

**Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication**

**Tavuklarda infeksiyöz koriza'nın serolojik teşhisinde aglutinasyon, hemaglutinasyon inhibisyon ve indirekt hemaglutinasyon testlerinin karşılaştırılması**

**Arzu FINDIK<sup>1</sup>, Hakan YARDIMCI<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr., O.M.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun; <sup>2</sup> Prof.Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

**Özet:** Bu çalışma, tavuklarda İnfeksiyöz Koriza'nın serolojik teşhisinde aglutinasyon, hemaglutinasyon inhibisyon (HI) ve indirekt hemaglutinasyon (IHA) testlerinin kullanılabilirliğini araştırmak ve bu testler arasında bir karşılaştırma yapmak amacıyla yapıldı. Aglutinasyon testi hem serotip spesifik lam aglutinasyon antijenleri (serotip A, B ve C spesifik) hem de serotip C (Modesto) suşundan hazırlanan tüm hücre lam aglutinasyon antijeni kullanılarak yapıldı. Çalışma kapsamında 510 serum incelendi. Tüm hücre antijeni ile yapılan lam aglutinasyon testinde saha serumlarının %42.75'i pozitif, %57.25'i ise negatif sonuç verdi. Serotip spesifik lam aglutinasyon antijenleri ile yapılan testte, serumların %31.37'si serotip A, %15.1'i serotip C antikorları yönünden pozitif bulundu. Serumların %53.53'ü ise sero-negatif bulundu. Taze tavuk eritrositleri ile yapılan hemaglutinasyon testinde aglutinasyon görülmezken; gluteraldehit ile fikse edilmiş tavuk eritrositlerinin kullanıldığı hemaglutinasyon testinde 1/64 titre belirlendi. Sonuç olarak, seropozitif tavukların saptanmasında tüm hücre antijeni ile yapılan aglutinasyon testinin duyarlı olduğu belirlenirken, HI ve IHA testlerinin yetersiz kaldığı saptandı. Serotip spesifik antijenlerle yapılan lam aglutinasyon testinin de infekte hayvanları belirlemede yararlı olduğu görüldü.

*Anahtar sözcükler:* infeksiyöz koriza, serolojik teşhis.

**The comparison of agglutination, hemagglutination inhibition and indirect hemagglutination tests in the serological diagnosis of infectious coryza in chickens**

**Summary:** This study was carried out to investigate the feasibility of agglutination, hemagglutination inhibition (HI) and indirect hemagglutination (IHA) tests in the diagnosis of Infectious Coryza in chickens and to compare these tests. The agglutination tests were performed by using both serotype specific plate agglutination test antigens (serotype A, B and C specific) and the whole cell plate agglutination test antigen that prepared from serotype C (Modesto) strain. 510 sera were tested in this study. 42.75% of the field sera were found positive and 57.25% were found negative in plate agglutination tests performed with whole cell antigen. The test sera of 31.37% were found positive in regards to have serotype A antibodies and 15.1% of them were found positive in regards to have serotype C antibodies and remaining 53.53% were found to be negative in plate agglutination test performed with serotype specific plate agglutination antigens. Hemagglutination did not occur in hemagglutination test performed with fresh chicken erythrocytes. Whereas in hemagglutination test which was performed with glutaraldehyde-fixed chicken erythrocytes, 1/64 HA titer was determined. Consequently, while the agglutination tests performed with whole cell antigen was found to be sensitive, HI and IHA were inefficient in the detection of seropositive chickens. Plate agglutination test performed with serotype specific antigens were found to be useful to determine chickens infected with these serotype strains.

*Key words:* Infectious coryza, serological diagnosis.

İnfeksiyöz Koriza, tavukların *Haemophilus paragallinarum* tarafından oluşturulan akut üst solunum yolu infeksiyonlarından olup yumurta veriminde ve karkas ağırlığında önemli düşüslere neden olmaktadır. *H. paragallinarum* De Blicke (1932) tarafından tavuklardan ilk kez 1930'lu yıllarda izole etmiş ve 1932 yılında "*Bacillus haemoglobinophilus coryzae gallinarum*" olarak isimlendirilmiştir. Bu etken hakkındaki ilk karakterizasyon çalışmaları 1932'de McGoughey (1932)

tarafından yapılmıştır. Eliot ve Lewis (1934) ile Delaplane ve ark. (1934) ise etkeni 1934'te *Haemophilus gallinarum* olarak yeniden isimlendirmişlerdir (1).

