

## TAVUKLARDA MYCOPLASMA GALLISEPTICUM'A KARŞI OLUŞAN ANTİKORLARIN ÇEŞİTLİ SEROLOJİK YÖNTEMLERLE (SPA, HI, AGP, ELISA) SAPTANMASI<sup>1</sup>

Ömer M. Esenal<sup>2</sup>

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

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

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

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

*All of the 900 chicken sera collected from broiler, layer and breeder flocks were evaluated with SPA, HI, AGP and ELISA. Among these sera 182 (20.2 %), 128 (14.2 %), 51 (5.7 %) and 543 (60.3 %) were found to be positive by the above mentioned tests, respectively. Therefore, in detecting M. gallisepticum antibodies, ELISA was found to be more sensitive than SPA, HI and AGP tests.*

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

<sup>1</sup> Aynı başlıklı Doktora tezinden özetlenmiş olan bu çalışma A Ü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (90 30 00 13 No'lu proje).

<sup>2</sup> Dr., A Ü Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ank.

**Özet:** Bu çalışmada, konvansiyonel testlerle (SPA, HI, AGP) birlikte ELISA tekniğinin, tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* infeksiyonlarının serolojik tanısındaki rollerini belirlemek amaçlandı.

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

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

Broyler, yumurtacı ve damızlık sürülerinden temin edilen toplam 900 adet tavuk serumunun tümü SPA, HI, AGP ve ELISA ile değerlendirildi. Sırasıyla 182 (% 20.2), 128 (% 14.2), 51 (% 5.7) ve 543 (% 60.3) pozitif serum saptandı. Buna göre, pozitifleri saptamada ELISA > SPA > HI > AGP sırası elde edildi.

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

## Giriş

Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* infeksiyonları, Kronik Solunum Sistemi Hastalığı (Chronic Respiratory Disease-CRD) olarak bilinen ve tavuk yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan, oldukça bulaşıcı bakteriyel bir infeksiyondur. Hastalık, solunum sistemi bozukluklarına ilaveten yumurtacı ve damızlık tavuklarda yumurta veriminde azalmalara ve embriyonik ölümlere, broylerlerde ise canlı ağırlık kayıplarına yol açar (53).

*M. gallisepticum*, 0.3-0.8 µm boyutlarında Gram negatif, pleomorfik, hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz bir mikroorganizmadır (5, 9). *M. gallisepticum*'da hücre duvarı ve sert bir peptidoglikan polimeri yerine, ünit membran yapısında 3 katmanlı bir sitoplazmik membran ve bu membrandan kaynaklanarak etkenin epitel hücrelerine ve

eritrositlere tutunmalarına aracılık eden polar kabarcıklar bulunur (1, 18). Yaygın olarak kullanılan antimikrobiyel maddelere karşı duyarlı olan *M. gallisepticum*, hücre duvarının ve peptidoglikan polimerinin bulunmaması nedeniyle penisilin ve talyum asetatı direnç gösterir (25, 54).

*M. gallisepticum*, aerobik veya fakültatif anaerobik olup (13), üretilmesi için kolesterol'e ihtiyaç duyan bir mikroorganizmadır. Etkenin üretilmesi için besi yerine at, domuz veya kanatlı serumlarıyla birlikte, çeşitli maya ürünlerinin katılması üremeyi güçlendirir (3). Besi yerlerine çeşitli karbonhidratların katılması da üreme üzerinde olumlu etkide bulunur (8, 14, 30). Antijen üretimi ve izolasyon amacıyla çok çeşitli besi yerleri denenmiş ve geliştirilmiştir (15, 39). *M. gallisepticum*, 37°C de ve rutubetli bir ortamda (13), 3-5 günlük bir inkubasyon sonunda agar üzerinde ince, yuvarlak, kenarları düzgün ve ortaları düğmeli tarzda tipik koloniler oluşturarak ürer (5, 54). *M. gallisepticum*'un üretilmesi için embriyolu tavuk yumurtaları (24) ve doku kültürleri de (5) kullanılabilir.

*M. gallisepticum*, doğal koşullarda tavuk ve hindilerde infeksiyon meydana getirir (36). Hastalık her yaştaki tavukta görülürken, ağır kayıplar en çok 5-16 haftalık hayvanlarda gözlenir (48). Tavuk sürülerinde *M. gallisepticum*'un bulaşması vertikal veya horizontal olarak şekillenmektedir (19, 54). Genellikle 5-7 günlük bir inkubasyon periyodundan sonra (9) hastalığa bağlı klinik belirtiler şekillenir ve kış aylarında bu belirtiler oldukça şiddetlenir (37, 54). Hayvanlarda hırıltılı soluma, burun akıntısı, aksırık-tıksırık, soluma güçlüğü, sinüsitis ve konjunktivitis (9, 54) ile birlikte bazen de tortikollis ile karakterize sinirsel belirtiler (55) gözlenir. Genellikle % 10-50 arasında morbidite gösteren komplike olmamış CRD olgularında mortalite % 5-10 arasında değişirken (37), infeksiyonun başta sıklıkla *E. coli*, IB ve ND virüsleri gibi etkenlerle komplike olması sonucunda mortalite % 30'a kadar çıkabilir (9, 36). Hastalık çeşitli bakteriyel ve viral hastalıklarla karışabilir. Kesin teşhis amacıyla dokulardan ve eksudatlardan etken izolasyon ve identifikasyonu için laboratuvar muayenelerine gereksinim vardır (5, 9, 44).

Hasta ve yeni ölmüş tavuklardan etken izolasyonu için trachea eksudatları, türbinatlar, akciğerler, torakal ve abdominal hava keseleri ile birlikte infra-orbital sinus eksudatları ve eklem sıvıları kullanılır (54). Timms (44), izolasyon ve identifikasyonda karşılaşılabilecek çeşitli zorlukları bildirerek bu zorluklarla birlikte uygulanmakta olan

kültürel tekniklerin yavaş ve zahmetli olduklarını, infekte hayvanlarda meydana gelen antikorların varlığını ve titrelerini ortaya koyan serolojik testlerin, infeksiyonun teşhisinde önem kazandıklarını vurgulamıştır.

CRD'ye karşı tavuklarda oluşan antikorlar serum lam aglutinasyon (SPA) (11, 16, 42) hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) (10, 16, 25, 33), agar-jel presipitasyon (AGP) (6, 26, 34, 35) ve ELISA (4, 28, 38, 40) gibi serolojik yöntemlerle saptanabilir.

Adler (1) 1954 yılında, CRD'li tavukların serumlarında oluşan spesifik antikorların saptanması amacıyla lam aglutinasyon testinin kullanılabilirliğini bildirmiştir. SPA testi doğal veya deneysel infeksiyonlardan 1 hafta sonra serumda görülmeye başlanan, yaklaşık 20 hafta kadar diagnostik düzeyde kalan ve genellikle IgM yapısında olan antikorları tespit eder (31, 45). Testte 1/10.000 oranında Kristal Viyole veya Rose Bengal ile boyanmış (11, 12) ve % 0.25 oranında fenol ilave edilmiş antijenler (3) kullanılır. CRD infeksiyonlarının teşhisinde hızlı, basit ve duyarlı bir test olmasına karşın araştırmacılar SPA testinin, kontamine serumlar, dondurulmuş-çözdürülmüş serumlar, *M. synoviae*, *S. aureus* veya *Str. faecalis* ile infekte hayvan serumları ile Erysipelas bakterini verilmiş tavuk serumlarında non-spesifik reaksiyonlar verdiğini bildirmişlerdir (8, 12, 41, 42). Tavuklara kombine ND+IB+ILT inaktif viral aşularının verilmesi sonucu oluşan anti-globulinler de aşılama sonrası 8. günde başlayan ve 36. güne kadar devam eden non-spesifik reaksiyonlara yol açarlar (7, 12, 42). Oluşan bu non-spesifik SPA reaksiyonlarının HI ve AGP testleri ile veya serumların 1/5 sulandırılmaları ile giderilebileceği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (7, 12, 42, 45, 54).

Kanatlı Mycoplasma'larının tavuk eritrositlerini aglutine ettikleri ve bu reaksiyonun infekte tavuk serumları tarafından inhibe edilebildiği ilk kez Van Herick ve Eaton (47) tarafından 1945 yılında bildirilmiştir. Gianforte ve ark. (16), inceledikleri 7 suşun tümünün 1/32 sulandırmada tavuk eritrositlerini aglutine ettiklerini açıklamışlar, Kuniyasu ve Ando (21) ise, farklı antijen gruplarında 1/40 ile 1/320 arasında değişen HA titreleri saptadıklarını bildirmişlerdir. Falcy ve Crawley (14), *M. gallisepticum* buyyon kültürlerinin HA aktivitelerini incelemişler, sıvı kültürlerde inkubasyonun 3. gününden itibaren HA aktivitesinin saptanmaya başladığını, bu HA aktivitesinin 7-10. günlerde maksimum titreye ulaştığını ve titrenin nadiren 1/16'nın üzerine çıktığını belirtmişlerdir. HA testi, CRD'den şüpheli

materyallerde ve kültürlerde *M. gallisepticum* bulunup bulunmadığının araştırılmasında ve ayrıca serumdaki hemaglutininlerin varlığını ortaya koymak amacı ile yapılan HI testinde antijenin titresini belirlemek amacı ile yapılır (14, 21, 44, 54).

