

Hindilerde *Bordetella avium* antikollarının enzyime-linked immunosorbent assay, mikroaglutinasyon ve lam aglutinasyon testleri ile belirlenmesi üzerine karşılaştırmalı bir araştırma*

Şebnur HAZIMOĞLU¹, Süheyla TÜRKYILMAZ²

¹ Uzman Veteriner Hekim, Çamlı Besi Çiftliği, Kemalpaşa, İzmir; ² Yrd. Doç. Dr., Adnan Menderes Üniv., Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, Aydın.

Özet: Bu çalışmanın amaçları solunum sistemi hastalığı semptomu bulunan hindilerden *B. avium*'a maruz kalmış olanların serolojik olarak saptanması için lam aglutinasyon (LAT), mikroaglutinasyon (MAT) test antijenlerinin hazırlanması ve bu testlerin duyarlılıklarının ticari enzyime-linked immunosorbent assay (ELISA) ile karşılaştırılmasıdır. Çalışmanın materyalini İzmir İl'i ve çevresinde bulunan, solunum sistemi problemi gösteren 900 ticari hindiden alınan kan serum örnekleri oluşturmaktadır. Seroprevalens ELISA, LAT ve MAT için sırasıyla % 21.6, % 13.8 ve % 12.1 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak; *B. avium*'a karşı oluşan antikolların belirlenmesinde en duyarlı testin ELISA olmasına karşın; LAT ve MAT'lerinin de bu amaçla kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *B. avium*, enzyime-linked immunosorbent assay, lam aglutinasyon testi, mikroaglutinasyon testi

A comparative study on detection of *Bordetella avium* antibodies in turkeys by enzyme-linked immunosorbent assay, microagglutination and serum plate agglutination tests

Summary: The aims of this study were to develop a serum plate agglutination test (LAT) antigen and microagglutination (MAT) test antigen for the serologic detection of turkeys that have been exposed to *B. avium* with respiratory disease symptom and to compare sensitivity of commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with these tests. All serum samples were collected from commercial turkey enterprises in İzmir, samples from 900 turkeys with symptoms of respiratory disease constituted the material of this study. The seroprevalence was determined as 21.6 %, 13.8 %, 12.1 % for ELISA, LAT, and MAT tests, respectively. As a conclusion, although ELISA was defined as the most sensitive test for screening of *B. avium* antibodies with this study, LAT and MAT's could also be used for this purpose.

Key words: *B. avium*, enzyme-linked immunosorbent assay, plate agglutination test, microagglutination test.

Giriş

Kanatlı bordetellozisi (hindi korizası) özellikle genç hindilerin düşük mortalite ve yüksek morbidite ile karakterize; okulonasal akıntı, aksırık, solunum güçlüğü, trakeal kollaps ve ağırlık kaybı gibi klinik belirtiler ile seyreden oldukça bulaşıcı bir üst solunum sistemi hastalığıdır (3). Ticari hindiler hastalığa karşı oldukça duyarlıdır (11). İnsanlarda *Bordetella pertussis*'in neden olduğu boğmaca hastalığı ile hindilerin bordetellozisinin benzerliklerine rağmen; *B. avium*'un insanlarda kolonize olduğuna veya hastalık yaptığına ilişkin bir kanıt bulunmamaktadır (3, 11, 15).

Bordetellozis'in tanısı klinik bulgular, etkenin solunum yollarında meydana getirmiş olduğu lezyonlar, üst solunum yollarından etkenin izolasyonu ve serolojik testler ile konulur (3, 4, 11). Etken izolasyonu zaman

alıcıdır ve saha koşullarında pratik değildir (4). Doğal ve deneysel infeksiyonlarda *B. avium*'a karşı gelişen antikolların saptanmasında serolojik testlerden sıkça yararlanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan testler Enzyime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ve Mikroaglutinasyon Test (MAT)'leridir (11, 13, 15). MAT'nin bakteriyel izolasyon ile yüksek korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur (10, 11). ELISA oldukça güvenilir bir teşhis yöntemidir ve pek çok laboratuarda referans test olarak *B. avium*'a karşı oluşan antikolların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak ELISA kitlerinin fiyatının yüksek olması kitin kullanılabilirliği açısından önemli bir dezavantajdır (2, 9, 12). Bununla birlikte henüz ticari olarak *B. avium* Lam Aglutinasyon Test (LAT) antijeni geliştirilmemiştir.

