

## Kanatlı Hayvanlarda *Bordetella avium*'a Kar ı olu an Antikorların Mikroaglutinasyon (MAT), ndirekt Fluoresan Antikor (IFA) ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Teknikleri ile Saptanması\*

Fulya OCAK

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRK YE

**Özet:** Bu çalı mada, hindi ve broylerlerde *B. avium* infeksiyonunun varlı ı ELISA, MAT ve IFAT teknikleriyle ara tırıldı. Bu amaçla Bolu, zmir, Bigadiç yörelerinden 1050 hindi ve Ankara çevresinden 500 broyler serum örne i incelendi. Çalı ma sonucu hindi serum örneklerinin ELISA ile %27.1, MAT ile %21.0, IFAT ile %17.3'ü pozitif, broyler serum örneklerinin ise ELISA ile %14.2, MAT ile %9.6, IFAT ile %7.2'si pozitif bulunmu tur. Sonuç olarak bu ara tırmada ELISA ile *B. avium*'a kar ı daha fazla sayıda seropozitiflik saptandı. Bununla birlikte IFAT ve MAT tekniklerinin de hastalı ın indirekt tanısında kullanılabilece i gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Bordetella avium*, ELISA, IFAT , kanatlı hayvanlar, Mikroaglutinasyon testi

### Detection of Antibodies in Poultry Produced Against *Bordetella avium* by Microagglutination (MAT), ndirect Fluorescence Antibody (IFA) and ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Techniques.

**Summary:** In this study *B. avium* infections were detected in broiler and turkey with ELISA, MAT and IFAT techniques. For this aim, 1050 turkey sera samples collected from Bolu, Izmir, Bigadiç regions and 500 broiler sera samples collected from Ankara region were analysed. It was found that 27.1%, 21.0% and 7.2% of turkey sera samples were seropositive with ELISA, MAT and IFAT techniques, respectively, whereas, 14.2%, 9.6% and 17.3% of broiler sera samples were seropositive with ELISA, MAT and IFAT techniques, respectively. Consequently, more seropositive results are obtained with ELISA technique, However, IFAT and MAT techniques can be used for the indirect diagnose of *B. avium* infections.

**Key Words:** *Bordetella avium*, ELISA, IFAT, poultry, Microagglutination Test

### Giri

Son yıllarda tavuk yeti tiricili i kadar hindi yeti tiricili i de önem kazanarak, hızla yaygınla maktadır. Hızla büyüyen bu entegrasyonun en önemli sorunlarından biri de kanatlılarda sıkça kar ıla ılan solunum sistemi infeksiyonlarıdır. Solunum sistemi infeksiyonları kanatlılarda canlı a ırlıkta azalmaya, yumurta kalitesinde ve veriminde azalmalara ve ölüme neden olarak önemli ekonomik kayıpları olmaktadır.

*Bordetella avium*, genç hindilerin üst solunum yollarının oldukça bula ıcı bir hastalı ı olan hindi korizasının etkenidir. Hastalık okülönazal akıntı, aksırık solunum güçlü ü, trakeal kollaps ve a ırlık kaybı ile karakterizedir ( 2, 7,11).

Hastalı ın etkeni olan *B. avium* Gram negatif 0.2-0.5 x 0.5-1 µm boyutlarında, çomak ya da kokobasil ekinde, peritrik flagellalı, hareketli kapsüllü, oksidaz ve katalaz pozitif, aerobik, nonfermentatif ve nonhemolitik bir bakteridir. Etken koyun kanlı agar, Brain Heart Infusion agar

(BHIA), MacConkey agar, Bordet Gengou, Trypticase soy agar gibi birçok katı besiyerinde üreyebilir. Zenginle tirilmi buyyonda üremesi sonucu filamentöz formlar gözlenir (1,4,7,13,18,21).

*B. avium*'un do al konakçıları hindilerdir, ancak etken tavuk, ördek ve kaz gibi di er kanatlı hayvanlardan da izole edilmi tir. *B. avium*'un neden oldu u solunum sistemi sendromu, papa an ve deveku unda da bildirilmi tir (17). nfeksiyon çok bula ıcıdır ve sekonder bakteriyel infeksiyonlara zemin hazırlar. Etken ba lıca solunum yoluyla bula ır. Etkenin broylerlerde, özellikle, a ılamalardan sonra solunum sistemi hastalı ı olu turdu u tespit edilmi tir (13,18).