Hemaglutinasyon-İnhibisyon (HI) testi, doğal veya deneysel infeksiyondan yaklaşık 2 hafta sonra ortaya çıkan ve uzun süre diagnostik seviyenin üzerinde kalan ve genellikle IgG yapısında olan antikorları saptar (10, 14, 31, 35). CRD infeksiyonunun inkubasyon periyodunda infekte hayvanların serum HI titreleri düşüktür fakat infeksiyondan yaklaşık 3 hafta sonra 1/320 veya daha yüksek titrelere ulaşarak, 19-34 hafta veya daha uzun bir süre diagnostik düzeyin üzerinde kalır (25). HI testinde titresini önceden belirlenen antijen genellikle 4 HA ünitesinde sabit tutularak kullanılır (14, 25). Ayrıca antijenin 2 HA (16) veya 8 HA (41) ünitesinde kullanılabilirliği de bildirilmektedir. Fahey ve Crawley (14), HI testi ile standardizasyon çalışmalarında en iyi sonuçların % 1 eritrosit konsantrasyonu ile alındığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, antijen-antikor reaksiyonunun oluşabilmesi için 15 dakikalık sürenin yeterli olacağını, eritrosit ilavesinden sonra ise HI reaksiyonunun oda ısısında 1 saat içinde okunabileceğini açıklamışlardır. Oda ısısında 1 saatlik inkubasyon sonunda sonuçları değerlendirilen HI testinde, 1/80 veya daha yüksek serum titreleri pozitif; 1/40 serum titreleri şüpheli; 1/20 veya daha düşük titreler ise negatif olarak değerlendirilirler (33). Vardaman ve Yoder (49, 50) ve Villegas ve ark. (51), *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* için hazırladıkları antijenlerin, HI testi ile bu infeksiyonların ayırımında iyi bir spesifite gösterdiklerini, SPA testi ile saptanan kros-reaksiyonların bu test ile giderildiğini bildirmişlerdir. Vardaman ve Yoder (49), inceledikleri 76 adet *M. synoviae* ile infekte hayvan serumundan 38 (% 50) adedinin *M. gallisepticum* SPA antijeni ile reaksiyon verdiğini, tüm serumların ise *M. gallisepticum* HI testinde negatif bulunduğunu açıklamıştır. Timms ve Cullen (45), *M. gallisepticum* S6, F veya WS7 suşlarıyla eprüve edilen piliçlerin antikor yanıtlarını incelemişler; 28 haftalık deneme süresince tavuklardaki infeksiyonların homolog ve heterolog antijenlerle belirlenebildiğini ancak, homolog antijenlerle daha yüksek titreler elde edildiğini göstermişlerdir. Sahu ve Olson (33), 36 kümeşe ait 43040 adet broyler serumunu SPA ve HI testleriyle *M. gallisepticum* antikorları yönünden incelemişler ve SPA negatif serum örneklerinin HI antikorları yönünden de test edilmelerinin önemini ortaya koymuşlardır. Timms ve Cullen (46), hem deneysel infekte piliç serumlarında hem de saha serumlarında

görülen zayıf ve geçici *M. gallisepticum* SPA pozitif test sonuçlarının HI testinde negatif bulduklarını bildirmişlerdir. Villegas ve ark. (51), CRD infeksiyonlarının serolojik tanısında kullanılan SPA testinin bir tarama testi olduğunu, HI testinin ise daha ziyade bir doğrulama testi olarak kullanıldığını belirtmiş ve oldukça spesifik olan ve kısa sürede sonuç veren HI testinin sadece IgG sınıfı antikorları saptadığından, SPA testi pozitif olduktan ancak birkaç hafta sonra diagnostik düzeyde titreler vereceğini bildirmişlerdir.

CRD infeksiyonunun teşhisinde kullanılan testlerden bir diğeri de Agar-Jel Presipitasyon (AGP) testidir (20, 34, 35). Bu test, şüpheli kan serumlarındaki *M. gallisepticum* antikorlarını saptamanın yanı sıra (8), izole edilen *Mycoplasma* kültürlerinin identifikasyonu (26) ve *Mycoplasma* türlerinin sınıflandırılmasında da (6) kullanılabilir. Nonomura ve Yoder (26), kanatlı *Mycoplasma*'larının identifikasyonu üzerinde yaptıkları bir çalışmada, hücreleri kuru buz-alkol banyosunda 10 kez dondurup çözündürerek, 20.000 rpm'de 1, 2, 4 veya 10 dakika sonike ederek veya sodyum dezoksikolat (SD) ve sodyum dodesilsülfat (SDS) gibi deterjanlarla muamele ederek parçalanışlar ve böyle hazırladıkları antijenleri AGP testinde kullanmışlardır. İzolatların spesifik antiserumlarla identifiye edilmelerinde test oldukça spesifik bulunmasına karşın araştırmacılar, doğal infekte tavuk sürülerine ait serumlardan çok azının bu test ile pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Sahu ve Olson (34), damızlık broyler sürülere ait kan serumlarını SPA, HI ve AGP testleri ile *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* antikorları yönünden incelerken *M. gallisepticum* SPA testinde meydana gelen non-spesifik reaksiyonların HI ve AGP testlerinde oluşmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, başka bir çalışmada ise (35), SPA, HI ve AGP test sonuçları arasında iyi bir korelasyon bulmuşlar ve etken izolasyonunun yapılamadığı durumlarda bu 3 serolojik testin, infeksiyonun teşhisindeki önemini ortaya koymuşlardır.

İnfeksiyonun teşhisi amacıyla kullanılan ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) son yıllarda geliştirilmiş ve çeşitli araştırmacılar tarafından diğer tüm testlere oranla daha duyarlı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (4, 27, 28, 29, 38, 40). Testte kullanılan antijen genellikle hücrelerin sonikasyonu (28, 40) ile veya sodyum dodesilsülfat gibi deterjanlarla parçalanması (4, 27, 38) sonucunda hazırlanır ve mikrotiter plate'lere adsorbe edilir. Testte konjugat olarak peroksidazla (4, 29) veya alkalin fosfatazla (27, 38) işaretlenmiş tavşan anti-tavuk IgG'leri (H+L) ve substrat olarak da peroksidaz enzimi için 2-2'-azino-di- (3-etilbenzotiazolinsülfat) (ABTS), 5-aminosalisilik asit

+ hidrojen peroksit veya ortofenilendiamin (4, 40), alkalin fosfataz enzimi için de para-nitrofenil fosfat (27, 38) kullanılır. Ansari ve ark. (4). ELISA'nın HI'den daha duyarlı olduğunu fakat *M. synoviae* ile infekte hayvan serumları ile kros-reaksiyonlar verdiğini, ayrıca konjugat'ın plate yüzeyine non-spesifik olarak bağlanması sonucu yine non-spesifik reaksiyonların şekillenebileceğini ortaya koymuşlardır. Opitz ve ark. (27), deneysel olarak *M. gallisepticum* R suşu ile infekte ettikleri tavuklarda infeksiyondan sonra 8. günde SPA, 21. günde HI ve 28-35. günlerde de ELISA ile % 100 pozitiflik saptadıklarını, *M. gallisepticum* F suşu ile infekte ettikleri ve ELISA ile pozitif olan tavukların % 98'inin SPA ve % 80'inin de HI pozitif sonuç verdiklerini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar HI testinin ELISA'dan daha spesifik olduğunu ileri sürmüşlerdir. Patten ve ark. (28), ELISA'yı HI testinden çok daha duyarlı bulmuşlar ve deneysel olarak infekte ettikleri hayvanlardan, infeksiyon sonrası 2. haftada 21 tavuktan 9 adedini (% 43) ELISA, 5 adedini de (% 24) HI ile pozitif, 4. haftada 24 tavuktan 16 adedini (% 67) ELISA, 13 adedini (% 54) HI ile pozitif bulmuşlardır. Talkington ve ark. (38), tavuklarda *M. gallisepticum*'a karşı oluşan humoral yanıtın ölçülmesinde SPA, HI ve ELISA yöntemlerini karşılaştırmalı olarak denemişler ve deneysel olarak infekte ettikleri tavuklarda inokulasyondan sonraki 5. güne kadar SPA testinin negatif kaldığını, 7. günde hayvanların % 94'ünün ve 10. günden 35. güne kadar da hayvanların tümünün bu test ile pozitif saptandığını açıklamışlardır. Araştırmacılar, HI testinde 10. güne kadar pozitif reaksiyon saptayamadıklarını, 14. günde hayvanların % 83'ünün ve 21. günden 35. güne kadar da tümünün pozitif HI titreri gösterdiklerini; ELISA'da ise 7. güne kadar hayvanlarda % 4.55-5.26 oranında, 7. günde % 79 ve 35. günde de % 100 oranında pozitiflik saptadıklarını, bu sonuçlara göre ELISA'nın SPA'dan daha az duyarlı fakat HI'den çok daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

*M. gallisepticum* streptomisin, oksitetrasiklin, eritromisin, spiramisin ve tylosin gibi çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlıdır (53, 54). Antibiyotik sağaltımı, özellikle, akut infeksiyonlarda ölümleri ve ağır kayıpları önlemesi bakımından etkili olabilir fakat hiçbir zaman için hastalığın tam olarak eradike edilmesini sağlayamaz. İnfeksiyonun yayılmasını önlemek amacıyla antibiyotik uygulamalarının yanısıra iyi bir bakım ve beslenme ve damızlık hayvanların serolojik olarak gözlem altında tutulmaları hedef alınmıştır (18). İnfeksiyonun kontrolü amacı ile hayvanların canlı veya inaktif aşılarla aşılmalari çeşitli araştırmacılar tarafından denenmiş fakat aşılmalari ile pek olumlu sonuçlar alınamamıştır (2).