Etkenin izolasyonunun zor olması, üretilmesi için zenginleştirilmiş besiyerlerine ihtiyaç duyması ve identifikasyonda kullanılan biyokimyasal testlerin zaman alıcı olması hastalığın teşhisini zorlaştırmaktadır (17). İnfekte veya aşılı tavuklarda *H. paragallinarum*'a karşı oluşmuş antikorları belirlemede lam ve tüp aglutinasyon testleri

(8), agar jel presipitasyon testi (5), lateks aglutinasyon testi (16) ve 3 tip Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) testi (5, 12) gibi çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. *H. paragallinarum* serolojik olarak A, B ve C olarak isimlendirilen 3 serotip içermektedir (10). İndirekt hemaglutinasyon testi ile M-tip *H. paragallinarum*'un sıvı kültür filtratlarında ve kültür yıkantılarında serotip spesifik polisakkarit antijenin varlığı ilk kez Hinz (3) tarafından belirlenmiştir. Kato ve ark. (7), da ilk kez *H. paragallinarum*'un hemaglutinasyon yeteneğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar (4, 8), HA antijeninin serovar-spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonraları yapılan çalışmalarda (15), *H. paragallinarum*'un hemaglutinasyon antijeninin aglutinasyon antijenlerine eşdeğer olduğu, çünkü hemaglutinasyon inhibisyon testi ile yapılan serotiplendirmenin, lam aglutinasyon testi ile yapılan serotiplendirme ile uyumlu olduğu ileri sürülmüştür.

Sunulan çalışmada, tavuklarda önemli ekonomik kayıplara neden olan İnfeksiyöz Koriza hastalığının serolojik tanısında aglutinasyon, hemaglutinasyon inhibisyon ve indirekt hemaglutinasyon testlerinin standardize edilmesi ve bu testlerin sonuçları karşılaştırılarak rutin tanı ve saha taramalarında kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Suşlar:** Aglutinasyon, HI ve IHA testlerinde kullanılan *H. paragallinarum* suşu (serotip C), Dr. Patrick J. Blackall (Queensland Department of Primary Industries, Animal Research Institute, Avustralya)'dan sağlandı.

**Deney hayvanları:** Çalışmada immün serum elde etmede kullanılan 4 haftalık beyaz Leghorn ırkı tavuklar ile 2 adet 2 yaşlı Yeni Zellanda ırkı tavşan, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü-Ankara'dan temin edildi.

**Test ve kontrol serumları:** Çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne solunum sistemine yönelik bir hastalık şüphesi ile gelen tavuklardan ve ayrıca çeşitli illerdeki (Konya, Bursa, Balıkesir, Bolu, İzmir) solunum sistemi hastalığı ve özellikle İnfeksiyöz Koriza şüpheli aşısız yumurtacı sürülerden toplam 510 kan serum örneği alındı. Pozitif kontrol serumu olarak immünize edilen tavuk ve tavşanlardan elde edilen serumlardan, negatif kontrol olarak da Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü'nden sağlanan SPF tavukların kan serumlarından yararlanıldı.

**İmmün serum:** Çalışmada uygulanan testlerde pozitif kontrol olarak kullanılan serumlar, tavuk ve tavşanlardan elde edildi. İmmün serum, tavuklardan Page (10)'in bildirdiği yöntemle göre elde edildi. Tavşanlardan immün serum, Sawata ve ark. (11)'nin bildirdiği yöntemle göre elde edildi.

**Aglutinasyon testi:** Saha serumları Thornton ve Blackall (13)'in bildirdiği yöntemle göre C serotipinden (Modesto suşu) hazırlanan lam aglutinasyon antijeni ile ve ayrıca Hipra Laboratuvarlarından temin edilen

spesifik lam aglutinasyon antijenleri ile yapıldı. *H. paragallinarum*'un her üç serotipine karşı hazırlanmış spesifik lam aglutinasyon antijenleri, kullanma talimatına uyularak lam aglutinasyon testinde kullanıldı.

**Hemaglutinasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon:** Sırasıyla Eaves ve ark. (2), Iritani ve Hidaka (5) ve Sawata ve ark. (12)'nin bildirdiği 3 ayrı yöntem ile yapıldı. Gluteraldehit ile tespit edilmiş eritrositlerin aglutine olduğu son sulandırma HA titresini olarak kabul edildi. HI titresini, serumun hemaglutinasyonu inhibe ettiği en yüksek sulandırma olarak değerlendirildi.