Hastalıkta tıksırma, profuze ve okuler burun akıntısı, dispnea ve ses de i ikli inin yanısıra solunum güçlü ü dikkati çeker (3). Göz akıntısı, genellikle, gözün medial kantusunda çok açık olmakla birlikte kıvamlı ve köpüklü bir görünümündedir. Burun akıntısı ise; ba langıçta açık, daha sonra yapı kan ve bulanıktır. Bu durum sık sık a ızdan nefes alma, aksırma ve ba ın sürekli sallanması sonucu burun deliklerinin tam olarak kapanmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, infraorbital sinusların i kinli inin yanısıra submandibular bölgede ve göz kapakları çevresinde de i kinlik gözlenebilmektedir. Hastalıkta ayrıca, aktivitede azal-

Geli Tarihi/Submission Date : 28.11.2005

Kabul Tarihi/Accepted Date : 27.12.2005

\* Aynı adlı doktora tezinden özetlenmi tir.

ma, yem ve su tüketiminde azalma ve yumurta üretiminde düğü gibi değişiklikler de gözlemlenir (10,11,15,16,19,23).

Doğal ve deneysel infeksiyonlarda *B. avium*'a karşı gelişen antikorların saptanmasında serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan testler ELISA ve MAT'dır.

Bu çalışmada başta hindi olmak üzere hindi ve tavuklarda *Bordetella avium* infeksiyonu MAT, ELISA ve IFAT ile araştırılmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmada, kesimhanelerden toplanan 1050 adet hindi, 500 adet broyler olmak üzere toplam 1550 adet serum incelendi. Serumlar ependorf tüplerine aktarılarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Standart *B. avium* suyu, Food Animal Health Research Program Wooster, Ohio, ABD'den temin edildi.

Standart *B. avium* suyu undan spesifik antiserum hazırlamak amacıyla 3 adet üç haftalık broyler (Ross 308) kullanıldı. Standart *B. avium* suyu u BHIA'da, 37°C'de 48 saat süreyle üretildi. Total canlı bakteri sayımı yapıldı.

### Antiserum Hazırlanması

Hazırlanan antijen 10<sup>7</sup> CFU /ml olacak şekilde haftada 1 gün 4 hafta süreyle olmak kaydıyla hayvanlara burun ve göze 0.2' er cc damlatma ve kas içi yolla 1.1 cc olmak üzere 1.5 cc antijen inokule edildi. 3 haftadan itibaren burun ve göze 0.3'er cc damlatılarak geri kalanı kas içi inokule edildi. 4 hafta sonunda hayvanlar kesilerek kanları alındı ve serumları ayrılarak -20°C'de saklandı.

### Aglutinasyon antijenininin hazırlanması

Aglutinasyon antijeni hazırlamak için standart *B. avium* suyu u BHIA'ya ekildi. Aerobik ortamda 37 ° C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra üreyen koloniler 0.02 M PBS (fosfat buffer saline) (pH 7.2) ile toplandı. Toplanan sıvı, steril santrifüj tüplerine konularak 5000 devirde 3 kez santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet 1-2 ml PBS ile sulandırılarak lam aglutinasyon testinde kullanıldı (20). Antiserum titresi hazırlanan bu antijenle, lamda ve tüpte de değerlendirildi.

Mikroaglutinasyon Testi, Arp ve Cheville'nin (5) bildirdikleri yöntemle göre, ELISA tekniği, Hopkins ve ark.'nın (12) bildirdikleri yöntemle göre, IFAT ise Euzebey ve Raffi'nin (9) bildirdikleri yöntemle göre gerçekleştirildi.

### statistiksel Analiz

ELISA ve diğer testler arasında seropozitif görülmeye oranları McNemar testiyle karşılaştırıldı. ELISA ile MAT ve IFA testleri arasındaki uyum kappa testiyle de değerlendirildi. Ayrıca özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerler hesaplandı. ELISA standart test olarak kabul edildi ve tüm testler iki yönlü olarak uygulandı ve anlamlılık düzeyi olarak (p) 0.05 değeri alındı (8,14).

### Bulgular

ELISA, MAT ve IFAT ile test edilen toplam 1550 kanatlı serumunun total olarak 356'sı (%22.9) ELISA ile 269'u (%17.3) MAT ile 218'i (%14) IFAT ile pozitif bulundu.