### Materyal ve Metot

#### Serumlar

A- Test serumları: Çalışmada kullanılan 900 adet serum kasaplık, yumurtacı ve damızlık yönünden yetiştiricilik yapılan özel işletmelerden ve Ankara Sincan Tavuk Mezbahasından temin edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Kan serumlarının alındıkları yerler ve sayıları

Serum cinsi	Sağlandığı kaynak	Serum sayısı	Toplam
Broyler	Bakteriyoloji Bilim Dalı	68	308
	Sincan Tavuk Mezbahası	228	
	Ticari İşletme I*	—	
	Ticari İşletme II**	—	
	Ticari İşletme III***	5	
Ticari İşletme IV****	7		
Yumurtacı	Bakteriyoloji Bilim Dalı	212	283
	Sincan Tavuk Mezbahası	—	
	Ticari İşletme I	31	
	Ticari İşletme II	—	
	Ticari İşletme III	26	
Ticari İşletme IV	14		
Damızlık	Bakteriyoloji Bilim Dalı	10	309
	Sincan Tavuk Mezbahası	—	
	Ticari İşletme I	211	
	Ticari İşletme II	80	
	Ticari İşletme III	—	
Ticari İşletme IV	8		
Toplam			900

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

B- Kontrol serumları: İki adet 16 haftalık sağlıklı Beyaz Leghorn tavuğa haftada 2 kez olmak üzere 3 hafta süreyle *M. gallisepticum* S6 suşunun 5 günlük buyyon kültüründen göğüs kasına 0.5 ml verilmiştir. Son enjeksiyondan 1 hafta sonra hayvanların kanları alın-



rak serumları çıkarılmış ve çalışmada pozitif kontrol serum olarak kullanılmıştır. Çalışmada, negatif kontrol serumları olarak da Manisa Tavuk Hastalıkları ve Aşı Üretim Enstitüsü'nden sağlanan SPF tavuk serumları kullanılmıştır.

#### Standart Suşlar

Çalışmada, serolojik testlerde (HI, AGP, ELISA) kullanılacak antijenleri hazırlamak amacı ile liyofilize *M. gallisepticum* S6 suşları, Dr. Kaoru KOSHIMIZU (Japonya) ve Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Mycoplasma Bölüm Laboratuvarı'ndan (İstanbul) temin edilmiştir.

#### Besi Yerleri

A- Mycoplasma besi yerleri: Çalışmada, suşların üretimi ve antijenlerin hazırlanmasında % 15-20 at serumu, % 1 maya ekstraktı, % 1 glukoz, 200-500 IU/ml penisilin ve 1/4000 oranında talyum asetat ilave edilmiş PPLO broth ve PPLO agar (DIFCO) kullanılmıştır.

B- AGP test ortamı: Denemede, AGP testi, içinde % 8 NaCl ve % 1.25 Noble Agar (DIFCO) içeren ortamda gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel kontaminasyonları önlemek amacı ile ortama 1/10.000 oranında mertyolet ilave edilmiştir (26).

#### Konjugat

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

#### Substrat

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

#### Solusyonlar ve Tampon Sıvılar

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

B- Fizyolojik tuzlu su: 85 g NaCl, 1000 ml distile su içinde eritilerek otoklavda sterilize edilmiş ve HA ve HI testlerinde sulandırma sıvısı olarak kullanılmıştır.

C- Özel yıkama solusyonu: Bu solusyon, eşit miktarda, A solusyonu (9.73 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / 1000 ml distile su) ve B solusyonunun (9.46 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ / 1000 ml distile su) karıştırılması ve bu karışımdan 1 kısım solusyonun 9 kısım C solusyonuna (85 g NaCl/ 1000 ml distile su) ilave edilmesiyle hazırlanmış ve antijenin yıkanmasında kullanılmıştır.

D- Coating buffer: 8.4 g sodyum bikarbonat ve 0.2 g  $\text{NaN}_3$ , 1000 ml distile su içinde eritildikten sonra otoklavda sterilize edilerek hazırlanan Coating buffer, ELISA'da antijenin sulandırılmasında kullanılmıştır.

E- Fosfat buffer solusyonu: 8 g NaCl, 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 2.9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1000 ml distilite su içinde eritilerek sterilize edilmiş ve hazırlanan PBS, ELISA'da substratın sulandırılmasında kullanılmıştır.

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

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

Yıkanmış Tavuk Eritrosit Süspansiyonunun Standardize Edilmesi: Tavuk eritrositleri % 0.5, 1, 1.5 ve 2 oranında sulandırılıp HA ve HI testlerinde kullanılmıştır.

Mikroplate'ler: Denemede kullanılan HA, HI ve ELISA testlerinde, Greiner firmasına ait, 96 çukurlu ve yuvarlak tabanlı mikroplate'lerden yararlanılmıştır.

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

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

Micro ELISA Mini Reader (Dynatech): ELISA'nın değerlendirilmesi micro ELISA mini reader MR590 cihazında 490 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Sonikatör: ELISA ve AGP antijenlerinin parçalanması sonikatörde (Sonic 300 Dismembrator, Fisher Scientific) gerçekleştirilmiştir.

### Antijenler

A- Serum Lam Aglutinasyon (SPA) antijeni: Çalışmada, serum lam aglutinasyon testinde, Nobilis firması tarafından hazırlanmış boyalı CRD lam aglutinasyon antijeni kullanılmıştır.

B- Hemaglutinasyon (HA) ve Hemaglutinasyon-İnhibisyon (HI) antijenleri: Çalışmada, HA ve HI antijenleri Adler ve Yamamoto'nun (3) bildirdikleri yöntemle göre hazırlanmıştır. Japonya'dan temin edilen *M. gallisepticum* S6 suşu katı besi yerinde üretildikten sonra koloniler agarla birlikte kesilerek 5 lt'lik PPLO buyyona ekilmiş ve 3 gün süre ile üretilmiştir. İnkubasyon süresi sonunda kültür  $+4^{\circ}\text{C}$  de ve 10.000 rpm de 30-45 dakika santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen sediment özel yıkama solusyonu ile 3 kez yıkanmış ve son yıkamadan sonra, sediment aynı solusyon ile orijinal volümünün 1/100'ü oranında sulandırılarak testlerde antijen olarak kullanılmıştır.

C- Agar-Jel Presipitasyon (AGP) antijeni: Çalışmada, AGP antijeni, Nonomura ve Yoder'in (26) bildirdikleri yöntemle göre hazırlanmıştır. HA ve HI testleri için hazırlanan antijen,  $-20^{\circ}\text{C}$  de 10 defa dondurulup çözündürülerek ve ayrıca 10 dakika süreyle sonike edilerek parçalanmış ve buz dolabında 2-3 saat çökmesi için beklendikten sonra üst sıvısı AGP testinde antijen olarak kullanılmıştır.

D- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) antijeni: Denemede, ELISA antijeni, Heitmann ve ark.'nın (17) bildirdikleri yöntemle göre hazırlanmıştır. Japonya'dan temin edilen *M. gallisepticum* S6 suşu  $37^{\circ}\text{C}$  de, aerobik ortamda 72 saat süreyle 700 ml'lik PPLO buyyonda üretilmiş ve inkubasyon sonunda kültür 20.000 rpm de 30 dakika santrifüje edilerek sediment 2 kez FTS ile yıkanmıştır. Daha sonra sediment, distile su ile 1/100 oranında sulandırılmış,  $-20^{\circ}\text{C}$  de 3 kez dondurulup çözündürülmüş ve ayrıca 10 dakika sonike edilerek parçalanmış ve ELISA'da antijen olarak kullanılmıştır. ELISA antijeninin protein miktarı Büret yöntemiyle tayin edilmiştir (4).

Serum Lam Aglutinasyon (SPA) testi: Bu test, Timms ve Cullen'in (45) bildirdikleri yöntemle göre yapılmıştır. Temiz bir lam üzerinde 0.02 ml inaktive edilmemiş ve sulandırılmamış serum ve 0.02 ml boyalı CRD antijeni karıştırılmış ve 2 dakika içinde oluşan kümeleşme pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Hemaglutinasyon (HA) testi: Bu test, Matsuo ve ark.'nın (22) bildirdikleri yöntemle göre mikropate'lerde yapılmıştır. Testte plate' in bütün gözlerine 0.025 ml FTS konulmuş ve sonra yukarıdan aşağıya doğru plate'in birinci gözlerine antijenden 0.025 ml ilave edilerek otomatik sulandırıcı ile soldan sağa doğru 1/2 sulandırmadan başlayarak antijenin iki katlı sulandırmaları yapılmıştır. Daha sonra, tüm gözlerle 3 kez yıkamış % 1'lik tavuk eritrositinden 0.025 ml ilave edilerek 10-15 saniye çalkalanmış ve oda ısısında 45 dakika bekletilmiştir. Dantela tarzında çöküntünün olduğu gözlerde reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiş ve pozitif reaksiyon görülen en son sulandırma antijenin HA titresini olarak alınmıştır. Eritrositlerin nokta tarzında kümeleşmesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Hemaglutinasyon-İnhibisyon (HI) testi: Bu test, Matsuo ve ark.'nın (22) bildirdikleri yöntemle göre mikropate'lerde yapılmış ve değerlendirilmiştir. Plate'ni bütün gözlerine 0.025 ml FTS konulmuş, daha sonra yukarıdan aşağıya doğru plate'in birinci gözlerine test edilecek serumların 1/5'lik sulandırmasından 0.025 ml ilave edilerek, soldan sağa doğru iki katlı sulandırmaları yapılmış, 4 HA ünitesinde sabit tutulan antijenden bütün gözlerle 0.025 ml konularak 10-15 saniye çalkalanmış ve oda ısısında 15-20 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, bütün gözlerle 3 kez yıkamış % 1'lik tavuk eritrositinden 0.025 ml ilave edilerek hafifçe çalkalanmış ve oda ısısında 45-60 dakika bekletilmiştir. Düşme tarzında çöküntünün görüldüğü gözlerde reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiş, pozitifliğin görüldüğü en son sulandırma, serumun HI titresini olarak kabul edilmiştir. Değerlendirmede, 1/80 ve daha yüksek titreler CRD yönünden pozitif, 1/40 titreler şüpheli ve 1/20 ve daha düşük titreler ise negatif olarak kabul edilmişlerdir. Denemede, standart pozitif ve negatif serumlar da kullanılmıştır.

