslan ve Salihoğlu (119), CRD şüphesi ile laboratuvara gönderilen 13 olgunun, 8' inden *M. gallisepticum* izole ettiklerini, izolasyon yapılmayan sürülerden ikisinde önceden antibiyotik sağaltımının uygulanmış olduğunu belirtmişlerdir. Güler (35), serolojik olarak pozitif bulunan işletmelerde etken izolasyonunun gerçekleşmemesini, antibiyotik kullanımına ve diğer mycoplasmalar tarafından *M. gallisepticum'* un üremesinin inhibe edilmesine bağlamıştır. Jordan ve ark. (48,49) ile Levisohn ve ark. (72), deneysel yolla infekte ettikleri tavuklara sağaltım uygulamışlar ve bu hayvanlarda, sağaltım yapılmamış hayvanlara oranla etken izolasyonunun azaldığını, serolojik test sonuçları incelendiğinde de daha az pozitiflik görüldüğünü saptamışlardır. Alencar ve ark (3), mezbahalardan toplanan 125 broylere ait örneklerden etken izole edilmediğini, histopatolojik bulgular sonucunda 62 şüpheli hayvan olduğunu, etken izole edilememesinin antibiyotik kullanımına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, PCR ile spesifik DNA saptanan 47 tavuğun sadece 3 (%6.4)' ünden etken izole ve identifiye edilmiştir. Örneklerin sağlandığı işletmelerde herhangi bir laboratuvar incelemesi yapılmadan düzenli olarak

antibiyotik kullanıldığı saptanmış ve izolasyonun düşük olmasının bir nedeninin bu düzenli antibiyotik kullanımı olduğu düşünülmüştür.

Mycoplasmaların çok hassas olduklarını belirten Kleven (59), sıvı besiyerinde glukoz fermentasyonu ile renk değişimi gözlenen kültürlerin bekletilmeden pasajlanması gerektiğini, aksi halde pH değişiminden dolayı bakterinin ölebileceğini vurgulamıştır. Ley ve Avaikan (78), izolasyon çalışmaları sırasında sıvı kültürlerde renk değişimi olduğunu ancak mycoplasma izole edilmediğini, bunun da pH değişimi sonucu etkenin ölmesine bağlı olabileceğini bildirmiştir. Bu tez çalışmasında da, 7 tracheal swab örneğine ait sıvı kültürlerde kontaminasyona bağlı renk değişimi gözlenmiştir. Kültürler hemen filtre edilip inkubasyona bırakılmasına karşın izolasyon gerçekleşmemiştir. Aynı örneklerin PCR sonuçları incelendiğinde, 5 örneğin pozitif sonuç verdiği belirlenmiş ve izolasyonun pH değişimine bağlı olarak etkenin ölmesi nedeniyle gerçekleşmediği düşünülmüştür.

M. gallisepticum' un izolasyonu amacıyla akciğer, hava keseleri, nasal turbinatlar, palatine fissure, ovidukt, ovaryum, testis, kloakadan örneklerin alınabileceği bildirilmektedir(12, 17, 75, 100, 104, 114). Ülgen (120), *M. gallisepticum* izolasyonunun, en fazla tracheadan (%7.3) gerçekleştiğini ancak, hava keselerinden (%3) ve akciğerlerden (%0.7) de etken izole edildiğini rapor etmiştir. Aydın ve ark. (9) ile Güler (35), izolasyon için en uygun materyalin trachea olduğunu bildirirken, bazı araştırmacılar (17, 33) da *M. gallisepticum* izolasyonu için palatine fissure' den daha iyi sonuç alındığını belirtmişlerdir. Jordan ve Amin (46), *M. gallisepticum*' un en çok solunum sistemine ait dokulardan, kloaka ve ayak lezyonlarından izole edildiğini bildirmişlerdir. Bencina ve ark. (12) Harder bezinden de etken izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Bu araştırmada, PCR tekniği ve etken izolasyonu için sadece tracheadan alınan swab örnekleri incelenmiştir. 47 tavukta PCR ile pozitiflik saptanırken, sadece 3 örnekten izolasyonun gerçekleşmesi, *M. gallisepticum*' un farklı organlara yerleştiği göz önüne alındığında, izolasyon şansını arttırmak için etkenin bulunabileceği bütün organ ve dokulardan ekim yapılması gerektiği görüşünü doğrulamaktadır.

Turner ve ark. (117) yaptıkları bir çalışmada, *M. synoviae* kontaminasyonu nedeniyle *M. gallisepticum* izolasyonunun güç olduğunu saptamışlar ve çalışmalarının devamında NAD ilave edilmemiş besiyeri kullandıklarında *M. gallisepticum* izolasyonunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da araştırmacıların uyguladığı yöntem sayesinde *M. synoviae*’den kaynaklanan kontaminasyon sorunu yaşanmamıştır.

Lam aglutinasyon testinde en sık karşılaşılan sorun, testin yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlar verebilmesidir. Kontamine ya da dondurulmuş serumlar ile test yapıldığında non-spesifik reaksiyonların gözlemlendiği bildirilmiştir (15, 22, 71, 98, 129). Olson ve ark.(92) ile Snell ve Cullen (110) *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* arasında antijenik yakınlık olduğunu, lam aglutinasyon testi ile özellikle *M. synoviae* enfeksiyonunun ilk döneminde kross reaksiyonların görüldüğünü, HI testi ile sonuçların tekrar değerlendirilmesi gerektiğini ve farklı zamanlarda örnek alımının tekrar edilmesinin de yararlı olacağını bildirmişlerdir.