ELISA, MAT ve IFAT'la test edilen toplam 1050 hindi serumunun 285'i ELISA ile (% 27.1), 220 tanesi MAT (% 21) ile 182 tanesi ise IFAT (% 17.3) ile pozitif bulundu.

ELISA tekniğiyle de değerlendirilen 1050 hindi serumunu 285'i ELISA ile pozitif sonuç verirken, 220 tanesi de MAT ile pozitif sonuç verdi. 65 adet serum ELISA pozitif, MAT negatif sonuç verdi. Hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden MAT'ın ELISA'ya göre duyarlılığı %77.2, özgüllüğü %100 olarak bulundu. MAT testi ile ELISA arasındaki tutarlılık (kappa=0.83, p=0.001) güçlü ve anlamlıdır. Pozitif prediktif değer %100, negatif prediktif değer % 92.2 olarak saptandı.

1050 adet hindi serum örneğinin 285'i ELISA'da pozitif bulunurken, 182'si IFAT'da pozitif sonuç verdi. Serum örneklerinden 103 tanesi ELISA'da pozitif sonuç verirken, IFAT'da ise negatif sonuç verdi. Hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden IFAT'ın ELISA'ya göre duyarlılığı % 63.9, özgüllüğü %100 olarak bulundu. IFAT ile ELISA arasındaki tutarlılık (kappa 0.72 p=0.001) güçlü ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Pozitif prediktif değer: %100, negatif prediktif değer: % 88 olarak bulundu.

Toplam 500 adet broyler serumunda seropozitiflik ELISA ile 71 (%14.2), MAT 'da 49 (%9.6) ve IFAT 'da 36 (%7.2) olarak bulundu.

Broylerlerden toplanan 500 serum örneğinin 71'i ELISA ile 49'u ise MAT ile pozitif bulundu. MAT'da negatif, ELISA pozitif sonuç veren 22 serum belirlendi. Broylerler serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden MAT'ın ELISA'ya göre duyarlılığı %67.6, özgüllüğü %100 olarak bulundu. MAT ile ELISA arasındaki tutarlılık (kappa 0.78 p=0.001) güçlü ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Pozitif prediktif değer %100, negatif prediktif değer

**Tablo 1.** Testlere göre hindi ve broyler serumlarında total olarak *B. avium* seropozitifliği

Test	Sayı (n)	Yüzde (%)
ELISA	356/1550	% 22.9
MAT	269/1550	% 17.3
IFAT	218/1550	% 14

**Tablo 2.** Hindi serumlarının ELISA MAT ve IFAT testlerine göre seropozitifliği

Test	Sayı (n)	Yüzde (%)
ELISA	285/1050	27.1
MAT	220/1050	21.0
IFAT	182/1050	17.3

**Tablo 3.** Broyler serumlarının ELISA MAT ve IFAT testlerine göre seropozitifliği

Test	Sayı (n)	Yüzde (%)
ELISA	71/500	14.2
MAT	49/500	9.6
IFAT	36/500	7.2

%90 olarak saptandı. Broylerlerden toplanan 500 serum örneğinden 71'i ELISA ile 36'sı IFAT ile pozitif bulundu. ELISA'sı pozitif, IFAT'ı negatif sonuç veren 35 serum belirlendi. Broyler serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden IFAT'ın ELISA'ya göre duyarlılığı %50.7, özgüllüğü %100 olarak bulundu \*Kappa 0.64 p=0.001, Pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %92 olarak saptandı.

#### Tartışma ve Sonuç

Bir kümesin bulaşıklık durumunun belirlenmesinde ve hastalığın kontrol altına alınmasında, MAT, ELISA gibi çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır.

Hopkins ve ark.(12) çok sayıda hindi serumunda *B. avium* antikorlarını saptamak amacıyla ELISA geliştirmiştir. Bu tekniğin yüksek özgüllük ve du-

yarlılığına sahip olduğunu belirtmiştir. ELISA tekniği ile 126 adet 1 günlük hindi palazlarından ve pozitif mikroaglutinasyon serum titreleri gösteren doğal enfekte damızlık hindilerden serum örnekleri toplanmıştır. ELISA ile 126 adet 1 günlük hindi palazlarının 91'inde maternal antikorlar saptanırken bu serumların tümü mikroaglutinasyon testinde negatif sonuç vermiştir. *B. avium*'a karşı mikroaglutinasyon testinde pozitif sonuç veren serumların tümü ELISA'da pozitif titre göstermiştir, ELISA'da negatif sonuç veren serumların tümü mikroaglutinasyon testinde de negatif sonuç vermiştir. Bu iki test arasındaki yegane uyumsuzluk ELISA pozitif sonuç veren, negatif mikroaglutinasyon titreli serumlarda görülmüştür.

