

PAPER DETAILS

TITLE: Polimeraz Zincir Reaksiyonu(Per) ve Bazi Tavuk Infeksiyonlarindaki Yeri

AUTHORS:

PAGES: 0-0

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/144617>

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr) ve Bazı Tavuk İnfeksiyonlarındaki Yeri

Vildan CANER* K. Tayfun ÇARLI**

Geliş Tarihi: 17.07.2000

Özet: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); günümüzde önemli bakteriyel, viral ve mikotik infeksiyonların tanısında, etkenlerin karakterizasyonunda, hastalıkların patogenezinin belirlenmesinde ve aşı hazırlanmasında büyük uygulama alanı bulan bir nükleik asit teknolojisi yöntemidir. PCR ile infeksiyöz etkenlere ait bazı spesifik gen segmentlerinin *in vitro* amplifikasyonu yapılmaktadır. Bu derlemede, PCR'ın bazı kanatlı infeksiyonlarının tanısındaki yeri tartışılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, tavuk infeksiyonları

Polymerase Chain Reaction (PCR) and its Applications to Some Avian Infectious Diseases

Summary: Polymerase chain reaction (PCR) is one of the nucleic acid technology methods, which is widely used for diagnosis of bacterial, viral and mycotic infections, characterization of the agents, elucidating the pathogenesis of the diseases, and predicting the vaccine strains of some special organisms. *In vitro* amplifications of some specific gene segments belonging to infectious agents were performed by PCR. In this review, some important implementations of PCR into diagnosis of avian infections are discussed.

Key Words: Polymerase Chain Reaction, avian infectious diseases

Giriş

Deoksiribonükleik asit (DNA), baz çiftleri ve şeker-fosfat omurgası olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. DNA molekülünde yer alan bazlar pirimidin (Sitozin ve Timin) ve pürin (Adenin ve Guanin) bazlarıdır. Normal DNA yapısında Guanin (G) - Sitozin (C) çifti Adenin (A) - Timin (T) çifti ile yaklaşık aynı büyüklükte olmasının yanı sıra, G her zaman C ile A de T ile eşleşir. Pirimidin veya pürin bazlarından biri ile pentoz şekerinin birleştiği yapı “nükleosid” olarak adlandırılır. Nükleosidlerin fosfat molekülü ile birleşerek oluşturduğu birleşige de “nükleotid” adı verilmektedir. Yan yana bulunan nükleotidler, bir nükleotidin 5'karbon ucundan diğer nükleotidin 3'karbon ucuna kadar devam

eden kovalent fosfodiester bağları ile birleşerek polinükleotid zincirleri meydana getirir. Bir DNA molekülü, birbirine sarmal şekilde bağlanan ve birbirinin tamamlayıcısı olan antiparalel iki polinükleotid zincirden oluşur. Tipik bir hayvan hücresi yaklaşık 3×10^9 nükleotidden meydana gelen bir DNA'ya sahiptir. DNA molekülünün her bir helikal dönüşünde yaklaşık 10 nükleotid bazı vardır ve 3.4 mm uzunluğundadır^{1,2}.

DNA molekülünde spiral şeklindeki bir iplikçik, karşılıklı bazlar arasında non-kovalent hidrojen bağları (A ve T iki hidrojen bağı ile, G ve C üç hidrojen bağı ile birbirlerine bağlanır) ile diğer iplikçiğe bağlanır. Hidrojenin oksijen ve nitrojen gibi elektro-negatif atomlara bağlandığı zaman pozitif akıma doğru yönelmesi sonucu oluşan hidrojen bağları, şeker fosfat omurgasının

* Araş. Gör.; U.Ü. Vet. Fak., Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE

** Prof. Dr.; U.Ü., Vet. Fak., Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE

kovalent fosfodiester bağlarının yaklaşık 1/10 gücüne sahiptir. Bu özellik, DNA'nın double helix yapısında tek bir iplikçiğe zarar vermeksizin iplikçiklerin birbirinden ayrılmasını sağlar².

DNA'nın temel fiziko-kimyasal davranışlarından yararlanılarak geliştirilen DNA-tabanlı testlerden biri olan PCR, ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından uygulandığı bildirilmektedir. PCR, bilinen iki DNA dizisi arasındaki gen segmentlerini amplifiye etmek için kullanılan bir nükleik asit teknolojisi yöntemidir. Mikrobiyoloji alanında, PCR ile klinik materyallerde bulunan veya izole edilen etkenlere ait DNA'ların veya bazı spesifik gen segmentlerinin in vitro enzi-matik amplifikasyonu yapılmaktadır. Bu teknik, total genomik DNA içinde yer alan nanogram düzeyindeki template DNA'nın miktarını 10^5 - 10^6 kat arttırabilir. Teknikte bilinmesi gereken ilk bilgi, hedef DNA dizisinin ne olduğudur. Böylelikle, DNA sentezleyici kullanılarak reaksiyon için gerekli primerler (öncü DNA molekülleri) sentezlenir¹⁻³.