**İndirekt hemaglutinasyon testi:** İndirekt hemaglutinasyon testi antijeni Eaves ve ark. (2)'nin bildirdiği şekilde hazırlandı ve Sawata ve ark. (12)'nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Tüm testlerde negatif ve pozitif kontroller kullanıldı.

Çeşitli bölgelerden toplanan şüpheli tavuk kan serumları, spesifik lam aglutinasyon antijenleri ile test edildi ve toplam 510 serumun 160'ı (%31.37) serotip A, 77'si (%15.1) serotip C antikorları yönünden pozitif bulunurken, geri kalan 273 (%53.53) serum örneği aglutinasyon testinde negatif bulundu. Serotip C-Modesto suşundan hazırlanan aglutinasyon antijeni kullanılarak yapılan aglutinasyon testinde, test edilen 510 tavuk serumundan 218'i (%42.75) pozitif ve 292'si (%57.25) negatif bulundu. *H. paragallinarum* ile ilgili ilk serolojik çalışma, Page (10) tarafından yapılmış olup lam aglutinasyon testi ile 3 serotipi belirlenmiştir. Daha sonra başka araştırmacılar da *H. paragallinarum*'un serotiplendirmesinde lam aglutinasyon testini kullanmışlardır (1). İnfekte hayvanların belirlenmesinde de lam aglutinasyon testi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (6). Bununla birlikte, bazı araştırmacılar (1, 5, 11) aglutinasyon testinde kullanılan antijenin, değişik aglutinasyon serotiplerinde ortak olduğundan tip spesifik antijenlere karşı hazırlanan antiserumlar ile adsorpsiyon uygulanmadan serotip spesifik aglutininleri belirlemenin imkansız olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, laboratuvarında C serotipinden hazırlanan tüm hücre lam aglutinasyon antijeninin, serotipler arasında ortak olan antijenleri içerdiği ve bu antijenin kullanıldığı aglutinasyon testinde, her 3 serotipte ortak olan antijenlerin belirlenmediği ve serotip spesifitesi belirlenmeksizin infekte hayvanların ortaya konulabileceği kanısına varılmıştır. Çalışmada ayrıca, Ok ve Ateş (9)'in bulgularına paralel olarak, Ankara, Konya, İzmir, Bursa ve Balıkesir bölgeleri genelinde A serotipinin baskın olduğu belirlenmiştir.

Hemaglutinasyon ve HI testinde, taze ve GA ile fikse edilmiş tavuk eritrositleri %0.5, %1 ve %2'lik süspansiyonları kullanılarak pozitif sonuçların en iyi %2'lik GA ile tespit edilmiş eritrosit süspansiyonu ile alındığı görüldü. IHA testinde ise tannik asitle muamele edilmiş ve duyarlılaştırılmış GA ile fikse koyun eritrositlerinin son hacmi %0.5 ve %1 olmak üzere 2

şekilde denendi ve pozitif olarak değerlendirilen dantela görüntüsü %0.5'lik süspansiyon ile daha iyi gözlemlendi. Birinci metoda göre hazırlanan hemaglutinasyon antijeni ile %2'lik tavuk eritrositlerinin kullanıldığı hemaglutinasyon testinde eritrositler aglutine olmadı. Aynı antijen ve GA ile fikse edilmiş %2'lik tavuk eritrositinin kullanıldığı hemaglutinasyon testinde 1/64 titre belirlendi. Testte, GA ile fikse edilmiş tavuk eritrositlerinin kullanılmasının sonuç üzerine etkili olduğu görüldü. 2. ve 3. metoda göre hazırlanan HA antijeni ile %2'lik taze tavuk eritrositlerinin kullanıldığı hemaglutinasyon testinde eritrositler aglutine olmadı. Aynı antijenler ve GA ile fikse edilmiş eritrositlerin kullanıldığı hemaglutinasyon testi sonunda da aynı şekilde negatif sonuç elde edildi (Tablo 1). Çalışmada, Modesto (serovar C) suşundan basit olarak yıkama suretiyle hazırlanan HA antijeninin ne taze ne de glutaraldehit ile fikse edilmiş tavuk eritrositlerini aglutine etmediği görülmüştür. Antijen, etkenin KSCN ile muamelesi ve ardından sonike edilmesi suretiyle hazırlandığında ise GA ile fikse edilen eritrositlere karşı HA aktivitesi gözlenmiştir. Buna göre, KSCN ile muamele ve sonikasyonun hücrelerde HA aktivitesini inhibe eden yapıları uzaklaştırmak suretiyle HA aktivitesini uyardığı kanısına varılmıştır. Bu sonuç, Sawata ve ark. (12)'nin elde ettiği sonuçlarla uygunluk göstermektedir.