Kanatlı sektöründe birçok viral ve bakteriyel enfeksiyonların korunmasında kullanılan inaktif aşılarda da serolojik tanıda sorun olduğu vurgulanmıştır. Bu aşılarda uygulandığı hayvanlardan alınan kan serumu örnekleri, lam aglutinasyon testi ile incelendiğinde non-spesifik pozitif reaksiyonlar gözlemlendiği rapor edilmiştir (14, 71, 129). Robert ve ark. (S-5), bu aşılarda uygulanmasını takiben 1 hafta sonra yapılan çabuk lam aglutinasyon testinde, non-spesifik reaksiyonlar görüldüğünü, 3. hafta içerisinde sonlandığını bildirmişlerdir. Yoder (129) ise, non-spesifik reaksiyonların, aşı uygulamasını takiben 2-3 hafta içerisinde ortaya çıktığını, serumların ısıyla inaktivasyonunun ya da sulandırılmasının bu reaksiyonları tam olarak önleyemediğini bildirmiştir. Cullen ve Timms (22) *M. gallisepticum*’dan arı çiftliklerdeki tavukları, 4 farklı inaktif aşı ile kullanım prosedürüne uygun olarak (3.,9. ve 16. haftalarda birer doz) aşılamışlar, 21 hafta boyunca kan serumlarını lam aglutinasyon, HI ve lateks anti-globulin testi ile incelemişler, lam aglutinasyon ve lateks anti-globulin testi ile incelenen serumlarda, tavuklar 20 haftalık olana kadar yanlış pozitiflik gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Lam aglutinasyon testindeki non-spesifik reaksiyonları önlemek

amacıyla, serumun ısıyla inaktivasyonu, 2-mercaptoetanol ile veya FTS ile dilusyonu gibi yöntemler önerilmesine (52, 59) karşın, Yoder(129) ile Cullen ve Timms (22) bu dilusyon işlemlerinin, gerçekten pozitif olan serumların negatif sonuç vermeleri nedeniyle tanıyı yanıltabileceğini vurgulamışlardır.

M. gallisepticum' un serolojik tanısında spesifite ve sensitivite sorunları nedeniyle tek bir test yerine birkaç testin sonuçlarının değerlendirilerek sürü hakkında bir yorum yapılmasının doğru olacağı bildirilmiştir. Yoder (129) ile Robert (98) lam aglutinasyon testi ile gözlenen non-spesifik reaksiyonların hemaglutinasyon testi ile gözlenmediğini, Sahu ve Olson (101) incelenen 43.040 kan serumundan 53' ünün lam aglutinasyon testi ile pozitif olmasına karşın, HI ile bunların sadece 5' inin pozitif olduğunu, ayrıca lam aglutinasyon testi sonucunda negatif çıkan serumların da % 2.86' sının hemaglutinasyon testi ile pozitif olarak saptadıklarını rapor etmişlerdir.

Bu tez çalışmasında, lam aglutinasyon testi ile 20 serum pozitif reaksiyon vermiş, dilusyonu takiben tekrarlanan test sonucunda 10' u pozitif 10' u da şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, PCR bulgularıyla karşılaştırıldığında, kan serumu pozitif bulunan 10 serum tavuktan 6' sının ve şüpheli olarak değerlendirilen tavuklardan 7' sinin tracheasında DNA saptanmamıştır. Bu non-spesifik reaksiyonların bir kısmının ülkemizdeki aşı programları içerisinde uygulanan inaktif aşılara bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada da non-spesifik reaksiyonları önlemek için dilusyon yöntemi de kullanılmıştır. Dilusyondan sonra ikinci kez aglutinasyon gözlenmediği için, şüpheli olarak değerlendirilen 3 serum örneğinin ait olduğu tavukların trachealarından PCR ile spesifik DNA saptanması ve birinden *M. gallisepticum* izole edilmesi, Yoder (129) ile Cullen ve Timms (22)' in görüşlerini desteklemektedir. Buna karşın, şüpheli olarak değerlendirilen 7 serum örneğinin ait olduğu tavukların PCR sonuçlarının da negatif olması, dilusyon ile yanlış pozitifliklerin de önlenemediği görüşünü doğrulamaktadır. Bu görüşler doğrultusunda daha güvenilir sonuçların alınabilmesi için mutlaka diğer serolojik testlerin ve gerekirse PCR ya da kültür çalışmalarının yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Araştırmacılar, standart referans suşlarla hazırlanan antijenlerin kullanıldığı lam aglutinasyon ve HI testleri ile variant suşlardan kaynaklanan infeksiyonların saptanamayabileceğini bildirmişlerdir (52, 57). Kleven (60), *Mycoplasma gallisepticum* saha izolatlarının virulensi, antijenik ve genetik yapısı arasında farklılıklar olabileceğini, düşük virulense sahip suşların düşük immun yanıt oluşturabileceğini ve bu nedenle diğer yöntemlerle saptanamayıp, PCR ile saptanabilen bazı *Mycoplasma gallisepticum* saha suşlarının bulunabileceğini vurgulamıştır.

Bu tez çalışmasında, trachealarında PCR ile spesifik DNA'nın saptanan 47 tavuğun kan serumu örneklerinin lam aglutinasyon testi sonuçları incelendiğinde, sadece 4' ünün pozitif, 3' ünün de şüpheli olduğu saptandı. Çalışmada her ne kadar suşların varyant olup olmadıkları incelenmediyse de lam aglutinasyon testi ile PCR sonuçları arasındaki bu farkın kullanılan antijenin standart suştan hazırlanmış ticari antijen olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Salich ve ark. (105) antikor yanıtının uzun süre saptanabilmesine karşın, tracheadaki etken sayısının belli bir süre artıp pik düzeye eriştikten sonra hızla düştüğünü, bu nedenle serolojik olarak pozitif olgularda etken izolasyonunun gerçekleşemeyebileceğini ya da PCR sonucunun negatif olmasının şaşırtıcı olmadığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da lam aglutinasyon testi ile pozitif saptanan 10 serum örneğinden 6' sının PCR sonuçları negatif iken, hiçbirinden etken izole edilmemesi, şüpheli saptanan 10 kan serumu örneğinin PCR sonuçları değerlendirildiğinde 7'sinin negatif olması ve sadece bir tanesinden etken izole edilmesi Salisch ve ark. (105)' larının görüşüne paralellik göstermiştir.