Agar-Jel Presipitasyon (AGP) testi: Bu test, Nonomura ve Yoder'ii (26) bildirdikleri yöntemle göre, 5 cm çapındaki plastik petri kutularında yapılmıştır. İçerisinde % 8 oranında NaCL bulunan, % 1.25'lik Noble Agar petri kutularına 10 ml miktarında dökülmüştür. Agar katılaştıktan sonra üzerinde 4 mm çapında ve aralarında 4 mm mesafe bulunan 7 çukur, birisi merkezde altısı periferde olmak üzere açılmış ve çukurların dipleri pastör pipeti kullanılarak birer damla agar ile kapatılmıştır. Ortadaki çukura AGP antijeni, çevredeki çukurlara ise test serumlarından çukurlar tamamen dolana kadar ilave edilmiş ve petriyer oda ısısında ve nemli bir ortamda 48-72 saat süreyle inku-

be edilmiştir. Antijenle arasında presipitasyon çizgisi oluşan serumlar, pozitif ve negatif kontrol serumlarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA):** Bu test, Heitmann ve ark.'nın (17) bildirdikleri yöntemle göre antijen ve konjugat titrasyonu, negatiflik kriterinin belirlenmesi ve testin uygulanması olmak üzere 4 aşamada gerçekleştirilmiştir.

**Antijen titrasyonu:** Hazırlanan antijenin Coating buffer'da 1/50' den başlayarak iki katlı sulandırmaları tüplerde hazırlanmış ve bu sulandırmalardan plate'nin gözlerine soldan sağa doğru ilk sıraya 0.025 ml 1 / 50 sulandırmadan, ikinci sıraya 0.025 ml 1 / 100 sulandırmadan olmak üzere sekizinci sıraya da 0.025 ml 1 / 6500 sulandırmadan konularak plate 37°C de 3 saat nemli bir ortamda inkube edilmiştir. Süre sonunda plate PBS-Tween 20 ile 3 kez yıkanmış ve yukarıdan aşağıya doğru ilk gözlere pozitif serumdan 0.050 ml, diğer gözlere ise 0.025 ml PBS-Tween 20 konularak soldan sağa doğru serumun iki katlı sulandırması yapılmış, 37°C de 30 dakika inkubasyondan sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Titresi 1 / 100 olarak bilinen kanatlı konjugatından bütün gözlere 0.025 ml ilave edilmiş ve 37°C'de 30 dakika inkube edilmiştir. Son yıkamayı takiben, 50 ml PBS içinde sulandırılan 40 mg 5-aminosalisilik asit + 10 µl hidrojen peroksit'den bütün gözlere 0.050 ml konularak oda ısısında 30-45 dakika tutulmuş, sonuçlar gözle ve minireader ile değerlendirilmiştir.

**Konjugat titrasyonu:** Coating buffer'da 1 / 500 oranında sulandırılan antijenden plate'in bütün gözlerine 0.025 ml konularak 37°C'de nemli bir ortamda 3 saat inkubasyona bırakılmıştır. Plate soldan sağa doğru 6 bölüme ayrılmış ve yine soldan sağa doğru ilk gözlere bilinen pozitif ve negatif serumlardan 0.050 ml, diğer gözlere de 0.025 ml PBS-Tween 20 konulmuş ve serumların yukarıdan aşağıya doğru iki katlı sulandırmaları yapılmış, 37°C'de 30 dakika inkubasyonu takiben yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Konjugatın, tüplerde PBS-Tween 20 içinde 1 / 100 sulandırmadan başlayarak iki katlı olmak üzere 1 / 3200 e kadar sulandırmaları yapılmış ve bu sulandırmalardan her birinden, yukarıdan aşağıya doğru ayrılan 6 bölümün bütün gözlerine 0.025 ml konulmuştur. 37°C de 30 dakika inkubasyondan sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Son aşamada, bütün gözlere 0.050 ml substrat ilave edilerek oda ısısından 30-45 dakika tutulmuş, sonuçlar gözle ve minireader ile değerlendirilmiştir.

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

ELISA'nın uygulanması: ELISA, Heitmann ve ark.'nın (17) bildirdikleri yöntemle göre mikroplate'lerde yapılmıştır. Plate'in bütün gözlerine Coating buffer'da 1 / 500 oranında sulandırılmış antijenden 0.025 ml konulmuş ve 37°C'de nemli bir ortamda 3 saat inkubasyondan sonra PBS-Tween 20 ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra, test edilecek serumlar 1 / 5 oranında PBS-Tween 20'de sulandırılmış ve plate'in soldan sağa doğru ilk gözlerine 0.050 ml miktarında konulmuş, diğer gözlerle de 0.025 ml PBS-Tween 20 konularak, serumların yukarıdan aşağı doğru 0.025 ml aktarılarak iki katlı sulandırmaları yapılmıştır. 37°C'de 30 dakika inkubasyondan sonra, yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Plate'in gözlerini, PBS-Tween 20 içinde 1 / 500 oranında sulandırılmış konjugattan 0.025 ml konularak 37°C'de inkubasyona bırakılmıştır. Son yıkamayı takiben, bütün gözlerle 0.050 ml substrat ilave edilerek oda ısısında 30-45 dakika tutulmuştur. Sonuçta, her bir gözün absorbansı 490 nm de (optik dansite) minireader ile değerlendirilmiş ve negatiflik eşiğinin üstünde kalan en son sulandırmaya kadar reaksiyon pozitif kabul edilmiştir.

İstatistik değerlendirmeler: SPA testine göre ELISA ve HI testlerinin spesifikite ve sensitivite değerlendirmeleri Thrusfield'in bildirdiği yöntemle göre yapılmıştır (43).

### Bulgular

Hiperimmün serum: Denemede, testlerde kontrol amacı ile kullanılan pozitif serumun (hiperimmün serum) titresi HI testinde 1 / 1280 olarak belirlenmiştir.

Kan konsantrasyonunun standardizasyonu: HA ve HI testlerindeki gerek dantela gerekse düğme tarzındaki çöküntüler en iyi % 1'lik eritrosit süspansiyonunda görüldüğünden, kanın bu konsantrasyonu HA ve HI testlerinde kullanılmıştır.

Hemaglutinasyon testi sonuçları: Denemede hazırlanan antijenin HA titresini saptamak amacı ile, mikroplate'lerde bu test 8 kez tekrarlanmış ve titre 1 / 128 olarak belirlenmiştir. Deneme süresince,

her çalışmadan önce, antijenin titresini kontrol etmek için bu test yeniden yapılmış ve titrede bir değişiklik saptanamamıştır.

ELISA antijeninin protein miktarının tayini sonuçları: Hazırlanan ELISA antijeninin kullanılmadan önce büret metodu ile total protein miktarı hesaplanmış ve 7 mg/ml olarak bulunmuştur.

SPA test sonuçları: Denemede kullanılan 900 adet tavuk serumundan 182 adedi (% 20.2) SPA ile pozitif bulunurken 718 adet serum (% 79.8) negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 2).

HI test sonuçları: Denemede, toplam 900 adet tavuk serumu HI testi ile değerlendirilmiştir. Broiler serumlarından 193 (% 62.7) serum hiç HI titresi göstermezken 51 (% 16.6) serum 1/20 veya daha düşük, 27 (% 8.8) serum 1/40 ve 37 (% 12.1) serum da 1/80 veya daha yüksek titreler göstermişlerdir. Yumurtacı serumlarından 166 (% 58.7) serum hiç HI titresi göstermezken, 48 (% 16.7) serum 1/20 veya daha düşük, 18 (% 6.4) serum 1/40 ve 51 (% 18.0) serum da 1/80 veya daha yüksek HI titresi göstermişlerdir. Damızlık serumlarından ise 171 (% 55.3) serum HI titresi göstermezken, 65 (% 21.0) serum 1/20 veya daha düşük, 33 (% 10.7) serum 1/40 ve 40 (% 12.5) serum da 1/80 veya daha yüksek HI titreleri göstermişlerdir (Tablo 2). SPA ve HI testleri karşılaştırıldığında ise 182 adet toplam SPA pozitif serumdan 87'si (% 47.8) HI pozitif ve 95'i (% 52.2) HI negatif saptanırken (Tablo 3), 718 adet toplam SPA negatif serumdan 38'i (% 5.3) HI pozitif ve 680'i (% 94.7) HI negatif belirlenmiştir (Tablo 4). Bu sonuçlara göre HI testinin SPA testine göre sensitivitesi % 47.8 spesifitesi ise % 94.7 olarak hesaplanmıştır.