PCR yönteminde kullanılan reagentler aşağıdaki gibidir:

1. Template: Amplifiye edilecek DNA bölgesi veya bu bölgeyi içeren hedef DNA'yı ifade eder. Bu bakteri, virus veya başka bir hücrenin genomik DNA'sının bir bölümü olabilir.
2. Primerler: DNA öncüleri veya oligonükleotidler olarak da adlandırılmaktadır. Hedef DNA'dan yeni DNA sentezini başlatan ufak DNA parçacıklarıdır. En az 16, ortalama 20-24 baz uzunluğunda olmalıdır. Bazı özel şartlarda daha kısa veya daha uzun olabilir. Genellikle, ortalama 30 siklusk PCR için 1 μ M konsantrasyon yeterlidir. Primerlerde polibaz (örn. poly dG) veya tekrarlayan dizilerin uzun olmamasına dikkat edilmelidir. Çünkü bu tür diziler, template üzerinde ilgisiz bölümlerle bağlanabilmektedir. Primerlerin birbirinden uzaklıkları ve kullanılacak primerlerin konsantrasyonu, testin başarılı olmasında önemli diğer faktörlerdir. Bir primerin molar konsantrasyonu 260 nm (A260)'de absorbanlığı temel alınarak hesaplanabilir.
3. Deoksiribonükleosid trifosfatlar (dNTP'ler): Bunlar dATP, dTTP, dCTP ve dGTP'dir. Primerler ve dNTP'ler, hedef DNA'nın amplifikasyonu için gerekli olan hammaddeyi sağlarlar.

4. Taq polimeraz: Doğal olarak Thermus aquaticus bakterisinin polimeraz enzimidir. Yapay olarak rekombinant yapıda olanları da vardır. Molekül ağırlığı 94 kDa'dur. Sıcaklığa dayanıklıdır ve 95°C'de yarılanma ömrü 40 dakikadır. Bu nedenle DNA denaturasyonunda yıkılmaz. Her PCR için genellikle 2 ünite yeterlidir.

5. Buffer: Polimeraz aktivitesi için ortam pH'sı ve bivalent katyon (magnesium) varlığı çok önemlidir. $MgCl_2$ konsantrasyonu genellikle 0.5-5.0 mM arasındadır, ve optimum konsantrasyon deneysel olarak belirlenmektedir. Mg^{+2} iyonlarının dNTP'ler ile eriyebilir bir kompleks oluşturmak, polimeraz aktivitesini uyarmak ve primer/template etkileşiminin erime ısını arttırmak gibi önemli görevleri vardır. Teorik olarak nükleotidler 1:1 oranında mag-nesiuma bağlandığından, testte total nükleotid konsantrasyonunun 2 katı magnesium konsantrasyonu kullanılması önerilir. Genellikle, düşük Mg^{+2} konsantrasyonu düşük ürünlere (ya da ürün oluşmama) ve yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu da nonspesifik ürünlerin (değerlendirilemeyen) toplanmasına neden olur¹.

PCR reaksiyonu nükleotidler (dNTP'ler), primerler, template DNA ve polimeraz enzimi içeren ince duvarlı eppendorf veya kapillar tüplerde yapılır. PCR'unun her bir siklusunda yer alan önemli basamaklar template denatürasyonu, primerlerin birleşmesi ve primerlerin uzamasıdır.

Template Denatürasyonu: PCR'unun ilk basamağı, DNA iplikçiklerini ayırmak yani denatüre etmektir. Bu işlem, ortalama 94-95 °C'de PCR karışımındaki template iplikçiklerin birbirinden tamamen ayrılması sağlanana kadar, kısa bir süre devam ettirilir. Böylece primerler'in bağlanması için komplementer alanların açılması sağlanır. Denatürasyon süresinin uzun olması, Taq polimeraz enziminin aktivitesindeki kaybı hızlandırmaktadır¹.

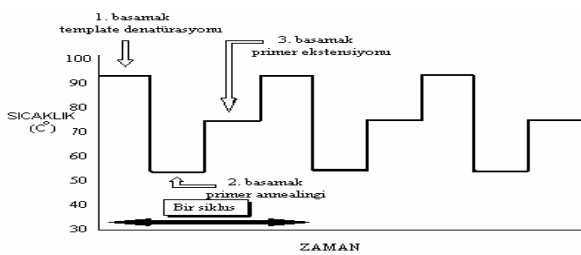
Primerlerin Birleşmesi (Annealing): Reaksiyonun ikinci basamağı primerlerin bağlanmasıdır. Primer annealing sıcaklığı, PCR'unun başarısında önemli bir parametredir. Her bir oligonükleotid için karakteristik olan annealing sıcaklığının belirlenmesinde, oligonükleotidin uzunluğu ve reaksiyon buffer'ının iyonik gücü kadar primerin baz kompozisyonu da önemlidir. PCR karışımında

bulunan 5'→3' ve 3'→5' yönündeki iki primer, denatürasyon sonrası birbirinden ayrılan iplikçiklerdeki kendi komplement-er alanlarına spesifik olarak bağlanır. Bu işlem 50-65°C'de gerçekleştirilir. Annealing sıcaklığının çok yüksek olduğu durumlarda primer bağlanması şekillenmezken, sıcaklığın çok düşük olduğu durumlarda da primerler yanlış yerlere bağlanabilir veya primer dimerleri oluşabilir^{1,2}. Bunun için optimal "annealing" sıcaklığının belirlenmesi gereklidir.