Kültürde karşılaşılan zorlukları ve bazı serolojik testlerdeki yanıltıcı sonuçlar ve güçlükler nedeniyle, moleküler düzeydeki gelişmeler sonucunda, PCR tekniği önem kazanmış ve sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (41, 54, 71, 88, 106). PCR tekniğinin, kısa sürede en doğru sonuç alınabilmesi, sekonder bakteriyel kontaminasyonlardan etkilenmemesi, antibiyotik kullanımı sonrasında

da yeterli sonuçların alınması ve tür spesifik olması araştırmacılar tarafından tercih edilme nedeni olarak belirtilmiştir (71, 105, 106).

Salisch ve ark. (105) IDEXX *Mycoplasma gallisepticum* PCR-based test kitinin tür spesifik olduğunu vurgulamıştır. Bu çalışmada da kitin spesifitesini saptamak için *Mycoplasma gallisepticum* PG31, *Mycoplasma gallinarum* PG16, *Acheloplasma axanthum*, *Mycoplasma synovia* WVU 1853 suşları ile PCR yapıldığında, sadece *M. gallisepticum*'u saptadığı gözlenmiştir.

Khan ve Kleven (57), infekte bir çiftliğe sağlıklı civcivlerin katılmasından çok kısa bir süre sonra sağlıklıların da infekte olduklarını, ancak bu durumun ilk günlerde serolojik testlerle veya kültür ile ortaya çıkarılmasının zor olduğunu, bu aşamada spesifik DNA' nın saptanmasına yönelik tanı yöntemlerinin başarılı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Kempf ve ark. (54), önce *M. gallisepticum* ile infekte edildikten sonra antibiyotikle sağaltılmaya başlanan tavuklardan 8 farklı günde alınan 80 tracheal swab örneklerinden kültür ile 14, PCR ile 20 pozitif sonuç elde edildiğini, son etken izolasyonunun inokulasyondan 26 gün sonra yapıldığını, PCR ile ise son pozitif örneğin 54. günde saptandığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar başka bir çalışmalarında da (55) tracheal swablardan kültür ve PCR ile tanıyı karşılaştırdıklarında, 73 swab örneğinden 49' unun kültür, 70' inin PCR ile pozitif olduğunu bildirmişlerdir. PCR pozitif örneklerin çoğunda kültür ile saptanamayacak kadar az bakteri olduğunu, bu sonucu da PCR tekniğinin yüksek sensitivitesine ve üreyemeyecek kadar az patojeni ya da sağaltım sonrası ölmüş bakteriyi saptayabilme yeteneğine bağlamışlardır.

Yüz günlük civcivlerin yumurta keselerinden yapılan kültür ve PCR çalışmaları sonucunda, kültür sonuçları pozitif olan tüm örneklerin PCR ile de pozitif sonuç verdiği ancak PCR sonucu pozitif olan örneklerin % 8' inin kültür negatif olarak saptandığı bildirilmiştir(102).

Kempf (51), tüm bu avantajlarının yanı sıra, PCR tekniği ile sadece bilinen *Mycoplasma* türlerinin identifiye edilebileceğini, yeni türler ve patojenite, immunojenite, antibiyotik duyarlılığı gibi biyolojik özelliklerini saptamak için kültür çalışmalarının ve serolojik testlerin yapılması gerektiğini vurgulamıştır.

Etken izolasyonunu ve biyokimyasal özelliklerinin saptanmasını içeren kültür yöntemleri, günümüzde hala en güvenilir tanı yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır. Geliştirilen her yeni tanı yönteminin değerlendirilmesinde, saha izolatlarının özelliklerinin saptanmasında, aşılarda hazırlanmasında, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde kültür çalışmalarından yararlanılmaktadır. Bunun yanı sıra pratik ve ucuz olması nedeniyle lam aglutinasyon testi sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak aglutinasyon testinin de tek başına yeterli olmadığı ve başka serolojik testlerle ve diğer tanı yöntemleri ile de sonuçların doğrulanması gerekmektedir. Son yıllarda moleküler düzeydeki gelişmelere paralel olarak PCR tekniği birçok infeksiyöz hastalıkta olduğu gibi CRD' nin de tanısında kullanılmaya başlamıştır. Günümüz koşullarında pahalı bir test olmakla birlikte yüksek sensitivitesi ve spesifitesi ile izolasyon ve identifikasyonun yerini tutabilecek bir test teknik olabileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasında CRD' nin tanısında bakteriyolojik ve serolojik çalışmaların yanı sıra PCR tekniğini de kullanarak *M. gallisepticum*' un varlığı ortaya konmaya çalışıldı. Sonuç olarak izolasyon çalışmalarının uzun sürdüğü ve birçok nedene bağlı olarak yetersiz kaldığı, tek bir serolojik testin yetersiz olduğu ve infeksiyonun saptanmasında PCR tekniğinin bugün için çabuk, güvenilir bir yöntem olduğu belirlendi.

6. ÖZET

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi' nde yer alan farklı işletmelerden ve kesimhanelerden tesadüfi örnekleme ile seçilen toplam 96 tavuğun trachea örnekleri *Mycoplasma gallisepticum* izolasyonu için bakteriyolojik olarak ve spesifik DNA' nın saptanması amacıyla Polymerase Chain Reaction (PCR) ile incelendi. Aynı hayvanların kesimden önce alınan kan serumu örnekleri ile *M. gallisepticum* antikorları yönünden lam aglutinasyon testi uygulandı.

PCR tekniği ile spesifik DNA' nın saptanması amacıyla, *Mycoplasma gallisepticum* DNA based Probe Test Kit kullanıldı. 96 tavuğa ait trachea örneğinden 47 (% 49)' sinde spesifik DNA saptandı. Kesime gönderilen 54 tavuktan 26 (% 48)' sinin ve işletmelerde örnek alınan 42 tavuktan 21 (% 50)' inin trachea örneklerinin PCR ile pozitif olduğu belirlendi.

İzolasyon çalışmaları sonucunda, 96 trachea örneğinin 3 (%3.1)' ünden *M. gallisepticum* izole edildi. Bu 3 örnekte PCR ile de spesifik DNA saptandığı belirlendi. PCR ile spesifik DNA saptanan diğer 44 trachea örneğinden ve PCR bulguları negatif olan 49 trachea örneğinden *M. gallisepticum* izole edilmedi.