AGP test sonuçları: Denemede toplam 900 adet tavuk serumundan 51 adedi (% 5.7) pozitif bulunurken, 849 (% 94.3) serum ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 2).

#### ELISA Sonuçları:

a) Antijen titrasyonu: HI testi ile titresi 1/1280 olarak saptanan pozitif serumun, antijen sulandırmasında en iyi pozitif reaksiyon gösterdiği nokta antijenin titresi olarak değerlendirilmiştir. Bu titre 1/500 olarak belirlenmiş ve deneme süresince antijen 1/500 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

b) Konjugat titrasyonu: Titresi HI testinde 1/1280 olarak belirlenen pozitif serum ile 1/500 oranında sulandırılmış antijen kullanılarak yapılan konjugat titrasyonunda, titre 1/500 olarak saptanmıştır.

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

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



Tablo 3. SPA pozitif serum örneklerinin HI titre dağılımları

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

\*: Yüzde değeri

Tablo 4. SPA negatif serum örneklerinin HI titre dağılımları

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

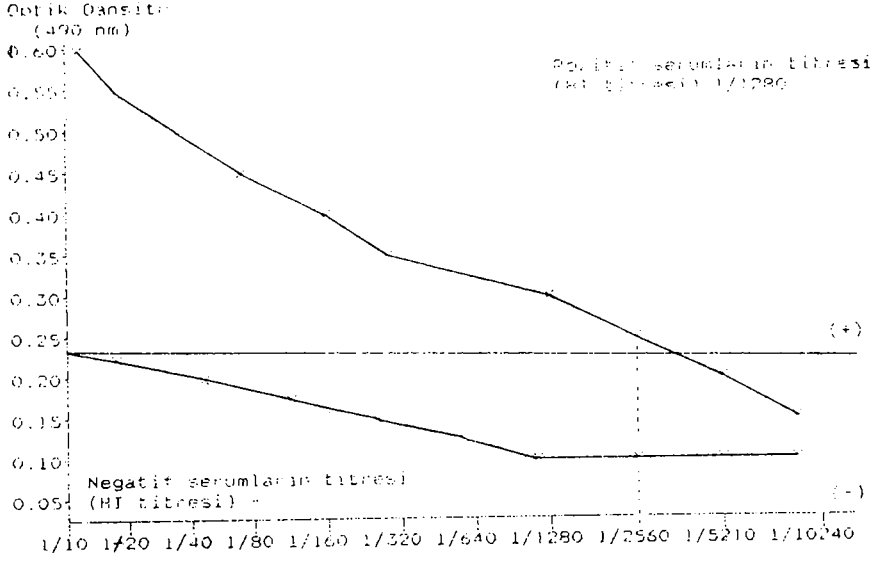
\*: Yüzde değeri

Deneme süresince, ELISA'da, konjugat 1 / 500 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

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

d) ELISA: ELISA'da 308 broyles serumundan 193 (%62.7) serum pozitif 115 (% 37.3) serum negatif; 283 yumurtacı serumundan 169 (% 59.7) serum pozitif, 114 (% 40.3) serum negatif, 309 damızlık serumundan da 181 (% 58.6) serum pozitif ve 128 (% 41.4) serum negatif bulunmuştur (Tablo 2). ELISA ve HI ile incelenen 900 serumun optik dansite (OD) ve HI titre dağılımları Grafik-2'de görülmektedir.

Grafik-1. ELISA'da negatif ve pozitif serumlarla negatiflik kriterinin belirlenmesi

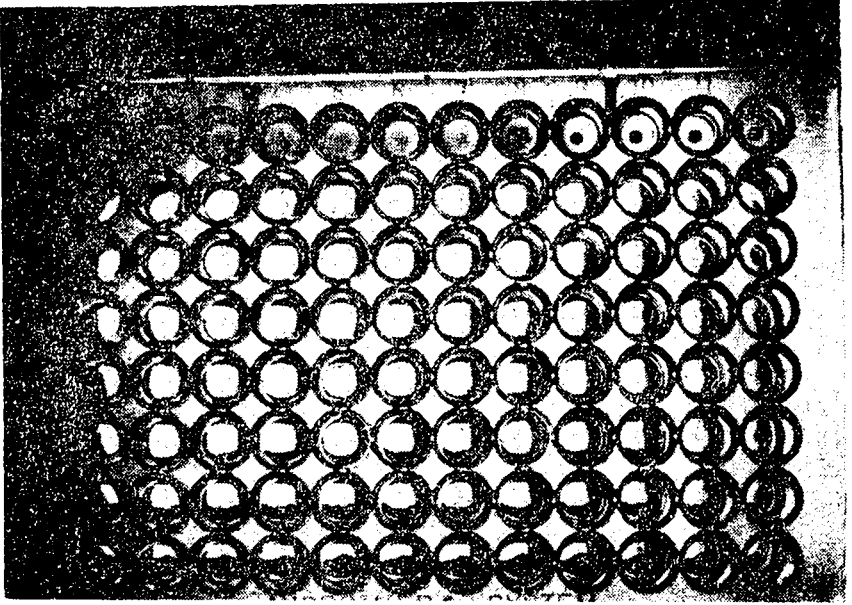


Grafik-2. ELISA ile incelenen 900 Serumun HI (optik dansite) ve HI Titrelerinin Dağılımı

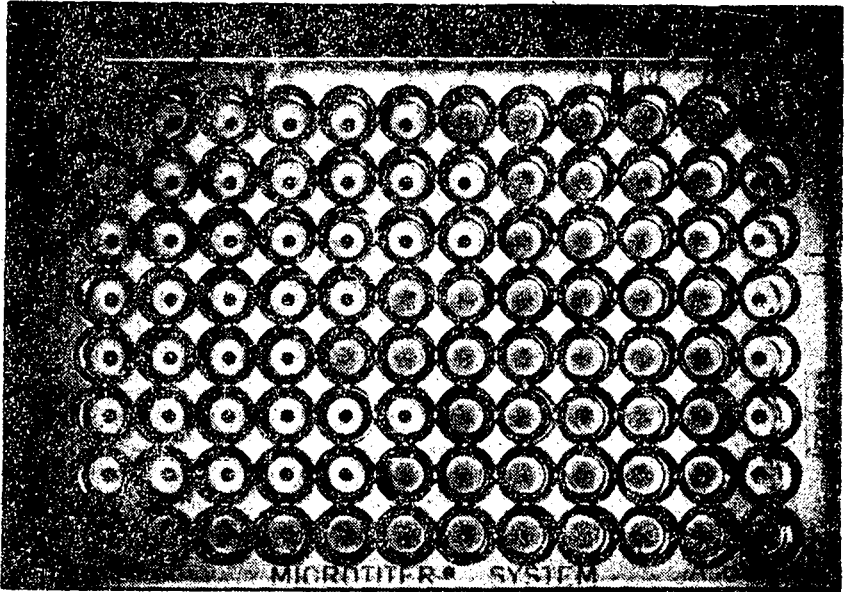
HI (serum sulandırması)	I					II							
	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.45	0.50			
1/1280													
1/640						4	2	2	2	1			
1/320						8	5	7	1				
1/160						12	9	6	11				
1/80			1			5	30	14	9				
1/40	III		1	5	11	11	24	28	27	11	5	3	2
1/20		3	1	5	5		36	21	11	27	10	5	
1/10		25	10	7	1		41	7	19	3	1	3	1
1/5		40	23	15	12	4	2		38	16	4	2	1

ELISA(00 490 nm)

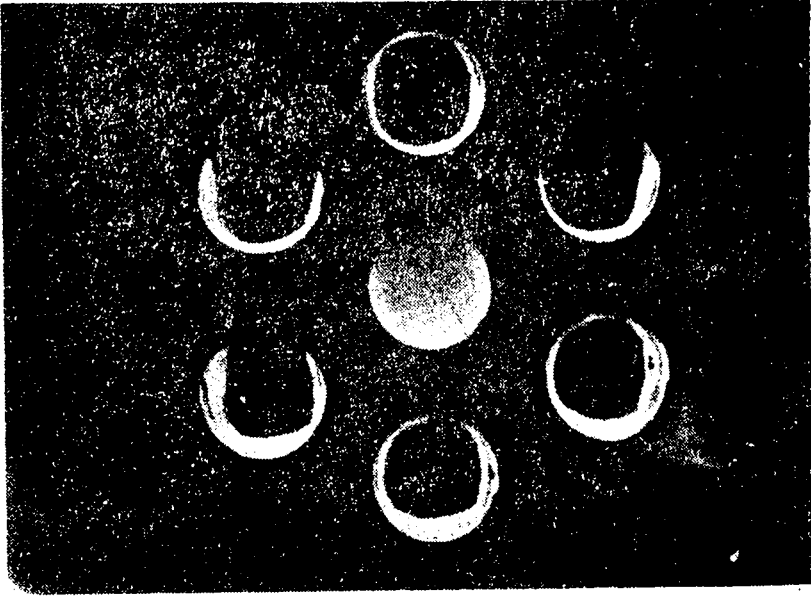
I : ELISA negatif HI pozitif } 1 serum (% 0.11)  
 II : ELISA pozitif HI pozitif } 126 serum (%14.00)  
 III : ELISA negatif HI negatif } 401 serum (%44.56)  
 IV : ELISA pozitif HI pozitif } 372 serum (%41.33)