Primerlerin Uzaması (Ekstensiyon):

Primer ekstensiyonu, genellikle 72°C'de veya DNA polimerazın optimum sıcaklığında gerçekleştirilir. PCR'unda genellikle 2 dakikalık bir ekstensiyon süresi tam ekstensiyona ulaşmak için yeterli bir süre olmakla birlikte, bu süre amplifiye olacak DNA bölgesinin uzun olması halinde arttırılabilir. Bu basamakta Taq polimeraz enzimi 5'→3' yönünde aktivite göstererek, primerlerin 3' uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri de kullanarak hedef DNA diziliminin kopyasını yapar. Reaksiyon ısısı tekrar yükseltilerek final ekstensiyon sıcaklığı 94°C'ye çıkarılır. Böylece 1 siklus tamamlanmış olur ve her siklusta DNA miktarı bir kat artar^{1,2}.

Siklus Sayısı: Etkin bir DNA amplifikasyonu için gerekli olan siklus sayısı genellikle 25-40 arasındadır. Ancak, siklus sayısındaki artışla birlikte daha fazla sayıda farklı yapıların (örneğin değerlendirilemeyen ürünler gibi) meydana gelme olasılığı artar².



Grafik 1:
PCR basamakları (PCR steps)

PCR ürünü DNA'ları görüntülemek için jel elektroforezisi (Ultraviole altında DNA bantlarının gözlenmesi), kolorimetrik yöntemler (ELISA ve reverse-dot blot gibi) ve fluorometrik (Light Cycler sistemleri) yöntemlerden yararlanılmaktadır.

Nükleik asit teknolojisinde, PCR'dan faydalanılarak bazı tavuk infeksiyonlarında yapılabilecek önemli işlemler:

1. Campylobacter infeksiyonlarının teşhisi⁴⁻⁶,
2. Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV)'unun saptanması ve miktar tayini⁷,
3. Haemophilus gallinarum'un tanısı^{8,9},
4. Infectious Bronchitis Virus (IBV)'unun tanısı ve genotipinin belirlenmesi¹⁰⁻¹³,
5. Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)'unu tanımlamak ve virusun serotiplerinin belirlenmesi¹⁴⁻¹⁶,
6. Infectious Laryngotracheitis Virus'u'nun saptanması¹⁷,
7. Marek Hastalığı ve Reticuloendotheliasis hastalığının tanılarını koymak ve Marek Hastalığı Virus (MDV)'nun patojenik olup olmadığının belirlenmesi¹⁸⁻²¹,
8. Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae ve M. iowae infeksiyonlarının tanısı²²⁻²⁵,
9. Newcastle Disease Virus (NDV)'nun tanısı ve patotipinin belirlenmesi²⁶⁻²⁸,
10. Ornithobacter rhinotracheale infeksiyonunun tanısı²⁹,
11. Reovirus identifikasyonu³⁰,
12. Salmonella infeksiyonlarının belirlenmesi³¹⁻³⁴,
13. Tavuk Çiçeği (Fowl Pox) Virus'u'nun tanısı³⁵,
14. Turkey Rhinotracheitis Virus (TRTV)'unun identifikasyonu³⁶⁻³⁸, olarak sıralanabilir.

Yukarıda verilen örneklerle ilgili bazı detaylar şu şekilde açıklanabilir:

PCR ve İnfeksiyöz Bronşitis: IBV'ünü tanımlamak ve gruplandırmak (serotiplendirmek) amacı ile genellikle virus nötralizasyon testleri yapılmaktadır. IBV'u çok geniş antijenik varyasyon göstermektedir. Virus nötralizasyon testleri ile yapılan IBV'unun gruplandırılması ve daha sonra bu grupe göre yapılan aşılama programlarından elde edilen başarısızlıklar, farklı yöntemlerle yapılacak IBV'unun gruplandırılmasının daha anlamlı olacağını düşündürmüştür^{12,39,40}. Bununla birlikte laboratuvarlarda yapılan serolojik test sonuçlarından elde edilen titrelerin aşı suşuna mı, patojenik suşa mı ait olduğu belirlenmelidir. PCR, IBV'unun genotipini belirler ve bu nedenle korunmada en güvenilir suş belirleme yöntemidir^{11,12,41-43}. Aşılama amacıyla IBV'unun

gruplarını oluşturmada krosimmuni-zasyon testleri ile elde edilen koruyucu tiplerin ve son zamanlarda nükleik asit teknikleriyle anti-jenik varyasyonların incelenmesiyle ortaya çıkan genotiplerin daha anlamlı olduğu görülmüştür. Ancak genotiplendirmenin de her zaman protektif anlamda antijenik varyantları belirlemediği rapor edilmektedir^{10,13,44}.