Trachea örneği alınan 96 tavuğun lam aglutinasyon testi sonucunda, serumların 10 (% 10.4)' unda spesifik antikorlar saptanırken, 10 (%10.4) serum örneği şüpheli olarak değerlendirildi. 76 (%79.2) serumda ise aglutinasyon gözlenmedi.

PCR ile spesifik *M. gallisepticum* DNA' sı saptanan 47 tavuğa ait trachea örneklerinden, sadece 3 (% 6.4) 'ünden izolasyon gerçekleştirildi.

PCR sonuçları pozitif olan 47 tavuğun 4 (%85.1)' ü sero-pozitif; 40 (%8.5)' i sero-negatif,3 (%6.4)' ü şüpheli olarak değerlendirildi.

Bu araştırmanın sonuçları, genellikle saha taramalarında uygulanan lam aglutinasyon testinin tek başına yetersiz kaldığını, PCR tekniğinin kısa sürede ve daha güvenilir sonuç verdiğini, izolasyonun uzun sürmesi ve bazı güçlüklerle karşılaşılması nedeniyle PCR' ın kültüre tercih edilmesi gerektiğini ve rutin tanı amacıyla kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır.

7. SUMMARY

In this study, 96 tracheal swab samples of randomly selected chickens from different abattoirs and commercial flocks in the Marmara Region were investigated for bacteriological isolation of *M. gallisepticum* and for detection of specific DNA by PCR. Slide-agglutination test was applied to detect antibodies to *M. gallisepticum* in the matches blood sera.

Mycoplasma gallisepticum DNA based Probe Test Kit was used to detect specific DNA. The specific DNA was detected from 47 (49%) of tracheal swabs, taken from 96 chickens. 26 (48%) of 54 tracheal samples obtained from slaughtered chickens and 21 (50%) of 42 from commercial flocks were found to be positive by PCR.

M. gallisepticum were isolated from 3 (3.1%) of 96 trachea samples. The specific DNA was also detected from the tracheal swabs of the culture positive chickens. The remaining 93 chickens -44 PCR positive and 49 PCR negative- were culture negative.

As a result of slide agglutination test , 10 (10.4%) sera were evaluated sero-positive and 10 (10.4%) were suspicious. No agglutinations were seen in the remaining 76 sera.

There were only 3 (6.4%) isolations from the 47 chickens from which specific *M. gallisepticum* DNA were detected.

In total of 47 PCR positive chickens, 4(8.5%) were found to be sero-positive, while 40 (85.1%) were sero-negative and 3 (6.4%) were suspicious.

Our results indicated that, using slide agglutination test which is commonly used as a screening test in field conditions was not sufficient alone. PCR technique because of its advantages such as rapidity and reliability should be preferred in routine diagnosis instead of difficult and time-consuming culture techniques.

8. KAYNAKLAR

1. Ahmad I, Kleven SH, Avaikan AP, Glisson JR. Sensitivity and Specifity of *Mycoplasma gallisepticum* Agglutination Antigens Prepared from Medium with Artificial Liposomes Substituting for Serum. Avian Diseases 1988; 32 (3) (abst): 519-526.
2. Ahmad I, Kleven SH, Glisson JR, Avaikan AP. Firther studies of *Mycoplasma gallisepticum* Serum Plate Agglutination Antigen Grown in Medium with Artificial Liposomes Substituting for Serum. Avian Diseases 1989; 33(1) : 519-526.
3. Alencar AP, Nascimento ER, Danelli MGM, Lignon GB, Santos MA. Reletionship between infection with *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* and air sac lesions in Broilers. Revista Brasileira de Medicina Veterinaria 1998; 20(6)(abst) : 257-262.
4. Arda M, İzgür M. Kanatlılarda Mikoplasma İnfeksiyonları. Etlik Vet Mikrob Enst Derg 1984; 5(6-7) : 124-137.
5. Atılgan T. Kümes Hayvanlarının "PPLO" Enfeksiyonları (Süregen Solunum Sistemi Hasatlığı ile Hindilerin Enfeksiyöz Sinuzitis'i). Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü Dergisi 1964; 5(9) : 51-64.
6. Atılgan T, Yeşilada İ. Ege Bölgesi İllerinde Süregen Solunum Yolu Hastalığının Yayılış Durumu. Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü Dergisi 1967; 8(16) : 1-5.
7. Avaikian AP, Ley DH. Protective Immune Response to *Mycoplasma gallisepticum* Demonstrated in Respiratory-Tract Washings from *M.gallisepticum* –Infected Chickens. Avian Diseases 1993; 37 : 697-705.
8. Avakian AP, Kleven SH, Glisson JR. Evaluation of the Specificity and Sensitivity of Two Commercial Enyzme-Linked Immunosorbent Assay Kits, the Serum Plate Agglutination Test, and the Hemagglutination-Inhibition Test for Antibodies Formed in Response to *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases 1988; 32 : 262-272.

9. Aydın N, İzgür M. Süregen Solunum Yolu Enfeksiyonu. Ulusal Üçüncü Tavukçuluk Kongresi, 13-14 Aralık 1979, Ankara.
10. Barber TL, Fabricant J. Identification of Mycoplasmatales: Characterization Procedures. Applied Microbiology 1971; April : 600-605.
11. Bencina D, Dorrer D. Demonstration of *Mycoplasma gallisepticum* in Tracheas of Healthy Carrier Chickens by Fluorescent-Antibody Procedure and the Significanca of Certain Serologic Tests in Estimating Antibody Response. Avian Diseases 1983; 28(3) : 574-578.
12. Bencina D, Svetlin A, Dorrer D, Tadina-Jaksic T. Humoral and Local antibodies in chickens with mixed İnfections with three *Mycoplasma* species. Avian Pathology 1991; 20 : 325-334.
13. Bozeman LH, Kleven SH, Davis RB. Mycoplasma Challenge Studies in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and Chickens. Avian Diseases 1983; 28(2) : 426-434.
14. Bradbury JM, McCarthy JD, Metwalf AZ. Microimmunofluorescence for the Serological Diagnosis of Avian Mycoplasma İnfections. Avian Pathology 1990; 19 : 213-222.
15. Bradley LD, Snyder DB, Van Deusen RA. Identification of Species-specific and Interspecies-specific Polypeptides of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Am J Vet Res 1988; 49(4) : 511-515.
16. Branton SL, May JD. Swab absorbability- Effect on *Mycoplasma gallisepticum* Isolation. Poultry Science 1985; 64 : 2087-2089.
17. Branton SL, Gerlach H, Kleven SH. Environment and Health. *Mycoplasma gallisepticum* Isolation in Layers. Poultry Science 1984; 63 : 1917-1919.
18. Branton SL, Kleven SH, Simmons JD. Research note: *Mycoplasma gallisepticum* Isolations Resulting from Dry Versus Wet Swabs. Poultry Sciene 1991; 70 : 195-197.

19. Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. Trends in Microbiology 1999; 7 : 493-499.
20. Christensen NH, Yavari CA, McBain AJ, Bradbury JM. Investigation into the Survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on Materials Found in the Poultry House Environment. Avian Pathology 1994; 23 : 127-143.
21. Colusi A. Microbiologic Study of Starins of *Mycoplasma gallisepticum* Isolated in Argentina. Avian Diseases 1963; 7(4) : 369-375.
22. Cullen GA, Timms LM. Diagnosis of Mycoplasma Infection in Poultry Previously Vaccinated With Killed Adjuvant Vaccines. Br Vet J 1972; 128 : 94-100.
23. Diker KS. Epidemiyolojik Araştırma Aşamaları. I. Amaç ve Veri Toplama. Epidemiyoloji. A.Ü. Veteriner Fakültesi Öğrenci Ders Notu, Ankara, 1994; 96-116.
24. Dohms JE, Hnatow LL, Whetzel P, Morgan R, Keeler CI. Identification of the Putative Cytoadhesin Gene of *Mycoplasma gallisepticum* and Its Use as a DNA Probe. Avian Diseases 1993; 37 : 380-388.
25. Edward DG, Kanarek AD. Organisms of the Pleuropneumonia Group of Avian Origin: their Classification into Species. Ann New York Acad Sci 1960; 79: 696-702.
26. Esendal ÖM. Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* a Karşı Oluşan Antikorların Çeşitli Serolojik Yöntemlerle (Lam aglutinasyon, Hemaglutinasyon-İnhibisyon, Agar-Jel Presipitasyon, ELISA) Saptanması ve Sonuçların Karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Bilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 1991.
27. Esendal ÖM, Yardımcı H, Aydın N. Kanatlı Hayvanlarda *Mycoplasma gallisepticum* ve *Mycoplasma synoviae* ye karşı Oluşan Antikorların Tesbitinde Serum Lam Aglutinasyon (SPA),

Hemaglutinasyon-İnhibisyon (HI) ve Immunocomb Katı-Faz İmmunoassay Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Etlik Vet Mikrob Enst Derg 1996; 8 (3) : 33-45.

28. Ewing ML, Kleven SH, Brown MB. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Hemagglutination-Inhibition for Detection of Antibody to *Mycoplasma gallisepticum* in Commercial Broiler, Fair and Exhibition, and Experimentally Infected Birds. Avian Diseases 1996; 40 : 13-22.

29. Fabricant J. Serological Studies of Avian Pleuropneumoniae-like organisms (PPLO) with Edward's technique. Avian Diseases 1960; 4 : 505-514.

30. Fernandez C, Mattsson JG, Bölske G. Species-specific Oligonucleotide Probes Complementary to 16S rRNA of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Research in Veterinary Science 1993; 55 : 130-136.

31. Frey J, Nicolet J. Molecular Identification and Epidemiology of Animal Mycoplasmas. Wien Klin Wochenscher 1997; 109(14-15) : 600-603.

32. Frey ML, Hanson RP, Anderson DP. A Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas. Am J Vet Res 1968; 29(11) : 2163-2171.

33. Fritz BA, Thomas CB, Van Ess P, Yuill TM. Comparison of a Modified Edward-type Medium and a Modified SP4-type Medium for Primary Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) from Chickens Vaccinated with the F Strain of MG. Avian Diseases 1991; 35 : 591-598.

34. Gibbs PS, Kleven SH, Jackwood MW. Analysis and Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* Isolates from Pennsylvania. Avian Diseases 1994; 38 : 475-482.

35. Güler L. Konya Bölgesinde Kanatlıların Kronik Solunum Sistemi Hastalığı (Chronic Respiratory Disease-CRD)'nin Serolojik ve Etken İzolasyonu ile Karşılaştırmalı Teşhisi Üzerine Çalışmalar. Veterinarium 1995; 6(1-2) : 7-15.

36. Hartup BK, Dhondt AA, Sydenstricker KV, Hochachka WM, Kollias GV. Host Range and Dynamics of Mycoplasmal Conjunctivitis Among Birds in North America. *Journal of Wildlife Diseases*. 2001; 37(1) : 72-81.
37. Hassanien MR, Shehata YM, Biazide LA, El-Sadek AABD, El-Shaibiny LM, Madkour MK, El-Rahman TM. Immune Response to *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. *Assiut Vet Med J* 1994; 30(59) : 251-276.
38. Hayatsu E, Sugiyama H, Kume K, Kawakuba Y, Kimura M, Yoshioka M, Kaneko S, Koboyashi K, Yamasaki T, Nishiyama Y. A Field Trial Killed-*Mycoplasma gallisepticum* Vaccine to Protect Against Chicken Respiratory Mycoplasmosis. *Am J Vet Res* 1975; 36(2) : 217-221.
39. Hildebrand DG, Page DE, Berg JR. *Mycoplasma gallisepticum* (MG)- Laboratory and Field Studies Evaluating the Safety and Efficacy of an Inactivated MG Bacterin. *Avian Diseases* 1983; 27(3) : 792-802.
40. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. The Mycoplasmas (or Mollicutes): Cell wall-less Bacteria. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9.Ed. Williams & Wilkins, Baltimore USA, 1994 : 705-708.
41. Hopert A, Uphoff CC, Wirth M, Hauser H, Drexler HG. Specificity and Sensitivity of Polymerase Chain Reaction (PCR) in Comparison with Other Methods for the Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Lines. *Journal of Immunological Methods* 1993; 164 : 91-100.
42. Imada Y, Uchida I, Hashimoto K. Rapid Identification of Mycoplasmas by Indirect Immunoperoxidase Test Using Small Square Filter Paper. *Journal of Clinical Microbiology* 1987; 25(1) : 17-21.
43. Jessup DA, DaMassa AJ, Lewis R, Jones KR. *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Wild-type Turkeys Living in Close Contact with Domestic Fowl. *JAVMA* 1983;183 (11) : 1245-1247.