* Aynı isimli Yüksek Lisans Tezi'nden özetlenmiş ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (TÜBİTAK Proje No: TOVAG-106 0 268).

Hindilerde solunum sistemi problemleri özellikle havalarda soğumaya başladığı dönemlerde etkili olup, büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Solunum sistemi patojenlerinin kısa sürede teşhis edilmesi ve buna yönelik tedaviye en kısa sürede başlanması ekonomik kayıpların önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu nedenlerden dolayı yapılan araştırmanın amaçları; saha koşullarında pratik olarak kullanılacak LAT antijenin hazırlanması, laboratuvar koşullarında uygulanabilecek MAT antijenin hazırlanması ve MAT'nin standardizasyonu, ticari ELISA kiti ile LAT ve MAT'nin duyarlılıklarının karşılaştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Saha serum örnekleri: Bu çalışmanın materyalini İzmir İl'i ve çevresinde bulunan, solunum sistemi problemi gösteren, değişik yaş gruplarındaki (45-120. günler arası), beyaz BIG 6 ırkı 63 kümesteki 900 adet ticari hindiden alınan kan örnekleri oluşturmaktadır. Alınan kanlardan çıkarılan serumlar testler yapıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Standart suş: Dr. Y.M. Saif'den (Food Animal Health Research Program Wooster, Ohio A.B.D.) temin edilmiştir.

Deney hayvanları: Standart *B. avium* suşundan hiperimmünserum hazırlamak amacıyla Köy-Tür A.Ş.'den 5 adet bir günlük civciv temin edildi.

Kontrol serumları: Negatif kontrol serumu Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Pozitif kontrol serum (hiperimmünserum) hazırlanmasında Hafez ve Sting (8)'in *O. rhinotracheale* antiserumu hazırlamak için bildirdikleri yöntemin bir modifikasyonu kullanılmıştır.

Besiyerleri: Standart suş kullanılarak MAT ve LAT antijenlerinin hazırlanmasında % 7 koyun kanlı BHIA (Difco) ve BHIB (Difco) kullanılmıştır.

Rose Bengal boyası: MAT ve LAT'nde reaksiyonun daha iyi görülebilmesi amacı ile hazırlanan antijenlerin renklendirilmesi amacı ile kullanıldı. Antijenlerin her 100 ml'sine 1/100'lük boya solusyonundan 1 ml katıldı.

Ticari ELISA kiti: Ticari *B. avium* ELISA kiti (SYNBIOTICS®) kullanıldı. Test işlemi üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi.

Hiperimmünserum hazırlanması: Hafez ve Sting (8)'in *O. rhinotracheale* antiserumu hazırlamak için bildirdikleri yöntemin bir modifikasyonu kullanıldı. Bunun için Köy-Tür AŞ.'den beş adet 1 günlük Ross 308 broyler civciv temin edildi. Hayvanlar 30 günlük oldukları zaman ilk enjeksiyonları yapıldı. Bunun için enjeksiyondan önce kanları alınıp, ELISA ile *B. avium* yönünden antikor taşıyıp taşımadıklarına bakıldı. Dene- mede kullanılan tüm hayvanların *B. avium* antikorları yönünden negatif oldukları görüldü. Enjeksiyon antijenin

hazırlanması için standart *B. avium* suşu 48 saat BHIB'da aerobik koşullarda üretildi. Kanlı BHIA'da total canlı bakteri sayımı yapıldı ve hazırlanan canlı bakteri hücreleri 10⁸ cfu/ml/kanatlı olacak şekilde kanatlılara başlangıçta toplam 0.5 ml göz-buruna damlatma ve göğüs kasına batırma yöntemleri kullanılarak verildi. Hayvanlara on dört gün ara ile aynı yöntem ve sırasıyla toplam 1 ml ve 1.5 ml hazırlanan antijen, iki kez daha verildi. Her enjeksiyondan önce ve enjeksiyondan sonra kanları alındı ve üçüncü enjeksiyondan 14 gün sonra (hayvanlar 72 günlük oldukları zaman) tavuklar öldürülerek tüm kanları alınıp serumları ayrıldı, bu serumlar serolojik testlerde pozitif kontrol serum (hiperimmün serum, antiserum) olarak kullanıldı. Tüm serumlar testler yapıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