Tablo 1. Hazırlanan HA antijenlerinin taze ve GA ile fikse edilmiş tavuk eritrositlerini aglutine etme özellikleri.  
Table 1. Haemagglutinating properties of HA antigens with fresh and GA-fixed erythrocytes.

HA antijenleri	Taze Eritrosit	GA ile fikse edilmiş eritrosit
1. yöntemle göre hazırlanan antijen	<1/2	1/64
2. yöntemle göre hazırlanan antijen	<1/2	<1/2
3. yöntemle göre hazırlanan antijen	<1/2	<1/2

Hemaglutinasyon inhibisyon testinde 4HA ünitesinde antijen kullanıldı. HI ve IHA testlerinde elde edilen bulgular Tablo 2'de sunulmuştur. HI testinde pozitif kontrol olarak kullanılan immun tavuk serumunda 1/256, tavşan immun serumunda ise 1/512 HI titresi belirlendi. IHA testinde pozitif kontrol olarak kullanılan immun tavuk ve tavşan serumlarında 1/8 IHA titresi belirlendi. Sunulan çalışmada, saha serumları, serotip C suşundan Eaves ve ark. (2)'nin bildirdiği yöntemle göre hazırlanan HI antijeni ve GA ile fikse edilmiş tavuk eritrositlerinin kullanıldığı HI testi ile değerlendirilmiştir. Antijenin 4 hemaglutinasyon ünitesi kullanıldığı göz önüne alındığında, test serumlarının hiç birinde 1/8'in üzerinde HI titresi elde edilemediği saptanmıştır. Çalışmanın yapıldığı dönem içerisinde İnfeksiyöz Koriza aşılı tavuk

Tablo 2. Serum örneklerinin aglutinasyon, HI ve IHA pozitif test sonuçları.  
Table 2. The positive agglutination, HI and IHA results of sera samples.

Bölge ve İşletme No	Serum Sayısı	Aglütinasyon testi				HI Titresi	IHA Titresi	
		Serotip A spesifik antijen (*)	Serotip B spesifik antijen (*)	Serotip C spesifik antijen (*)	Serotip C tüm hücre antijeni (**)			
Konya	1	20	-	-	17	<1/8	<1/2	
	2	20	20	-	-	<1/8	<1/2	
	3	30	-	-	-	<1/8	<1/2	
	4	30	-	-	-	<1/8	<1/2	
	5	20	20	-	-	16	<1/8	<1/2
Bursa	6	20	-	-	-	<1/8	<1/2	
	7	20	-	-	-	<1/8	<1/2	
Ankara	8	30	-	-	-	<1/8	<1/2	
	9	30	-	-	-	<1/8	<1/2	
	10	30	-	-	-	<1/8	<1/2	
	11	30	-	-	-	<1/8	<1/2	
İzmir	12	20	-	-	20	<1/8	<1/2	
	13	20	20	-	-	<1/8	<1/2	
	14	20	-	-	20	<1/8	<1/2	
	15	20	-	-	20	<1/8	<1/2	
	16	25	25	-	-	21	<1/8	<1/2
	17	25	-	-	-	-	<1/8	<1/2
	18	25	-	-	-	-	<1/8	<1/2
Bolu	19	20	20	-	-	17	<1/8	<1/2
	20	10	10	-	-	8	<1/8	<1/2
Balıkesir	21	10	10	-	-	8	<1/8	<1/2
	22	10	10	-	-	10	<1/8	<1/2
	23	15	15	-	-	13	<1/8	<1/2
	24	10	10	-	-	10	<1/8	<1/2
Toplam	510	160	0	77	218			

(\*) Hipra Laboratuvarlarından temin edilen serotip spesifik antijenler.

(\*\*) Serotip C (Modesto) suşundan hazırlanan tüm hücre antijeni.

serumu elde edilemediğinden, testin aşılı hayvanlarda nasıl bir sonuç vereceği görülememiştir. Ancak, immunizasyon sonunda, tavuklarda yüksek titrede HI antikoru elde edilebilmiştir. Tavukların nazal boşluğundaki serovar C etkenlerinin tip spesifik HA antijenlerini tam olarak ifade edemediği veya serovar C spesifik HA-L'nin antijenitesinin zayıf olabileceği ve bu yüzden HI testinde belirlenebilir HI titresi elde edilemediği kanısına varılmıştır. Bu sonuç, Yamaguchi ve ark. (14)'nin sonuçları ile uyum göstermektedir.