44. Jordan FTW. A Combined Growth-Inhibition and Growth-Precipitation Test for the Typing of Avian Mycoplasma. Res Vet Sci 1973; 14 : 387-389.
45. Jordan FTW. Mycoplasmosis in Poultry. Isr J Med Sci 1981; 17 : 540-547.
46. Jordan FTW, Amin MM. A Survey of Mycoplasma Infections in Domestic Poultry. Research in Veterinary Science 1980; 28 : 96-100.
47. Jordan FTW, Horrocks BK. The Minimum Inhibitory Concentration of Tilmicosin and Tylosin for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and a comparison of Their Efficacy in the Control of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Broiler Chicks. Avian Diseases 1996; 40 : 326-334.
48. Jordan FTW, Forrester CA, Hodge A, Johnson-Reeve LG. The Comparison of an Adequeous Preparation of Tilmicosin with Tylosin in the Treatment of *Mycoplasma gallisepticum* Infection of Turkey Poults. Avian Diseases 1999; 43 : 521-525.
49. Jordan FTW, Forrester CA, Ripley PH, Burch DGS. In Vitro and In Vivo Comparisons of Valnemulin, Tiamulin, Tylosin, Enrofloxacin and Lincomycin/Spectinomycin Against *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases 1998; 42 : 738-745.
50. Keeler CL, Hnatow LL, Whetzel PL, Dohms JE. Cloning and Characterisation of a Putative Cytaadhesin Gene (mgc1) from *Mycoplasma gallisepticum*. Infection and Immunity May 1996; 1541-1547.
51. Kempf I. DNA Amplification Methods For Diagnosis and Epidemiological Investigations of Avian Mycoplasmosis. Acta Veterinaria Hungarica 1997; 45(3) : 373-386.
52. Kempf I, Gesbert F, Guittet M. Experimental infection of chickens with an atypical *Mycoplasma gallisepticum* strain: comparison of diagnostic methods. Research in Veterinary Science 1997; 63 : 211-213.
53. Kempf I, Van Den Hoven R, Gesbert F, Guittet M. Efficacy of Difloxacin in Growing Broiler Chickens for the Control of Infection Due

to Pathogenic *Mycoplasma gallisepticum*. J Vet Med B 1985; 45 : 305-310.

54. Kempf I, Gesbert F, Guittet M, Bennejean G. *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Drug-treated Chickens: Comparison of Diagnosis Methods Including Polymerase Chain Reaction. J Vet Med B 1994; 41 : 597-602.

55. Kempf I, Blanchard A, Gesbert F, Guittet M, Bennejean G. The Polymerase Chain Reaction for *Mycoplasma gallisepticum* Detection. Avian Pathology 1993; 22 : 739-750.

56. Kempf I, Gesbert F, Guittet M, Bennejean G, Stipkovits L. Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies. Avian Pathology 1994; 23 : 329-338.

57. Khan MI, Kleven SH. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Field samples Using a Species-Specific DNA Probe. Avian Diseases 1993; 37 : 880-883.

58. Kleven SH. Transmissibility of the F-strain of *Mycoplasma gallisepticum* in Leghorn Chickens. Avian Diseases 1981; 25(4) : 1005-1018.

59. Kleven SH. Mycoplasmosis. A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th Ed. (DE Swayne, JR Glisson, MW Jackwood, JE Pearson & WM Reed, eds). American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, 1989; 74-80.

60. Kleven SH. Mycoplasma Research Methods for Lab and Field Explained. Poultry Digest 1995; 38-41.

61. Kleven SH. Changing Expectations in the Control of *Mycoplasma gallisepticum*. Acta Veterinaria Hungarica 1997; 45(3) : 299-305.

62. Kleven SH. Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. Poultry Science 1998; 77 : 1146-1149.

63. Kleven SH, Fletcher WO. Laboratory Infection of House Sparrows (*Passer domesticus*) with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases 1982; 27(1) : 308-311.
64. Kleven SH, Khan MI, Yamamoto R. Fingerprinting of *Mycoplasma gallisepticum* Strains Isolated from Multiple-Age Layers Vaccinated with Live F Strain. Avian Diseases 1990; 34 : 984-990.
65. Kleven SH, Glisson JR, Lin MY, Talkington FD. Bacterins and Vaccines for the Control of *Mycoplasma gallisepticum*. Isr J Med Sci 1984; 20 : 989-991.
66. Kojima A, Takahashi T, Kijima M, Ogikuba Y, Tamura Y. Detection of Mycoplasma DNA in Veterinary Live Virus Vaccines by the Polymerase Chain Reaction. J Vet Med Sci 1996; 58(10) : 1045-1048.
67. Kojima A, Takahashi T, Kijima M, Ogikuba Y, Nishimura M, Nishimura S, Harasawa R, Tamura Y. Detection of Mycoplasma in Avian Live Virus Vaccines by Polymerase Chain Reaction. Biologicals 1997; 25 : 365-371.
68. Kotani H, McGarrity GJ. Identification of Mycoplasma Colonies by Immunobinding. Journal of Clinical Microbiology 1986; 23(4) : 783-785.
69. Lam KM, Lin W, Yamamoto R, Ghazikhanian GY. Utilization of Temperature-Sensitive Mutants of *Mycoplasma gallisepticum* to Prevent Air Sac Infections. Isr J Med Sci 1984; 20 : 992-994.
70. Lauerman LH, Chilina AR, Closser JA, Johansen D. Avian Mycoplasma Identification Using Polymerase Chain Reaction Amplicon and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Avian Diseases 1995; 39 : 804-811.
71. Levisohn S, Kleven SH. Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). Rev Sci Tech Off Epiz 2000; 19(2) : 425-442.
72. Levisohn S, Herz A, Weisman Y. The Therapeutic Effect of Tiamulin on Chicks Experimentally Infected With *Mycoplasma gallisepticum*. Refuah Vet 1980; 37(4) : 124-130.