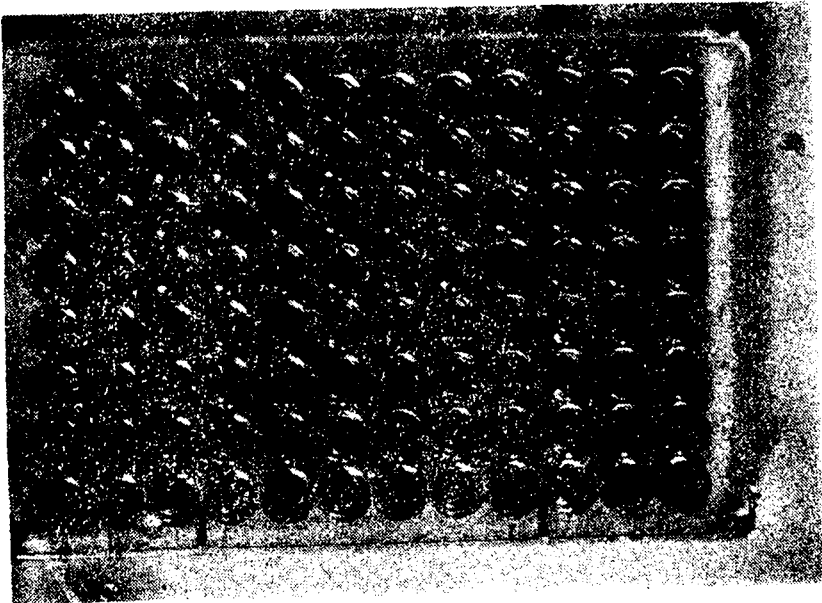
Resim 1: Hemaglutinasyon (HA)



Resim 2: Hemaglutinasyon-Inhibisyon (HI)



Resim 3: Agar-Jel Presipitasyon (AGP)



Resim 4: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Buna göre; sadece HI ile 1 (% 0.1) serum, sadece ELISA ile 372 (% 41.3) serum pozitif olarak belirlenmiştir. HI-ELISA ile 401 (% 44.6) serum negatif ve aynı testlerle 126 (% 14.0) serum pozitif olarak saptanmıştır.

### Tartışma ve Sonuç

Kanatlı hayvanlarda *M. gallisepticum* infeksiyonları, tavukların Kronik Solunum Sistemi Hastalığı (CRD) olarak bilinmektedir. Tavuklarda infeksiyon solunum sistemi bozuklukları yanında yemden yararlanmada, vücut ağırlığında ve yumurta veriminde azalma ile karakterizedir. Genç hayvanlarda, özellikle komplike olgularda ve stres koşulları altında ölümlere neden olan bu infeksiyon tüm dünyada yaygındır ve çok yönlü yetiştirilen (broyler, yumurtacı, damızlık) tavukları etkileyerek önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

İnfekte hayvanlardan etken izolasyon ve identifikasyonunun zaman alıcı ve zor oluşu, etken izolasyonunu engelleyen birçok faktörün bulunması, bir sürü içinde, özellikle, komplike olmamış CRD olgularında klinik semptomların fazla belirgin olmayışı, sürü içinde gizli portör hayvanları belirlemek ve ayrıca sürünün CRD durumunu ortaya koymak için SPA (33), HI (14, 25), AGP (6, 35) ve ELISA (4, 27) gibi serolojik yöntemlerin kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Hayvanların serumlarında oluşan spesifik antikorların belirlenmesinde çabukluk, kolaylık ve duyarlılık bakımlarından avantajlı olan SPA testi birçok araştırmacı tarafından doğal ve deneysel *M. gallisepticum* infeksiyonlarında aglutininlerin belirlenmesinde kullanılmıştır (12, 31, 33, 35, 41). Roberts (31), etçi piliçleri intranasal sinus yolu ile deneysel olarak infekte ettikten sonra hayvanların antikor yanıtlarını incelemiş, eprüvasyon suşuyla (S6 suşu) yaptığı SPA testinde 1. hafta sonunda hayvanların tümünün (% 100) pozitif reaksiyon verdiğini, heterolog suşlardan hazırladığı antijenlerle de % 8 (F antijeni) ve % 25 (WS7 antijeni) pozitif sonuç aldığını bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca, 3. haftada ise hayvanların tümünün her 3 antijenle de pozitif reaksiyon verdiğini açıklamıştır. Benzer bir çalışmada Timms ve Cullen (45), 3 grup Beyaz Leghorn piliçi *M. gallisepticum* S6, F ve WS7 suşlarıyla deneysel olarak infekte etmişler ve 28 hafta boyunca hayvanlarda oluşan serolojik yanıtı homolog ve heterolog antijenleri kullanarak SPA ve HI testleri ile incelemişler, yaptıkları SPA testin-

de aglutininlerin infeksiyondan sonraki 1. haftadan itibaren saptanabildiğini, antikorların heterolog antijenlerle de belirlenebildiğini ancak homolog antijenlerle daha yüksek titreler elde edildiğini, HI antikorlarının ise infeksiyondan ancak 2 hafta sonra belirlendiğini bildirmişlerdir. Sahu ve Olson (33), inceledikleri 43040 adet kan serumundan 53 (% 0.1) adedinin SPA testi ile pozitif bulunduğunu açıklamışlardır. Araştırmacılar, yaptıkları başka bir çalışmada ise (35), broyler, yumurtacı ve damızlık sürülere ait serumlardan % 1-100 pozitif reaksiyonlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Doğal ve deneysel infeksiyon sonunda 1 hafta içinde ortaya çıkan ve genellikle IgM karakterinde (31, 32) aglutininlerin saptanmasında oldukça duyarlı olan ve bu nedenle bir sürü tarama testi olarak kullanılan SPA testi bazı koşullar altında non-spesifik pozitif reaksiyonlar da vermektedir (7, 8, 42, 45, 50, 54). Bu non-spesifik reaksiyonların, serumun 1/5 sulandırılması veya HI ve AGP test sonuçları ile doğrulanabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından açıklanmıştır (7, 42, 45, 54). Bu çalışmada incelenen toplam 900 tavuk serumundan 182 (% 20.2) adedi SPA testi ile pozitif, 718 (% 79.8) adedi ise negatif bulunmuştur. Non-spesifik reaksiyonların elimine edilmesi için SPA testinde pozitif bulunan 182 serum örneğinin 1/5 sulandırılarak yeniden test edilmesi sonucunda ise 132 (% 72.5) serum örneği pozitif ve 50 (% 27.5) serum örneği de negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, araştırmacıların bulgularına paralellik göstermekte ve serumlar 1/5 sulandırıldığında pozitif serum sayısındaki azalmanın SPA testinin non-spesifik antikorlardan fazlasıyla etkilendiğini ve gerçek değerlerin belirlenmesinde mutlaka diğer serolojik testlerle konfirme edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

CRD kontrol programlarında SPA testinin yanısıra duyarlılığı daha az fakat spesifitesi oldukça fazla olan HI testi, bir doğrulama testi olarak kullanılmaktadır (10, 16, 21, 30, 33). İnfeksiyondan yaklaşık 14 gün sonra ortaya çıkan HI antikorlarının (10) saptanması amacıyla HI testi geliştirilmiş ve yapılan karşılaştırmalı denemeler sonucunda, infeksiyonun belirlenmesinde SPA testinden daha spesifik olduğu vurgulanmıştır (25, 26). Fahey ve Crawley (14), buyyonda 3 günlük bir inkubasyon sonunda HA aktivitesinin saptanabildiğini, 7-10. günlerde ise titrenin maksimum düzeye ulaştığını ve bu titrenin nadiren 1/16'yı geçtiğini bildirmişlerdir. Kuniyasu ve Ando (21), değişik antijen grupları arasında HA titreleri bakımından farklar bulunduğunu, antijenlerin 1/40 ile 1/320 arasında değişen HA titreleri gösterdiklerini bildirmişlerdir. Sahu ve Olson (33), inceledikleri broyler serumlarından 53 adet pozitif serumun 5 adedinin (% 9.4) HI pozitif titre ver-

diğini, öte yandan 1233 SPA negatif serum örneğinden 80 adedinin (% 6.5) HI testi ile pozitif olarak saptandığını, sonuçta ise, SPA negatif serum örneklerinin HI testi ile de incelenmelerinin yararlı olacağını vurgulamışlardır. Roberts ve Olesiuk (32), *M. gallisepticum* ile infekte hayvan serumlarının *M. synoviae* SPA antijeni ile non-spesifik reaksiyon oluşturmadığını ancak, *M. synoviae* ile infekte hayvan serumlarının *M. gallisepticum* SPA antijeni ile reaksiyon verdiklerini, fakat bu serumların HI testi ile negatif bulduklarını açıklamışlardır. Vardaman ve Yoder (49), hazırladıkları HI antijenleri ile *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* infeksiyonlarını başarı ile ayırd edebildiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, HA testi ile titresi 1/128 olarak saptanan antijen 4HA ünitesinde sulandırılmış ve % 1 yikanmış tavuk eritrositi ile birlikte HI testinde kullanılmıştır. İncelenen toplam 900 serumdaki 128 adedi (% 14.2) HI testinde pozitif, 772 adedi (% 85.8) ise negatif olarak değerlendirilmiştir. SPA pozitif 182 serum örneğinden 95 adedi (% 52.2) HI negatif bulunurken, SPA negatif 718 serum örneğinden 38 adedi (% 5.3) HI ile pozitif olarak saptanmıştır. Alınan bu sonuçlara göre HI testinin SPA testine göre sensitivitesi % 47.8, spesifitesi ise % 94.7 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular araştırmacıların sonuçları ile uyum sağlamakta, SPA testinde oluşan non-spesifik reaksiyonların HI testinde bir problem olmadığı gerçeğini bir kez daha vurgulamaktadır. Şüpheli serum örneklerinden SPA pozitif sonuç verenlerin tümünün, SPA negatif sonuç verenlerin ise rasgele seçilecek bir miktarının HI testi ile incelenmesinin yararlı olduğu kanısına varılmıştır.