LAT antijeninin hazırlanması: *B. avium* LAT antijenin hazırlanması için Back ve ark. (1)'nin *O. rhinotracheale* lam aglutinasyon test antijeni hazırlamak için bildirdikleri yöntem kullanıldı. Bunun için standart *B. avium* suşu koyun kanlı BHIA'da 48 saat üretildi. Şekillenen koloniler bu sürenin sonunda distile su ile toplandı. Bu süspansiyon 3 saat 37 °C'de aerobik koşullarda bekletilerek içerisindeki son konsantrasyon % 0.8 olacak şekilde % 37'lik formalin'den 2.1 ml ilave edildi ve böylece inaktivasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra süspaniyon 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı döküldü ve pelet aynı miktarda distile su ile yeniden sulandırıldı. LAT için en uygun hücre konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacı ile hazırlanan antijenin iki katlı sulandırmaları yapıldı ve bu sulandırmalar daha önce hazırlanan *B. avium* antiserumu (pozitif serum) ile karşılaştırıldı. Pozitif serum ile belirgin aglutinasyon veren; ancak, negatif kontrol serumu ile reaksiyon vermeyen en düşük antijen dilusyonu lam aglutinasyon test antijeni olarak kullanıldı. Antijenin her 100 ml'sine 1/100 oranında dilue edilen Rose Bengal boyasından 1 ml konularak oluşan reaksiyonların gözle daha net bir şekilde takip edilmesi sağlandı.

MAT antijeninin hazırlanması: *B. avium* MAT antijenin hazırlanması için Burns ve ark. (5)'nin *B. bronchiseptica* MAT antijeni hazırlamak için bildirdikleri yöntemin bir modifikasyonu kullanıldı (5). Bunun için *B. avium* standart suşu BHIA'da 37°C'de 48 saat üretildikten sonra hücreler PBS (pH: 7.2) ile toplandı. Son konsantrasyonu % 0.25 olacak şekilde formalin ilave edilerek inaktivasyon için 37 °C'de bir gece bekletildi. Bu süspansiyon PBS ile 465 nm'de 1,2 OD olacak şekilde dilue edildi. Antijenin her 100 ml.'sine 1/100 oranında dilue edilen Rose Bengal boyasından 1 ml konularak oluşan reaksiyonların gözle daha net bir şekilde takip edilmesi sağlandı.

LAT'nin yapılışı: LAT için temiz bir lam üzerinde 25'er µl LAT antijeni ile aynı miktarda pozitif ve negatif

serum örnekleri karşılaştırıldı. Pozitif kontrol serumunda iki dakika içerisinde belirgin bir aglutinasyonun görülmesi pozitif, negatif kontrol serumunda homojen bir bulanıklığın görülmesi negatif olarak değerlendirildi. Oluşan reaksiyonun şiddeti aglutinasyon oranına göre gözle kuvvetli pozitif (+++), pozitif (++) , zayıf pozitif (+) ve negatif (-) şeklinde yorumlandı (1).

MAT'nin yapılışı: Mikroaglutinasyon Testi Burns ve ark.'nın (1993), bildirdikleri yöntemle yapıldı. Bunun için mikropleytin tüm gözlerine 50 µl PBS konuldu. Daha sonra pleytin ilk gözlerine 50 µl pozitif, 50 µl negatif olduğu bilinen kontrol serumları ve sonraki gözlerle de yine 50 µl saha serumları eklendi. Serumlar 1/2'den başlayarak 1. gözden 12. göze kadar çift katlı olarak sulandırıldı. Daha sonra tüm gözlerle hazırlanmış olan *B. avium* MAT antijeninden 50 µl eklendi. Pleyt hafifçe elle çalkalanarak, 37 °C'de 2 saat ve daha sonra da +4 °C'de bir gece inkube edildi. Ertesi gün sonuçlar gözle değerlendirildi. Değerlendirme; negatif gözlerde nokta oluşurken, pozitif gözlerde ise aglutinasyon reaksiyonu (dantelâ) görülmesi ile yapıldı (5).