Sonuç olarak, serotip spesifik antijenlerle yapılan lam aglutinasyon testinin infekte hayvanların hangi serotiple infekte olduğunu belirlemede yararlı olacağı görüşüne varılmıştır. Böylece, bölgelerde yaygın olan serotip belirlenerek bu serotiplere karşı etkin aşı hazırlama çalışmaları yapılabilecektir. Bunun yanı sıra, basit olarak hazırlanabilen tüm hücre antijeni ile yapılan aglutinasyon testinin, çok sayıda seropozitif hayvanı serotip spesifitesi olmaksızın belirleyebildiği ortaya konulmuştur. Bu antijenin hazırlanmasının kolay olması nedeniyle sahada kullanılabileceği görüşüne varılmıştır. Çalışmada ayrıca serotip C (Modesto) suşu ile hazırlanan antijenlerin kullanıldığı HI ve IHA testlerinin seropozitif hayvanları saptamada aglutinasyon testine göre yetersiz kaldığı saptanmıştır.

### Kaynaklar

1. **Blackall PJ** (1989): *The avian haemophili*. Clin Microbiol Rev, **2**, 276-277.
2. **Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ** (1989): *Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of H. paragallinarum and proposal of a new hemagglutinin serovar*. J Clin Microbiol, **27**, 1510-1513.
3. **Hinz KH** (1976): *Differentiation of Haemophilus strains isolated from chickens. IV. studies on the dissociation of Haemophilus paragallinarum*. Avian Pathol, **5**, 51-56.
4. **Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T** (1981): *Determination of types 1 and 2 hemagglutinins in serotypes of H. paragallinarum*. Avian Dis, **25**, 479-483.
5. **Iritani Y, Sugimori G, Katagiri K** (1977): *Serologic response to Haemophilus gallinarum in artificially infected and vaccinated chickens*. Avian Dis, **21**, 1-8.
6. **Jordan FTW** (1994): *Haemophilus paragallinarum (Infectious Coryza, Fowl Coryza)*. 49-50. In: FTW Jordan (Ed), Poultry Diseases. Bailliere Tindall, England.
7. **Kato K, Tsubahara H, Okuma S** (1965): *Infectious coryza of chickens. VI. Hemagglutinating properties of H. gallinarum*. Jpn J Vet Sci, **27**(Suppl), 457.
8. **Kume K, Sawata A, Nakase Y** (1980): *Relationship between protective activity and antigen structure of H.paragallinarum serotypes 1 and 2*. Am J Vet Res, **41**, 97-100.
9. **Ok Ü, Ateş M** (1997): *Enfeksiyöz koriza şüpheli tavuklardan H. paragallinarum'un izolasyonu, serotiplendirilmesi ve seroepizootiyolojisi*. Veterinarium, **8**, 27-34.
10. **Page LA** (1962): *Haemophilus infections in chickens. I. characteristics of 12 Haemophilus isolates recovered from diseased chickens*. Am J Vet Res, **23**, 85-95.
11. **Sawata A, Kume K, Nakase Y** (1979): *Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 H. paragallinarum*. Am J Vet Sci, **40**, 1450-1453.
12. **Sawata A, Kume K, Nakase Y** (1982): *Hemagglutinin of Haemophilus paragallinarum serotype 2 organisms: Occurrence and immunologic properties of hemagglutinin*. Am J Vet Res, **43**, 1311-1314.
13. **Thornton AM, Blackall PJ** (1984): *Serological classification of Australian isolates of Haemophilus paragallinarum*. Aust Vet J, **61**, 251-253.
14. **Yamaguchi T, Iritani Y, Hayashi Y** (1988): *Serological response of chickens either vaccinated or artificially infected with Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis, **32**, 308-312.
15. **Yamaguchi T, Iritani Y, Hayashi Y** (1989): *Hemagglutinating activity and immunological properties of Haemophilus paragallinarum field isolates in Japan*. Avian Dis, **33**, 511-515.
16. **Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y** (1981): *Latex agglutination test for measurement of type-specific antibody to H. paragallinarum in chickens*. Avian Dis, **25**, 988-995.
17. **Yardımcı H** (2002): *İnfeksiyöz koriza*. 65-67. In: M İzgür, M Akan (Eds), Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Medisan Yayınevi, Ankara.

Geliş tarihi: 01.08.2008 / Kabul tarihi: 17.12.2008

### Yazışma adresi:

Yrd. Doç.Dr. Arzu Fındık  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
55139 Kurupelit, Samsun