*M. gallisepticum* infeksiyonlarında oluşan antikorların saptanması, izole edilen suşların identifikasyonu ve ayrıca değişik suşların serotiplendirilmesi için AGP testinin de kullanılabilmesi için çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (6, 20, 26, 34, 35). Aycardi ve ark. (6), katı karbondioksit ve etanolde 10 kez dondurup çözündürmek suretiyle hazırladıkları antijenleri farklı serotiplere ait *Mycoplasma* suşlarının serotiplendirilmesinde kullanmışlardır. Jordan ve Kulasegaram (20), AGP testinin duyarlılığının sınırlı olduğunu, tavuk serumlarındaki antikorların saptanmasında daha duyarlı serolojik testlerin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Nonomura ve Yoder (26), dondurup çözündürme, sonik vibrasyon veya sodyum dodesil sülfat (SDS) ile parçaladıkları antijenleri kullanarak AGP testi ile *Mycoplasma* izolatlarını identifiye etmeye çalışmışlar, doğal olarak infekte tavuk sürülerinden çok az hayvanın AGP ile reaksiyon verdiğini, yine de testin oldukça spesifik olduğunu açıklamışlardır. Sahu ve Olson (34), broy-

ler damızlık sürülere ait serumları incelerken SPA testinde görülen non-spesifik reaksiyonların negatif HI ve AGP test sonuçları ile doğrulanabileceğini bildirmişler ve aynı araştırmacılar yaptıkları başka bir çalışmada (35), broyler, yumurtacı ve damızlık sürülerinde etken izolasyonu yapılamadığı durumlarda, hayvanların kanlarında aglutininlerin, presipitinlerin ve HI antikorlarının varlığının gösterilmesinin önemini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada, toplam 900 serumdan 51 adedi (% 5.7) AGP ile pozitif, 849 adedi (% 94.3) ise negatif olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, şüpheli kan serumlarında *M. gallisepticum* antikorlarının saptanmasında AGP testi diğer testlere oranla oldukça yetersiz kalmıştır. Bu sonuç, kan örnekleri alındığında hayvanların kan serumlarında IgG antikorlarının yeterli düzeye ulaşmamış olmasına bağlı olabilir.

*M. gallisepticum* infeksiyonunun teşhisi amacıyla kullanılan ELISA, diğer tüm testlere oranla daha duyarlı ve spesifik bulunmuştur (4, 27, 28, 29, 38, 40). Testte antijen olarak sonikasyon (36, 49) ile veya SDS gibi deterjanlarla (4, 27) parçalanmış hücreler kullanılmaktadır. Konjugat olarak peroksidazla (4, 29) veya alkalin fosfatazla (27, 38) işaretlenmiş tavşan anti-tavuk IgG'leri ve substrat olarak da peroksidaz enzimi için ABTS, 5-aminosalisilik asit + hidrojen peroksit veya orto-fenilendiamin (4, 40), alkalin fosfataz enzimi için de paranitrofenilfosfat (27, 38) kullanılmaktadır. Ansari ve ark. (4), ELISA tekniğinin HI testinden daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Opitz ve ark. (27), *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* infeksiyonlarında oluşan antikorları ELISA, SPA ve HI ile inceleyerek *M. gallisepticum* F suşu ile infekte tavuklardan ELISA ile % 100, SPA ile % 98 ve HI ile de % 80 oranlarında pozitiflik belirleyerek antikorları saptamada ELISA tekniğinin SPA ve HI testlerinden daha duyarlı olduğunu ayrıca, ELISA ile SPA testine göre daha az non-spesifik reaksiyon oluştuğunu bildirmişlerdir. Patten ve ark. (28), ELISA tekniğinin SPA ve HI testlerine oranla daha duyarlı ve spesifik olduğunu açıklamışlar ve inceledikleri 99 serum örneğinden 74 adedini (% 74.6) ELISA ve SPA ile pozitif bulduklarını, infeksiyonun saptanmasında HI testinden daha kısa sürede ELISA ile antikorları belirleyebildiklerini ve ortalama ELISA titrelerini, ortalama HI titrelerine oranla 1-3 katı daha fazla bulduklarını açıklamışlardır. Talkington ve ark. (38) da, ELISA ve SPA ile infeksiyon sonrası 7. günden itibaren antikorların saptanabildiğini, HI testinde ise ancak 10. günden sonra antikorların diagnostik bir düzeye gelebileceklerini açıklamışlardır. Bu çalışmada, ELISA antijeni -20°C'de 10 defa dondurulup çözündürülerek ve ayrıca



sonike edilerek hazırlanmıştır. Konjugat olarak peroksidazla işaretli tavşan anti-tavuk IgG'leri ve substrat olarak da 5-aminosalisilik asit + hidrojen peroksit kullanılmıştır. Çalışmada, incelenen 900 serumdan 543 adedi (% 60.3) ELISA ile pozitif, 357 adedi (% 39.7) ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda ise ELISA tekniğinin SPA testine göre spesifitesi % 92.6, sensitivitesi % 31.1; HI testine göre spesifitesi % 99.8 ve sensitivitesi de % 25.3 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, araştırmacıların yaptıkları çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, broyler, yumurtacı ve damızlık işletmelere ait 900 serumun SPA, HI, AGP ve ELISA ile *M. gallisepticum* yönünden incelenmesinde en duyarlı yöntem ELISA bulunmuştur. Ancak, uygulanabilirliği ve ekonomik olması nedeniyle SPA testi tarama testlerinin vazgeçilmez bir yöntemi olmaktadır. Yine laboratuvarda uygulanması oldukça basit olan ve kısa sürede sonuç veren HI testinin bir tamamlayıcı test olarak kullanılmasında büyük yarar vardır. AGP testinin bir sürü tarama testinden ziyade CRD konusunda yapılacak deneysel araştırmalarda antikorların saptanmasında daha duyarlı olacağı düşüncesi hakim olmuştur. Çalışmada, her 3 testle ayrı ayrı karşılaştırılan ELISA, pahalı ve zaman alıcı olması gibi nedenlerle saha taramaları için her ne kadar uygun görünmüyorsa da, kullanılan spesifik IgG'ler nedeniyle *M. gallisepticum* antikorlarının saptanmasında oldukça spesifik bir test olduğu anlaşılmaktadır.

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

#### Kaynaklar

1. Adler, H.E. (1957). Proc. Am. Vet., Med. Assoc., pp. 346, 1954. In: Hofstad, M.S.: *A Serological Study of Infectious Sinusitis in Turkeys*. Avian Dis., 1:170-179.
2. Adler, H.E. (1958). *A PPLO Slide Agglutination Test for the Detection of Infectious Sinusitis of Turkeys*. Poult. Sci., 37:1116-1213.
3. Adler, H.E. and Yamamoto, R. (1956). *Preparation of a New Pleuropneumonia-Like Organism Antigen for the Diagnosis of Chronic*

*Respiratory Disease by the Agglutination Test.* Am. J. Vet. Res., 17: 290-293.

4. **Ansari, A.A., Taylor, R.F., and Chang, T.S.** (1983). *Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibody to Mycoplasma gallisepticum Infections in Poultry.* Avian Dis., 27:21-35.
5. **Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö. ve İzgür, M.** (1990). *Kanatlı Hayvan Hastalıkları.* Pfizer İlaçları A.Ş., Ortaköy-İstanbul.
6. **Aycardi, E.R., Anderson, D.P. and Hanson, R.P.** (1971). *Classification of Avian Mycoplasmas by Gel-Diffusion and Growth-Inhibition Tests.* Avian Dis., 15:134-147.
7. **Boyer, C.I., Fabricant, J. and Brown, J.A.** (1960). *Non specific Plate Agglutination Reactions with PPLO Antigen.* Avian Dis., 4:546-547.
8. **Bradbury, J.M. and Jordan, F.T.W.** (1973). *Non-Specific Agglutination of Mycoplasma gallisepticum.* Vet. Rec., 92:591-595.
9. **Chu, H.P.** (1958). *Differential Diagnosis and Control of Respiratory Diseases of Poultry.* Vet. Rec., 70:1064-1078.
10. **Crawley, J.F. and Fahey, J.E.** (1957). *The Use of the Hemagglutination-Inhibition Test for the Control of PPLO Infection in Poultry.* J. Am. Vet. Med. Assoc., 130:187-190.
11. **Cullen, G.A. and Anderton, M.F.** (1974). *Comparative Efficiency of Some Rapid Agglutination Antigens for Mycoplasma gallisepticum Infection.* Avian Pathol., 3:89-103.
12. **Gullen, G.A. and Timms, L.** (1972). *Diagnosis of Mycoplasma Infections in Poultry Previously Vaccinated with Killed Adjuvant Vaccines.* Bri. Vet. J., 128:94-100.
13. **Fabricant, C.G., Van Demark, P.J. and Fabricant, J.** (1962). *The Effect of Atmospheric Environment upon the Growth of Mycoplasma gallisepticum.* Avian Dis., 6:328-332.
14. **Fahey, J.E. and Crawley, J.F.** (1954). *Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. IV. A Hemagglutination-Inhibition Diagnostic Test.* Can. J. Comp. Med., 18:264-272.
15. **Frey, M.L., Hanson, R.P. and Anderson, D.P.** (1968). *A Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas.* Am. J. Vet. Res., 29:2163-2171.