73. Levisohn S, Dykstra MJ, Lin MY, Kleven SH. Comparison of In Vivo and In Vitro Methods for Pathogenicity Evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in Respiratory Infection. Avian Pathology 1986; 15 : 233-246.
74. Levisohn S, Sznclwar C, Weisman Y, Perlman D, Wangenberg M. Vaccination with *Mycoplasma gallisepticum* Strains of Commercial Laying Hens in Israil. Refuah Veterinarith 1982; 39(4) : 145-153,
75. Ley DH, Yoder HW. *Mycoplasma gallisepticum* Infection. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald, Saif YM.(eds). Diseases of Poultry, Iowa State University Press, Ames,Iowa,1997; 194-207.
76. Ley DH, McLaren J, Berkhoff E. Diagnosis of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* Using DNA Probe Polymerase Chain Reaction Test Kits. Xth World Veterinary Poultry Association Congress: Sydney 1993.
77. Ley DH, Berkhoff JE, McLaren JM. *Mycoplasma gallisepticum* Isolated from House Finches (*Carpodacus mexicanus*) with Conjunctivitis. Avian Disease 1996; 40 : 480-483.
78. Ley DH, Avaikian AP, McLaren J, Berkhoff JE. Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Using DNA Probe Polymerase Chain Reaction Test Kits. Proceedings of the 42nd Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA, 28 February-2 March 1993, 83-85.
79. Liu T,Garcia M, Levisohn S, Yogev D, Kleven SH. Molecular Variability of the Adhesin-Encoding Gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* Strains and Its Application in Diagnosis. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39(5) : 1882-1888.
80. Lin MY, Kleven SH. Evaluation of the Microagglutination Test in the Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. Avian Diseases 1984; 28(1) : 289-294.

81. Luttrell MP, Fischer JR, Stallknecht DE, Kleven SH. Field Investigation of *Mycoplasma gallisepticum* Infections in House Finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. Avian Diseases 1996; 40 : 335-341.
82. May JD, Branton SL. Identification of Mycoplasma Isolates by ELISA. Avian Diseases 1997; 41 : 93 –96.
83. May JD, Branton SL, Cuthens MA. Identification of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. Synoviae* by Flow Cytometry. Avian Diseases 1988; 32 : 513-516.
84. McMartin DA, Khan MI, Farver TB, Christie G. Delineation of the Lateral Spread of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. Avian Diseases 1987; 31 : 814-819.
85. Miles R, Nicholas R. Mycoplasma Protocols. Humana Press Inc, New Jersey, 1998.
86. Morsy MA, Panangala VS, Gresham MM. Identification of *Mycoplasma gallisepticum* by Use of Monoclonal Antibody in a Rapid Slide Agglutination Test. Am J Vet Res 1991; 52 (10) : 1602-1605.
87. Nascimento ER, Yamamoto R, Khan MI. *Mycoplasma gallisepticum* F-Vaccine Strain-Specific Polymerase Chain Reaction. Avian Diseases 1993; 37 : 203-211.
88. Nascimento ER, Yamamoto R, Herrick KR, Tait RC. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases 1991; 35 : 62-69.
89. Nonomura I, Yoder HW. Identification of Avian Mycoplasma Isolates by the Agar-Gel Precipitin Test. Avian Diseases 1977, 21 (3) : 370-381.
90. Nunoya T, Tajima M, Yagihashi T, Sannai S. Evaluation of Respiratory Lesions in Chickens Induced by *Mycoplasma gallisepticum*. Jpn J Vet Sci 1987; 49(4) : 621-629.
91. O'Connor RJ, Turner KS, Sander JE, Kleven SH, Brown TP, Gomez L, Cline JL. Pathogenic Effects on Domestic Poultry of a

Mycoplasma gallisepticum Strain Isolated from a Wild House Finch. Avian Diseases 1999; 43 : 640-648.

92. Olson NO, Yamamoto R, Ortmayer H. Antigenic Relationship Between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum*. Am J Vet Res 1965; 26(110) : 195-198.

93. Ortiz A, Froyman R, Kleven SH. Evaluation of Enrofloxacin Against Egg Transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases 1995; 39 : 830-836.

94. Patten BE, Higgins PA, Whithear KG. A urease-ELISA for the Detection of Mycoplasma Infections in Poultry. Aust Vet Journal 1984; 61(5) : 151-155.

95. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. The Mycoplasmas (Class: Mollicutes). Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, 1994; 320-326.

96. Raab LS. Cultural Revolution: Mycoplasma Testing Kits and Services. The Scientist 1999; 13(20) : 21.

97. Razin S, Freundt E.A. Section 10: The Mycoplasmas. *Krieg Nr, Holt JG*. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore USA, 1984; 740-760.

98. Roberts DH. Non-specific Agglutination Reactions with *Mycoplasma gallisepticum* Antigens. Vet Rec 1970; 87 : 125- 126.

99. Roberts SR, Nolan PM, Hill GE. Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Captive House Finches (*Carpodacus mexicanus*) in 1998. Avian Diseases 2001; 45 : 70-75.

100. Rosenfeld LE. Isolation and Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* from a fowl. Aust Vet Journal 1971; 47 : 492-495.

101. Sahu SP, Olson NO. Hemagglutination-Inhibition Versus Serum Plate Agglutination in Detecting *Mycoplasma gallisepticum* in Broiler Flocks. Avian Diseases 1974; 19(2) : 370-374.

102. Saif EM. Situation of Mycoplasma Infections Among Chickens in Upper Egypt with Evaluation of Different Diagnostic Techniques. Assiut Veterinary Medical Journal 1997; 37(abst) : 54-67.

103. Saif-Edin M, Aly M, Mousa S. Field Evaluation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in Broiler Breeder Chickens. 9th Sci. Con 2000, Fac Vet Med Assiut Univ, Egypt.