PCR ve Gumboro: IBDV infeksiyonu, yemden yararlanımın azalmasından immuno-supresif etkiye kadar çok değişik klinik tablo ile seyreden olgulara neden olur. Serotip1 tavuklar için patojendir ve Türkiye’de virulent IBDV varlığı bildirilmiştir. IBDV infeksiyonunun tanısı virus nötralizasyon, virusun IF, ELISA, VN ve AGP ile gösterimiyle ve oluşan spesifik antikorların tespiti ile yapılmaktadır. Ayrıca IBDV, IF ve IP testleri ile doku kesitlerinde direkt olarak da belirlenebilmektedir^{3,45}. Subklinik infeksiyon-larda, virusun doku ve organlarda sayıca az miktarda bulunması virusun izolasyonunu ve virusun direkt olarak gösterilmesini olumsuz yönde etkilemektedir^{16,46,47}. Antikor varlığını gösteren testlerle IBDV infeksiyonu tanısının koyulması, aşılama sonu oluşan antikorların varlığı nedeni ile önemini kaybetmiştir^{15,48,49}. Bu testler ancak aşılama sonrası tavukların immun durumlarının belirlenmesinde yararlı olabilir. 1989-1992 yıllarında IBDV-RNA’sının aranması için dot-blot hibridizasyon tekniklerinde işaretli cDNA prob-ları kullanılmıştır. Son yıllarda bu tekniğin yerini, çok daha duyarlı ve spesifik olan RT-PCR tekniği almıştır^{14,16,46,50}, ve aynı zamanda PCR ile suşların tiplendirilmesi de yapılabilmektedir⁵¹⁻⁵³.

PCR ve Marek Hastalığı, Retiküloendoteliosis Virus İnfeksiyonu: Marek hastalığının etkeni avian alfa herpesvirustur ve T lenfositleri infekte eder. Retiküloendoteliosis virusu, pre T ve pre B lenfositlerin genomuna integre olan bir retrovirustur. Marek hastalığında ve Retiküloendoteliosis Virus infeksiyonunda tümör görünümleri ve yerleşimleri birbirine benzerlik göstermektedir. Bu infeksiyonların tanısı, virus izolasyonu ve spesifik antikorların gösterimi ile yapılmaktadır. Ancak, bu işlemler uzun zaman alır ve zordur. Aynı zamanda bir klinik olguda iki etken (MDV ve REV) bir arada bulunabilmektedir¹⁹.

REV infeksiyonunda, virusun izolasyonu her zaman yapılamamakla birlikte, oluşan antikorların da, kanda kalış süreleri tavuk

ırklarına göre farklılıklar göstermesi nedeni ile her zaman belirlenemeyebilir. Bununla birlikte anti-REV antikorları izolasyonu zorlaştırabilmektedir^{19,54}.

Marek hastalığında antikorlarının bulunuşunun anlamı klinik açıdan sınırlıdır. Onkojenik MDV’ları (serotip1) ve aşı virus suşlarının glikoproteinleri arasında ortak antijenik determinantların varlığı nedeni ile konvensiyonel serolojik metodlar uygulanarak belirlenen antikorların gösterimiyle aşı-saha tip virus infeksi-yonunun ayırımı yapılamaz. Söz konusu infeksiyonda in situ hibridizasyon, restriksiyon endonükleaz analizleri ve serolojik analizler serotip ayırımını olanaklı hale getirirler bile patojenik ve attenüe serotip 1’in ayırımını yapamamaktadır^{18,20,21}. Konvensiyonel metodlardaki bu aksaklıklar, REV provirusunun ve MDV’unun direkt olarak DNA’sının amplifiye edilerek PCR’la ortaya koyulması ile giderilmiştir⁵⁵⁻⁵⁷.

PCR ve Mycoplasma İnfeksiyonları: Mycoplasma taramasında kullanılan testler serum pleyt aglutinasyon testi (SPA), serum pleyt dilusyon aglutinasyon testi (SPDA), hemaglutinasyon inhibisyon testi (HI), kültür-etken izolasyonu ve identifikasyonu, ELISA, DNA-Prob testleri ve PCR-Tabanlı testlerdir^{3,58}. SPA ve SPDA’da Mycoplasma gallisepticum (MG), M. synoviae (MS) ve diğer mycoplasmalar arasındaki ortak antijenite, ve HI testinde test antijeni olarak kullanılan MG ile infeksiyonu oluşturan MG arasındaki antijenik varyasyonlar gibi birçok nedenle serolojik test sonuçları tam tanı sağlamayabilir. Bu gibi durumlarda testin yenilenmesi yerine mycoplasmaların izolasyonu ve identifikasyonu, daha hızlı ve tanı için daha kesin sonuç vermektedir. MG, izolasyonu en zor kanatlı mikroorganizması ve hatta mycoplasmalarından biridir. Bununla birlikte MG’un identifikasyonu zaman alıcıdır ve nonpatojenik mycoplasmalar patojenik mycoplasmaların izolasyonunu zorlaştırmaktadır. DNA prob testleri, etkenin sayıca fazla olduğu klinik semptom gösteren hayvanlarda teşhis amacı ile kullanılmaktadır. Ancak, klinik örnekte az sayıda MG ve MS mikroorganizmasının var olduğu subklinik infekte veya portör hayvanları belirleyememektedir^{24,58-60}.