16. Gianforte, E.M., Jungherr, E.L. and Jacobs, R.E. (1955). *A Serologic Analysis of Seven Strains of Pleuropneumonia-Like Organisms from Air Sac Infection in Poultry*. *Poult. Sci.*, 34:662-669.
17. Heitmann, V.J., Kirchoff, H., Weight, V., Lindena, J., Dubenkropp, H. und Schmidt, R. (1983). *Mycoplasma-bovis- Infektion in einem Rinderbestand. 3 Mitteilung: Serologische Untersuchung auf Antikörper gegen Mycoplasma bovis*. *Berl. Münch. Tierarztl. Wschr.*, 96: 43-48.
18. Jordan, F.T.W. (1984) *Avian Mycoplasmosis and Requirements for its Control and Eradication*. *Poultry Diseases in the Near East*. *Fac. Agr. Univ. Jordan, Amman, Food Agr. Org. U.N., Rome*.
19. Jordan, F.T.W. (1985). *Gordon Memorial Lecture: People, Poultry and Pathogenic Mycoplasmas*. *Bri. Poult. Sci.*, 26: 1-15.
20. Jordan, F.T.W. and Kulagesaram, P. (1968). *Non-Specific Antibodies in Chickens Inoculated Intratracheally with Mycoplasma gallisepticum*. *J. Comp. Path.*, 78:407-414.
21. Kuniyasu, C. and Ando, K. (1966). *Studies on the Hemagglutination-Inhibition Test for Mycoplasma gallisepticum Infection of Chickens*. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 6:136-143.
22. Matsuo, K., Kuniyasu, C., Yamada, S., Susumi, S. and Yamamoto, S. (1978). *Suppression of Immunoresponses to Hemophilus gallinarum with Nonviable Mycoplasma gallisepticum in Chickens*. *Avian Dis.*, 22:52-561.
23. Moulthrop, I.M. (1962) *A Report on Broilers from Parents Free of Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 6:161-164.
24. Moulton, J.E. and Adler, H.E. (1957). *Pathogenesis of Arthritis in Chicken Embryos Caused by a Pleuropneumonia-Like Organism*. *Am. J. Vet. Res.*, 18:731-734.
25. Newnham, A.G. (1964). *The Haemagglutination-Inhibition Test and a Study of its Use in Experimental Avian Respiratory Mycoplasmosis*. *Res. Vet. Sci.*, 5: 245-255.
26. Nonomura, I. and Yoder, H.W. Jr. (1977). *Identification of Avian Mycoplasma Isolates by the Agar-Gel Precipitin Test*. *Avian Dis.*, 21:370-381.
27. Opitz, H.M., Duplessis, J.B. and Cyr, M.J. (1983). *Indirect Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies to Mycoplasma synoviae and M. gallisepticum*. *Avian Dis.*, 27:773-786.

28. **Patten, B.E., Higgins, P.A. and Whithear, K.G.** (1984). *A Urease-ELISA for the Detection of Mycoplasma Infections in Poultry*. Aust. Vet. J., 61:151-155.
29. **Piela, T.H., Gulka, C.M., Yates, V.J. and Chang, P.W.** (1984). *Use of Egg Yolk in Serological Tests (ELISA and HI) to Detect Antibodies to Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis., 28:877-883.
30. **Roberts, D.H.** (1964). *Experimental Infection of Chickens with Mycoplasma gallisepticum and Subsequent Re-isolation of the Organism from the Body Tissues*. Vet. Rec., 76:798-801.
31. **Roberts, D.H.** (1969). *Serological Response Produced in Chickens by Three Strains of Mycoplasma gallisepticum*. J. Appl. Bact., 32:395-401.
32. **Roberts, D.H. and Olesiuk, D.M.** (1967). *Serological Studies with Mycoplasma synoviae*. Avian Dis., 11:104-109.
33. **Sahu, S.P. and Olson, N.O.** (1974). *Hemagglutination-Inhibition Versus Serum Plate Agglutination in Detecting Mycoplasma gallisepticum in Broiler Flocks*. Avian Dis., 19:370-374.
34. **Sahu, S.P. and Olson, N.O.** (1967). *Evaluation of Broiler Breeder Flocks for Non-specific Mycoplasma synoviae Reaction*. Avian Dis., 20:49-64.
35. **Sahu, S.P. and Olson, N.O.** (1967). *Use of the Agar-Gel Precipitin Test to Evaluate Broiler Breeder and Commercial Layer Flocks for Mycoplasma gallisepticum Infection*. Avian Dis., 20:563-573.
36. **Stipkovits, L.** (1979). *The Pathogenicity of Avian Mycoplasmas*. Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig. A, 245:171-183.
37. **Stipkovits, L.** (1990). *Limit Mycoplasma Infections with Good Hygiene*. Misset Int. Poult., 6:30-32.
38. **Talkington, F.D., Kleven, S.H. and Brown, J.** (1985). *An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies to Mycoplasma gallisepticum in Experimentally Infected Chickens*. Avian Dis., 29:53-70.
39. **Taylor, J. R.E., Fabricant, J. and Levine, P.P.** (1957). *A Comparison of Four in vitro Methods for the Isolation of the PPLOs of Chronic Respiratory Disease from Tracheal Exudate*. Avian Dis., 1:101-104.

40. **Thomas, C.B. and Sharp, P.** (1988). *Detection of Antigen Variations among Strains of Mycoplasma gallisepticum by Enzyme-Linked Immunosorbent Inhibition Assay (ELISIA) and Western Blot Analysis*. Avian Dis., 32:748-756.
41. **Thornton, G.A.** (1969). *Serum Treatment and Antigen Dose Effects on Agglutination and Haemagglutination-Inhibition by Mycoplasma gallisepticum Antibodies*. Bri. Vet. J., 125:195-201.
42. **Thornton, G.A.** (1973). *Non-Specific Agglutination of Mycoplasma gallisepticum by Rheumatoid Factor-Like Antiglobulin in Chickens Infected with Streptococcus faecalis or Staphylococcus aureus*. J. Comp. Pathol., 83:41-47.
43. **Thrusfield, M.** (1986). *Veterinary Epidemiology*. Butterworth and Co., Ltd., ISBN 0-408-10861-4, pp. 181-184.
44. **Timms, L.** (1967). *Isolation and Identification of Avian Mycoplasma*. J. Med. Lab. Tech., 24:79-89.
45. **Timms, L. and Cullen, G.A.** (1972). *Comparative Efficiency of Four Mycoplasma gallisepticum Strains as Antigens in Detecting Heterologous Infection*. Res. Vet. Sci., 13:523-528.
46. **Timms, L. and Cullen, G.A.** (1974). *Detection of Mycoplasma synoviae Infection in Chickens and its Differentiation from Mycoplasma gallisepticum Infection*. Bri. Vet. J., 130:75-84.
47. **Van Herick, W. and Eaton, M.C.** (1957). J. Bact., 50:47, 1945. In: Calnek, B.W. and Levine, P.P.: *Studies on Experimental Egg Transmission of Pleuropneumonia-Like Organisms in Chickens*. Avian Dis., 1:208-222.
48. **Van Roekel, H., Olesiuk, O.M. and Beninato, L.P.** (1958). *Symposium on Chronic Respiratory Diseases of Poultry. III. Epizootiology of Chronic Respiratory Diseases in Chickens*. Am. J. Vet. Res., 19: 453-463.
49. **Vardaman, T.H. and Yoder, H.W. Jr.** (1969). *Preparation of Mycoplasma synoviae Hemagglutinating Antigen and its use in the Hemagglutination-Inhibition Test*. Avian Dis., 13:654-661.
50. **Vardaman, T.H. and Yoder, H.W. Jr.** (1970). *Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum Infections: Differentiation by the Hemagglutination-Inhibition Test*. Poult. Sci., 49:157-161.

51. **Villegas, A.C., Kleven, S.H. and Anderson, D.P.** (1976). *Evaluation of Avian Mycoplasma Membranes as Antigens*. Avian Dis., 20:342-354.
52. **Windsor, G.D. Thompson, G.W. and Baker, N.W.** (1975). *Haemagglutination and Haemagglutination-Inhibition with Mycoplasma synoviae*. Res. Vet. Sci., 18:59-63.
53. **Wong, S.C. and James, C.G.** (1953). *The Susceptibility of the Agents of Chronic Respiratory Disease of Chickens and Infectious Sinusitis of Turkeys to Various Antibiotics* Poul. Sci., 32:589-592.
54. **Yoder, H.W. Jr.** (1984). *Avian Mycoplasmosis*. In: Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M. and Yoder, H.W. Jr.: *Diseases of Poultry*. 8th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, pp. 187-220.
55. **Zander, D.V.** (1961). *Origin of S6 Strain Mycoplasma*. Avian Dis., 5:154-156.