Tsai ve ark. (22) *B. avium*'a karşı maternal antikorları saptamada ELISA'nın MAT'a oranla daha duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada hindi ve broylerlerden toplam 1550 kanatlı serumu toplanmıştır. Bu serumlar ELISA, MAT ve IFAT ile incelenerek seropozitiflik indirekt olarak ortaya konulmuştur. Bu serumların % 22.9'u ELISA ile %17.3'ü MAT ile, ve %14'ü IFAT ile pozitif sonuç vermiştir.

MAT sonuçlarının bir gecedan önce de erlendirilememesi, ELISA'yı daha tercih edilir hale getirmiştir.

Barbour ve ark. (6) *B. avium*'a oldukça spesifik bir ELISA geliştirmiştir, 4-11 haftalık infekte olmamış kanatlı hayvan sürülerinden topladıkları 120 serum örneğini ELISA ile incelemiştir, hatasız bir pozitiflik elde etmişlerdir. Hemorajik enteritis virusu, Newcastle virusu ve *M. meleagridis* antikorları saptanan pek çok hindi serumu *B. avium* yönünden ELISA'da negatif sonuç vermiştir. ELISA'nın *B. avium*'la infekte olmuş sürülerde yeterli duyarlılığa sahip olduğu, *B. avium*'dan arı sürülerden toplanan serumlarda hatalı pozitiflik elde etmediği sonucuna varılarak oldukça özgül bulunmuştur.

Bu çalışmada IFA tekniği Euzeby ve Raffi (9)'nın bildirdikleri yöntemle modifiye edilmiştir. ELISA, MAT ve IFAT sonuçları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. ELISA'da 1550 serumun 356'sı (%22.9) pozitif saptanırken IFAT'da ise 218'i (14.0) pozitif olarak belirlenmiştir. 138 serum örneği ELISA'da pozitif bulunurken IFAT negatif bulunmuştur.

ELISA ve IFA testleri arasında önemli bir fark bulunmazken (8,14) Euzeby ve ark.(9) modifiye edilen IFA tekniği ilk kez denenmiş ve başarılı bulunmuştur.

Hopkins ve ark (12) geliştirdikleri ELISA'da tüm hücre antijenini, sadece antijeninden daha üstün bulunmuştur. Ayrıca %3 BSA (Bovine serum albumine) nonspesifik bağlanmaları azaltmada jelatinle eder düzeyde bulunmuştur fakat BSA daha pahalı olduğu için jelatin tercih edilmiştir.

Bu çalışmada ELISA testi standart kabul edilmiştir (8,14), buna göre hindi serumlarında MAT'ın ELISA'ya göre özgüllüğü %100, duyarlılığı %77.2, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri ise % 92.2 olarak saptanmıştır, IFAT'ın ELISA'ya göre özgüllüğü %100, duyarlılığı % 63.9, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri ise % 88.1 olarak bulunmuştur. Broyle serumlarında ise MAT'ın ELISA'ya göre özgüllüğü %100, duyarlılığı % 67.6 pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %90 olarak belirlenmiştir, IFAT'ın ise ELISA'ya göre özgüllüğü %100, duyarlılığı %50.7, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri ise 92.4 olarak saptanmıştır.

MAT, ELISA ve IFA teknikleri indirekt olarak seropozitiflik in ortaya konulmasında başarılı bulunmuştur. MAT'ın antijen hazırlama prosedürü ve bir gecedan önce sonuçlarının de erlendirilememesi nedeniyle diğer iki teste göre daha zaman alıcı ve pratik olmadığı kanısına varılmıştır. ELISA ve IFAT uygulanma prosedürü ve zaman açısından kolaylık göstermesine rağmen ELISA'da daha fazla sayıda seropozitiflik in elde edilmesi, uygulanabilirliği, daha tercih edilir bir test olabileceğini düşünmüştür.