PCR-tabanlı moleküler biyoteknolojik yöntemlerle mycoplasmaların DNA’ları spesifik olarak saptanabilmekte ve başka bir teyit testine

gerek olmaksızın teşhis yapılma imkanı sağlamaktadır. Son yıllarda kullanıma giren inaktif ve canlı MG aşıları, sahada infekte hayvanların serolojik testlerle teşhisini güçleştirmiştir. PCR tekniği ile bu problemin üstesinden gelinmektedir. PCR, MG suşlarının canlı aşı suşu mu veya infeksiyonu oluşturan patojenik suş mu olduğunu rahatlıkla ortaya çıkarabilmektedir^{22,61-63}.

PCR ve Newcastle Hastalığı: NDV serotipleri epidemiyolojik açıdan önemlidir ve monoklonal antikorlarla belirlenirler. Bununla birlikte NDV'unun patotiplendirmesi hastalığın tanısı açısından şarttır. NDV izolatları, tavuklarda oluşturdukları hastalığın şiddetine göre 3 ana patotip altında değerlendirilmektedir. Konvansiyonel olarak patotiplendirme, embriyoları ortalama öldürme zamanı (EMDT) ve intraserebral patojenisite indeksi (ICPI) ile belirlenebilmektedir. Bu işlemler zahmetlidir ve uzun zaman alır^{3,28}.

NDV'unun patojenitesinin moleküler temeli füzyon (F) proteininin parçalanma alanındaki amino asit dizisi ile ilgilidir. F proteinini kodlayan genlerin belirlenmesini hedef alan nükleik asit metotları, düşük (lentojenik) ve yüksek (mezojenik ve velojenik) patojenisiteye sahip NDV suşlarının ayırımını yapabilmektedir^{26,28,64-66}. Bu metotlar NDV hastalığı gibi çabuk yayılan bir infeksiyonun hızlı tanısı açısından konvansiyonel olarak uygulanan ICPI testleri gibi testlerden hızlı olmaları özel ünite-malzeme ve özel deney hayvanı gerektirmedikleri için önemli görülmektedir. Günümüzde nükleik asit metodolojisi uygulanarak (RT-PCR) virusun patotiplendirmesi 24 saatte yapılabilmektedir^{27,67,68}.

PCR ve Salmonella İnfeksiyonları: Kanatlılarda Salmonella infeksiyonlarının teşhisi serolojik testler ve kültür-etken identifikasyonu ile yapılmaktadır. Salmonella serovarlarının kültürü ve identifikasyonu için yapılan standart laboratuvar işlemleri 4-8 gün almaktadır. Aynı zamanda taşıyıcı hayvanlarda ve bazı durumlarda (klinik örnekte Salmonella'yı inhibe eden mikroorganizmaların varlığı, antibiyotik kullanımı gibi) klinik örneklerde etken sayıca az bulunduğundan Salmonella izolasyonu yapılamamaktadır. Her iki nedenle çok daha hızlı ve duyarlı bir yöntem gereksinim duyulmuş, ve bu amaçla daha seçici kültür metodları, DNA hibridasyon testleri ve immunglobulinlerin

kullanıldığı birçok test geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemlerin duyarlılıkları ve özgünlükleri ile ilgili problemler rutin kullanımlarını güçleştirmektedir^{3,69}.

PCR ile klinik ve çevreye ait örneklerde var olan Salmonella'yı belirleyebilecek hedef DNA segmentlerinin oldukça yüksek bir duyarlılıkta ve spesifiktikte amplifikasyonu yapılabilmektedir^{33,34,70,71}.

PCR ve Turkey Rhinotracheitis: Serum nötralizasyon testleri TRTV'nun tüm izolatlarının aynı serotipe ait olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan TRTV'nun subtiplerinin (A ve B) olduğu, etkenin G proteinini kodlayan genlerin analizleriyle gösterilmiştir^{72,73}. Bu bilgiler en azından sahada, o bölgede kullanılacak aşı suşunun belirlenmesine ışık tutacaktır. Aynı klinik semptomlara yol açabilen IBV, NDV ve TRTV'nun patojenik tiplerinin aynı klinik tablo içinde bulunup bulunmadığı da belirlenmelidir^{36-38,74}.

Sonuç

Rutin konvansiyonel tanı prosedürlerine moleküler biyolojik yöntemlerin eklenmesiyle ve bazen birlikte kullanımlarıyla, kanatlılarda hastalıklarla ilgili koruma ve kontrol yöntemlerinin daha etkin ve yararlı bir biçimde uygulanabileceği açıktır. Moleküler biyolojik yöntemlerden biri olan PCR, tavuk hastalıkları alanında bazen yalnız, bazen de var olan yöntemlerle birlikte kullanıldığında tanı, profilaksi ve patogenezis ile ilgili bilgilerin doğru bir biçimde tanımlanmasına oldukça önemli bir biçimde yardım etmektedir.