104. Salami JO, Addo P, Umoh JU, Adegboye DS. Chicken mycoplasmosis: a review with special reference to *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. Veterinary Bulletin 1992; 62(6) : 511-520.

105. Salisch H, Hinz KH, Graack HD, Ryll M. A Comparison of a Commercial PCR-based test to culture methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in Concurrently Infected Chickens. Avian Pathology 1998; 27: 142-147.

106. Salisch H, Ryll M, Hinz KH, Neumann U. Experiences with Multispecies Polymerase Chain Reaction and Specific Oligonucleotide Probes for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Pathology 1999; 28 : 337-344.

107. Santha M, Burg K, Rasko I, Stipkovits L. A Species-Specific DNA Probe for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. Infection and Immunity Nov 1987; 2857-2859.

108. Slavik MF, Wang RF, Cao WW. Development and Evaluation of the Polymerase Chain Reaction Method for Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. Molecular and Cellular Probes 1993; 7 : 459-463.

109. Snell GC. The Effects of Growth in Broth Containing Different Concentration of Glucose and Horse Serum on *Mycoplasma gallisepticum* Rapid Serum Agglutination Antigens. Journal of Biological Standardization 1981; 9 : 287-292.

110. Snell GC, Gullen GA. An evaluation of Rapid Serum Agglutination and Haemagglutination Inhibition Tests for Mycoplasmosis in Turkeys. Br Vet J 1978; 134 : 198-204.

111. Soeripto, Whithear KG, Cottew GS, Harrigan KE. Virulence and Transmissibility of *Mycoplasma gallisepticum*. Aust Vet Journal 1989; 66(3) : 65-72.

112. Soeripto, Whithear KG, Cottew GS, Harrigan KE. Immunogenecity of *Mycoplasma gallisepticum*. Aust Vet Journal 1989; 66(3) : 73-76.

113. Stallknecht DE, Luttrell MP, Fischer JR, Kleven SH. Potential for Transmission of the Finch Strain of *Mycoplasma gallisepticum* between House Finches and Chickens. Avian Diseases 1998; 42 : 352-358.

114. Stipkovits L, Kempf I. Mycoplasmoses in Poultry. Rev Sci Tech Off İnt Epiz 1996; 15(4) : 1495-1525.

115. T.C. Tarım ve Köyİşleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü. Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerinin Sağlık Kontrol Yönetmeliği, 1998, Ankara.

116. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. The Genera Mycoplasma and Ureaplasma. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8 Ed. Cornell University Press, 1988. ; 295-317.

117. Turner KS, Kleven SH. Eradication of Live F Strain *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Using Live ts-11 on a Multiage Commercial Layer Farm. Avian Diseases 1998; 42 : 404-407.

118. Türkarslan J. Mikoplasma Kültürlerinin Üreme İnhibisyon Testi ile İdentifikasyonu. Pendik Hayv Hast Merk Araşt Enst Derg 1989, XX (2) : 60-64.

119. Türkarslan J, Salihoğlu H. Çeşitli Besiyerleri Kullanılarak Mikoplasma gallisepticum' un Bakteriyolojik Yöntemlerle İzolasyon ve

İdentifikasyonu. Pendik Hayv Hast Merk Araşt Enst Derg 1989; XX (2) : 53-59.

120. Ülgen M. Kanatlıların Kronik Solunum Yolu İnfeksiyonu (Chronic Respiratory Disease-CRD) Üzerinde Karşılaştırmalı Bakteriyolojik ve Serolojik Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara, 1991.

121. Ülgen M, Şen A, Çarlı T. Tavuklardan İzole Edilen *Mycoplasma* Suşlarının Tracheal Organ Kültürlerinde Patogenitelerinin İncelenmesi 1995; Proje no:VHAG-1084/APD, Ankara.

122. Ülgen M, Mısırlıoğlu D, Şen A. Cıvıv Tracheal Organ Kültürlerinde *Mycoplasma gallisepticum* un Etkisinin Histopatolojik İncelenmesi. Etlik Vet Mikrob Enst Derg 1996; 8 (4) : 29-36.

123. Ülgen M, Çarlı T, Caner V. *Mycoplasma gallisepticum* İnfeksiyonlarında Aşıların Etkinliği. Çiftlik 1997; 159 : 96 - 105.

124. Vardaman TH. A Culture Medium for the Production of *Mycoplasma gallisepticum* Antigens. Avian Diseases 1967; 11(1) : 123-129.

125. Wang H, Fadl AA, Khan MI. Multiplex PCR for Avian Pathogenic *Mycoplasmas*. Moleculer and Celluler Probes 1997; 11 : 211-216.

126. Yagihashi T, Tajima M. Antibody Responses in Sera and Respiratory Secretions from Chickens Infected with *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases 1986; 30(3) : 543-550.

127. Yagihashi T, Nunoya T, Tajima M. Immunity Induced with an Aluminum Hydroxide-Adsorbed *Mycoplasma gallisepticum* Bacterin in Chickens. Avian Diseases 1987; 31(1) : 149-155.

128. Yoder HW, Hofsad MS. Characterization of Avian *Mycoplasma*. Avian Diseases 1964; 8 : 481-512.

129. Yoder HW. Nonspecific Reactions to *Mycoplasma* Serum Plate Antigens Induced by Inactivated Poultry Disease Vaccines. Avian Diseases 1989; 33 : 60-68.

130. Zain ZM, Bradbury JM. The Influence of Type of Swab and Laboratory method on the recovery of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in broth medium. Avian Pathology 1995; 24 : 707-716.

131. Zain ZM, Bradbury JM. Optimising the Conditions for Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* collected on Applicator swabs. Veterinary Microbiology 1996; 49 : 45-57.



9. ÖZGEÇMİŞ

İstanbul’ da 1974 yılında doğdum. İlk, orta, lise öğrenimimi İstanbul’da tamamladım. 1992 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesinde yüksek öğrenimime başladım ve 1997 yılında mezun oldum. Aynı sene Ekim ayında İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ nda doktora eğitimime başladım. 1998 yılı Aralık ayında İ.Ü.Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ na Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen görevime devam etmekteyim.