### Kaynaklar

1. Akeila MA, Saif YM, 1988. Protection of turkey poults from *Bordetella avium* infection and disease by pili and bacterins. *Avian Dis.*, 32: 641-649.
2. Andral B, Louzis C, Edlinger E, Newman JA, Toquin D, 1984. Respiratory Disease (rhinotracheitis) in turkeys in brittany France 1981-1982. II Laboratory findings. *Avian Dis.*, 29: 26-42
3. Anon 1985. Turkey rhinotracheitis of unknown aetiology in England and Wales. preliminary report from the *British Vet Rec.*, 117: 653-654.
4. Arp LH, 1986. Adherence of *Bordetella avium* to turkey tracheal mucosa: Effects of culture conditions. *Am J Vet Res.*, 47: 2618-2620.
5. Arp LH, Cheville NF, 1984. Tracheal lesions in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *Am J Vet Res.*, 45: 2196-2200.
6. Barbour EK, Brinton KM, Tarkelson SD, Johnson JB, Poss PE, 1991. An Enzyme – Linked immunosorbent assay for detection of *Bordetella avium* infection in turkey flocks: Sensitivity, Specificity and Reproducibility. *Avian Dis.*, 35: 308-314.
7. Blackall PJ, Farrah 1985. Isolation of *Bordetella avium* from poultry. *Aust Vet J.*, 62: 370-372.
8. Conover WJ, 1999. *Practical Nonparametric Statistics*, Third Edition. New York: John Wiley & Sons
9. Euzeby JP, Raffi AM, 1988. Mise en evidence d'Anticorps anti- *Borrelia burgdorferi* chez le chien Sondage Epidemiologique en Region Midi-Pyrenees. *Rev Med Vet.*, 139: 589-593.
10. Ficken MD, Edwards JF, Lay JC, Tveter DE, 1985. Tracheal mucus transport rate in

- normal turkeys and in turkeys infected with *Bordetella avium* (*Alkaligenes faecalis*). *Avian Dis.*, 30:154-159.
11. Helwig DH, Arp LH, 1990. Identification antigens recognized after experimental inoculations in turkeys. *Am J Vet Res.*, 51: 1188-1191.
  12. Hopkins BA, Skeeles GE, Houghteen GE, Story JD, 1988. Development of an Enzyme-Linked immunosorbent Assay for *Bordetella avium*. *Avian Dis.*, 32:353-361.
  13. Jackwood MW, Saif YM, 1985. Efficacy of a commercial turkey coryza vaccine (art-vax) in Turkey poults *Avian Dis.*, 29: 1130-1139.
  14. Özdamar K, 2001. SPSS ile *Bioistatistik* Dördüncü baskı, Kaan Kitabevi Ankara.
  15. Page RK, Fletcher OJ, Lukert PD, Rimler R, 1978. Rhinotracheitis in Turkey Poults. *Avian Dis.*, 22: 529-534.
  - 16- Panigraphy BL, Grumbles RJ, Terry DL, Hall CF, 1981. Bacterial Coryza in Turkeys in Texas. *Poult Sci.*, 60: 107-113.
  17. Raffel RT, Register KB, Marks SA, Temple L, 2002. Prevalence of *Bordetella avium* in selected wild and domesticated bird in the Eastern USA. *J Wildlife Dis.*, 38: 40-46.
  18. Rimler RB, 1985. Turkey coryza: Toxin production by *Bordetella avium*. *Avian Dis.*, 29: 1043-1047.
  19. Rimler BR, Kunkle RA, 1998. Bacterin-induced protection of turkeys against fowl cholera following infection with *Bordetella avium*. *Avian Dis.*, 42:752-756.
  20. Simmons DD, Gray JG, Rose LP, 1978. Isolation of an etiologic agent of acute respiratory disease (Rhinotracheitis) of turkey poults. *Avian Dis.*, 23: 195-203.
  21. Suresh P, 1993. Detecting *Bordetella avium* in tracheal sections of turkeys by monoclonal antibody-based indirect fluorescence microscopy. *Avian Pathol.*, 22: 791-795.
  22. Tsai HJ, Saif YM, 1991. Detection of antibodies against *Bordetella avium* in turkeys by avidin- biotin enhancement of the Enzyme-Linked Immunosorbent assay and the dot immunobinding assay. *Avian Dis.*, 35: 801-808.
  23. Van Alstine WG, Arp LH, 1987. Effects of *Bordetella avium* infection on the pulmonary clearance *E. coli* in turkeys. *Am J Vet Res.*, 48: 922-926.

## Yazı ma Adresi:

Ar . Gör. Dr. Fulya OCAK  
 Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
 Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
 Kocasinan/KAYSER  
 Tel: 0352 338 00 05/173  
 E-mail: fulyaocak@erciyes.edu.tr