Kaynaklar

1. ABBAS, F., ANDREASSEN, J.R., JACKWOOD, M.W.: Development of a polymerase chain reaction and a radioactive DNA probe for infectious laryngotracheitis virus. Avian Dis., 40: 56-62, (1996).
2. ADZAH, A., SHAW, K., BRITTON, P., CAVANAGH, D.: Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. Avian Pathol., 25: 817-836, (1996).
3. AKIN, A., WU, C.C., LIN, T.L.: Amplification and cloning of infectious bursal disease virus genomic RNA segments by long and accurate PCR. J. Virol. Methods, 82 (1): 55-61, (1999).

4. ALI, A., REYNOLDS, D.L.: A reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of avian pneumovirus. *Avian Dis.*, 43(3): 600-603, (1999).
5. AMONSIN, A., WELLEHAN, F.J.X., LI, L.L., VAN DAMME, P., LINDEMAN, C., EDMAN, M., ROBINSON, R.A., KAPUR, V.: Molecular epidemiology of Ornithobacterium rhinotracheale. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2894-2898, (1997).
6. BALLAGI-PORDANY, A., WEHMANN, E., HERCZEG, J., BELAK, S., LOMNICZI, B.: Identification and grouping of Newcastle disease virus by restriction site analysis of a region from the F gene. *Arch. Virol.*, 141(2): 243-261, (1996).
7. BAYON-AUBOYER, M.H., JESTIN, V., TOQUIN, D., CHERBONNEL, M., ETERRADOSSI, N.: Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch. Virol.*, 144 (6): 1091-1109, (1999).
8. BECKER, Y., ASHER, Y., TABOR, E., DAVIDSON, I., MALKINSON, M., WEISMAN, Y.: Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *J. Virol. Methods*, 40 (3): 307-322, (1992).
9. CAO, Y.C., YEUNG, W.S., LAW, M., BI, Y.Z., LEUNG, F.C., LIM, B.L.: Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis.*, 42 (2): 340-351, (1998).
10. CAVANAGH, D., MAWDITT, K., SHAW, K., BRITTON, P., NAYLOR, C.: Towards the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. *Acta Vet. Hung.*, 45 (3): 281-298, (1997).
11. CHEN, X., MIFLIN, J.K., ZANG, P., BLACKALL, P.J.: Development and application of DNA probes and PCR tests for Haemophilus paragallinarum. *Avian Dis.*, 40: 398-407, (1996).
12. COHEN, N.D., WALLIS, D.E., NEIBERGS, H.L., HARGIS, B.M.: Detection of Salmonella enteritidis in equine feces using the polymerase chain reaction and genus-specific oligonucleotide primers. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7 (2): 219-222, (1995).
13. ÇÖVEN, F., ÇARLI, K.T.: Türkiye'de broyler ve yumurtacı tavuklardan Infectious Bursal Disease Virüsü'nün izolasyonu ve identifikasyonu. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 28 (2): 141-152, (1997).
14. DANI, M.A., DURIGON, E.L., ARNS, C.W.: Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. *J. Virol. Methods*, 79 (2): 237-241, (1999).
15. DAVIDSON, I., BOROVSRAYA, A., PERL, S., MALKINSON, M.: Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.*, 24: 69-94, (1995).
16. DE LEEUW, O., PEETERS, B.: Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.*, 80 (Pt 1): 131-136, (1999).
17. ENDOH, D., KON, Y., HAYASHI, M., MORIMURA, T., CHO, K.O., IWASAKI, T., SATO, F.: Detection of transcripts of Marek's disease virus serotype 1 iCP4 homologue (MDV1 ICP4) by in situ hybridization. *J. Vet. Med. Sci.*, 58 (10): 969-975, (1996).
18. FADLY, A.M., WITTER, R.L., SMITH, E.J., SILVA, R.F., REED, W.M., HOERR, F.J., PUTNAM, M.R.: An outbreak of lymphomas in commercial broiler breeder chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.*, 25: 35-47, (1996).
19. FALCONE, E., D'AMORE, E., DI TRANI, L., SILI, A., TOLLIS, M.: Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 64 (2): 125-130, (1997).
20. FAN, H.H., KLEVEN, S.H., JACKWOOD, M.W.: Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of Mycoplasma gallisepticum. *Avian Dis.*, 39 (4): 729-735, (1995).
21. GARCIA, M., JACKWOOD, M.W., HEAD, M., LEVISOHN, S., KLEVEN, S.H.: Use of species-specific oligonucleotide probes to detect Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, and M. iowae PCR amplification products. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8 (1): 56-63, (1996).
22. GOODING, C.M., CHOUDARY, P.V.: Comparison of different primers for rapid detection of Salmonella using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, 13 (5): 341-347, (1999).
23. HARMON, K.M., RANSOM, G.M., WESLEY, I.V.: Differentiation of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, 11(3): 195-200, (1997).
24. HUW LEE, L., HWA LEE, K.: Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J. Virol. Methods*, 63(1-2): 113-119, (1997).

25. INNIS, M.A., GELFAND, D.H.: Optimization of PCRs. In: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Ed. by Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. Academic Press, California, 3-12, (1990).
26. JACKWOOD, D.J., JACKWOOD, R.J.: Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. *Avian Dis.*, 38 (3): 531-537, (1994).
27. JACKWOOD, D.J., JACKWOOD, R.J.: Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis.*, 41 (1): 97-104, (1997).
28. JACKWOOD, D.J., NIELSEN, C.K.: Detection of infectious bursal disease viruses in commercially reared chickens using the reverse transcriptase / polymerase chain reaction-restriction endonuclease assay. *Avian Dis.*, 41 (1): 137-143, (1997).
29. JACKWOOD, M.W., YOUSEF, N.M.H., HILT, D.A.: Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, 41: 105-110, (1997).
30. JIA, W., KARACA, K., PARRISH, C.R., NAQI, S.A.: A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch. Virol.*, 140(2): 259-271, (1995).
31. JUHASZ, K., EASTON, A.J.: Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.*, 75 (11): 2873-2880, (1994).
32. KANT, A., KOCH, G., VAN ROOZELAAR, D.J., BALK, F., TER HUMRNE, A.: Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, 26: 837-849, (1997).
33. KATARIA, R.S., TIWARI, A.K., BANDYOPADHYAY, S.K., KATARIA, J.M., BUTCHAIHA, G.: Detection of infectious bursal disease virus of poultry in clinical samples by RT-PCR. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45 (2): 315-322, (1998).
34. KEELER, C.L. JR., REED, K.L., NIX, W.A., GELB, J.JR.: Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.*, 42 (2): 275-284, (1998).
35. KEMPF, I., GESBERT, F., GUITTET, M., BENNEJEAN, G.: Mycoplasma gallisepticum infection in drug-treated chickens: comparison of diagnosis methods including polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed [B]*, 41 (9): 597-602, (1994).
36. KEMPF, I.: DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Acta Vet. Hung.*, 45 (3): 373-386, (1997).
37. KING, D.J., SEAL, B.S.: Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus (NDV) field isolates with comparisons to reference NDV strains. *Avian Dis.*, 42(3): 507-516, (1998).
38. KLEVEN, S.H., FAN, H.H., TURNER, K.S.: Pen trial studies on the use of live vaccines to displace virulent Mycoplasma gallisepticum in chickens. *Avian Dis.*, 42 (2): 300-306, (1998).
39. KONKEL, M.E., GRAY, S.A., KIM, B.J., GARVIS, S.G., YOON, J.: Identification of the enteropathogens Campylobacter jejuni and Campylobacter coli based on the cadF virulence gene and its product. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (3): 510-517, (1999).
40. KWAN, H.M., JACKWOOD, M.W., BRAWN, T.P., HILT, D.A.: Polymerase chain reaction and a biotin labelled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Dis.*, 37: 149-156, (1993).
41. KWANG, J., LITTLEDIKE, E.T., KEEN, J.E.: Use of the polymerase chain reaction for Salmonella detection. *Let. Appl. Microbiol.*, 22 (1): 46-51, (1996).
42. LAIGRET, F., DEAVILLE, J., BOVE, J.M., BRADBURY, J.M.: Specific detection of Mycoplasma iowae using polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, 10 (1): 23-29, (1996).
43. LE, L., BRASSEUR, R., WEMERS, C., MEULEMANS, G., BURNY, A.: Fusion (F) protein gene of Newcastle disease virus: sequence and hydrophobicity comparative analysis between virulent and avirulent strains. *Virus Genes*, 1(4): 333-350, (1988).
44. LIN, T.L., WU, C.C., ROSENBERGER, J.K., SAIF, Y.M.: Rapid differentiation of infectious bursal disease virus serotypes by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6 (1): 100-102, (1994).
45. LIU, H.J., GIAMBRONE, J.J., DORMITORIO, T.: Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *J. Virol. Methods*, 48(2-3): 281-291, (1994).
46. LIU, X., GIAMBRONE, J.J., DORMITORIO, T.: Simplified sample processing combined with a sensitive nested polymerase chain reaction assay for detection of infectious bursal disease virus in the bursa of Fabricius. *Avian Dis.*, 42 (3): 480-485, (1998).
47. MARIN, M.C., VILLEGAS, P., BENNETT, J.D., SEAL, B.S.: Virus characterization and sequence of the fusion protein gene cleavage site of recent Newcastle disease virus field isolates from the

- southeastern United States and Puerto Rico. *Avian Dis.*, 40(2): 382-390, (1996).
48. MASE, M., ASAH, S., IMAI, K., NAKAMURA, K., YAMAGUCHI, S.: Detection of turkey rhinotracheitis virus from chickens with swollen head syndrome by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Vet. Med. Sci.*, 58(4): 359-361, (1996).
 49. MIFLIN, J.K., CHEN, X., BRAGG, R.R., WELGEMOED, J.M., GREYLING, J.M., HORNER, R.F., BLACKALL, P.J.: Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent Haemophilus paragallinarum isolates. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 66 (1): 55-57, (1999).
 50. MOORE, K.M., BENNETT, J.D., SEAL, B.S., JACKWOOD, M.W.: Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. *Virus Genes*, 17 (1): 63-83, (1998).
 51. NAKAMURA, K., MASE, M., TANIMURA, N., YAMAGUCHI, S., NAKAZAWA, M., YUASA, N.: Swollen head syndrome in broiler chickens in Japan: its pathology, microbiology, and chemistry. *Avian Pathol.*, 26: 139-154, (1997).
 52. NG, L.K., KINGOMBE, C.I., YAN, W., TAYLOR, D.E., HIRATSUKA, K., MALIK, N., GARCIA, M.M.: Specific detection and confirmation of Campylobacter jejuni by DNA hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (11): 4558-4563, (1997).
 53. QIAN, B., KIBENGE, F.S.: Observations on polymerase chain reaction amplification of infectious bursal disease virus dsRNA. *J. Virol. Methods*, 47 (1-2): 237-242, (1994).
 54. RAHN, K., DE GRANDIS, S.A., CLARKE, R.C., MCEVEN, S.A., GALAN, J.E., GINOCCHIO, C., CURTISS III, R., GYLES, C.L.: Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol. Cell. Probes* 6: 271-279, (1992).
 55. RAJ, G.D., JONES, R.C.: Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chickens. *Avian Pathol.*, 26: 677-706, (1997).
 56. RAZIN, S.: DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. *Mol. Cell. Probes*, 8 (6): 497-511, (1994).
 57. REIMANN, I., WERNER, O.: Use of the polymerase chain reaction for the detection of reticuloendotheliosis virus in Marek's disease vaccines and chicken tissues. *Zentralbl Veterinarmed [B]*, 43 (2): 75-84, (1996).
 58. SALAMI, J.O., ADDO, P., UMOH, J.V., ADEGBOYE, D.S.: Chicken mycoplasmosis: a review with special reference to Mycoplasma galisepticum and M. synoviae. *Vet. Bulletin*, 62 (6): 511- 516, (1992).
 59. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction: In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 14.5 – 14.35, (1989).
 60. SEAL, B.S., KING, D.J., BENNETT, J.D.: Characterization of Newcastle Disease Virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2624-2630, (1995).
 61. SILVA, R.F.: Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. *Avian Dis.*, 36 (3): 521-528, (1992).
 62. SOINE, C., WATSON, S.K., RYBICKI, E., LUCIO, B., NORDGREN, R. M., PARRISH, C. R., SCHAT, K.A.: Determination of detection limit of the polymerase chain reaction for chicken infectious anaemia virus. *Avian Dis.*, 37: 467-476, (1993).
 63. SOUMET, C., ERMEL, G., ROSE, N., DROUIN, P., SALVAT, G., COLIN, P.: Identification by a multiplex PCR-based assay of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29 (1): 1-6, (1999).
 64. STONE, G.G., OBERST, R.D., HAYS, M.P., MCVEY, S., CHENGAPPA, M.M.: Detection of Salmonella serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation – PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.*, 32 (7): 1742-1749, (1994).
 65. STRAM, Y., MEIR, R., MOLAD, T., BLUMENKRANZ, R., MALKINSON, M., WEISMAN, Y.: Applications of the polymerase chain reaction to detect infectious bursal disease virus in naturally infected chickens. *Avian Dis.*, 38 (4): 879-884, (1994).
 66. TAKAGI, M., ISHIKAWA, K., NAGAI, H., SASAKI, T., GOTOH, K., KOYAMA, H.: Detection of contamination of vaccines with the reticuloendotheliosis virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Virus Res*, 40 (2): 113-121, (1996).
 67. TUCHILL, L.M., KODAMA, H., SHARMA, R.N., TAKATORI, I., PANDEY, G.S., KABILIKA, S., MUKAMOTO, M., TSUJI, S., BABA, T.: Detection of Salmonella DNA in chicken embryos

- and environmental samples by polymerase chain reaction. J. Vet. Med. Sci., 58 (9): 881-884, (1996).
68. TURNER, K.S., KLEVEN, S.H.: Eradication of live F strain Mycoplasma gallisepticum vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. Avian Dis., 42 (2): 404-407, (1998).
 69. WANG, C., MIGUEL, B., AUSTIN, F.W., KEIRS, R.W.: Comparision of the immunofluorescent assays and reverse transcription-polymerase chain reaction to detect and type infectious bronchitis virus. Avian Dis., 43 (3): 590-596, (1999).
 70. WANG, H., FADL, A.A., KHAN, M.I.: Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. Mol. Cell. Probes, 11 (3): 211-216, (1997).
 71. WANG, X., KHAN, M.I.: A multiplex PCR for Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus. Mol. Cell. Probes, 13 (1): 1-7, (1999).
 72. XIE, Z., FADL, A.A., GIRSHICK, T., KHAN, M.I.: Amplification of avian reovirus RNA using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Avian Dis., 41: 654-660, (1997).
 73. YANG, C.Y., CHANG, P.C., HWANG, J.M., SHIEH, H.K.: Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from recent outbreaks in Taiwan. Avian Dis., 41(2): 365-373, (1997).
 74. ZHU, G.S., OJIMA, T., HIRONAKA, T., IHARA, T., MIZUKOSHI, N., KATO, A., UEDA, S., HIRAI, K.: Differentiation of oncogenic and nononcogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. Avian Dis., 36 (3): 637-645, (1992).