Ticari *B. avium* ELISA'in yapılışı: SYNBIOTICS (KPL, Maryland, USA) marka ticari *B. avium* ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde standart prosedür kullanılarak gerçekleştirildi. Optik dansite (OD) BioTek ELx808 Marka ELISA Reader'da 405 nm'de okundu. Değerlendirme materyallerdeki pozitiflik oranının (Sample to Positive Ratio: S/P) belirlenmesi ile yapıldı. Kit üreticisi firmanın önerileri doğrultusunda S/P oranı 0.303'den (OD=0.263, Grup:1) büyük olan serum örneklerinin alındığı hindiler serolojik olarak *B. avium* antikorlarının varlığı yönünden pozitif olarak kabul edildi.

İstatistik analizler: ELISA standart test olarak kabul edildi, tüm testler iki yönlü olarak uygulandı. ELISA ile MAT ve LAT'leri arasında seropozitiflik görülme oranları McNemar testi ile ELISA ve diğer testler arasındaki uyum ise Kappa testiyle değerlendirildi (6, 14). Ayrıca sensitivite, spesifite, negatif prediktif değer (PV -), pozitif prediktif değer (PV +), doğruluk gibi parametreler de belirlendi.

Bulgular

ELISA sonuçları: ELISA sonuçlarına göre negatif kontrol serumu ile yapılan testte antikor titresine rastlanmamış olup, hazırlanan hiperimmünserum ile yapılan testte S/P oranı= 2.83 (OD: 1.90) olarak bulundu. İncelenen 900 adet saha serumunun 706'sı (% 78.4) negatif olarak belirlenirken, 194'ü (% 21.6) ELISA ile pozitif olarak bulundu. MAT'de en düşük titre olarak belirlenen 1/4 ve LAT'de zayıf pozitif (+) saha serumunun ELISA'da S/P oranı: 0.32 (OD: 0.37), MAT'de en yüksek titre olarak belirlenen 1/1024 titresine

sahip olan saha serumunun, LAT'de kuvvetli pozitif (+++), ELISA'da S/P oranının: 5.68 (OD: 2.12; Grup:14) olduğu belirlendi. İncelenen tüm pozitif serumlar dikkate alındığında, ticari ELISA ile titre grubu ortalama 7.5 (1–14 arası) olarak hesaplandı.

LAT'nin sonuçları: LAT'de negatif kontrol serumu ile yapılan testte antikora rastlanmamış olup, hazırlanan hiperimmünserum ile yapılan test pozitif (++) olarak belirlendi. İncelenen 900 adet saha serumunun 776'sı (% 86.2) negatif olarak tespit edilirken; 124'ü (% 13.8) LAT ile pozitif olarak bulundu. Pozitif olarak belirlenen 124 saha serumunun 24'ü kuvvetli pozitif (+++), 70'i pozitif (++) ve 30'u zayıf pozitif (+) şeklinde reaksiyon gösterdi.

MAT'nin sonuçları: MAT sonuçlarına göre negatif kontrol serumu ile yapılan testte antikor titresine rastlanmamış olup, hazırlanan hiperimmünserum ile yapılan testte titre 1/64 olarak belirlendi. İncelenen 900 adet saha serumunun 791'i (% 87.9) negatif olarak belirlenirken; 109'u (% 12.1) MAT ile pozitif olarak bulundu. Pozitif olarak belirlenen 109 saha serumunun 1/4 ile 1/1024 arasında farklı titrelerde oldukları tespit edildi. İncelenen tüm pozitif serumlar dikkate alındığında, MAT titresine ortalama 1/64 olarak belirlendi.

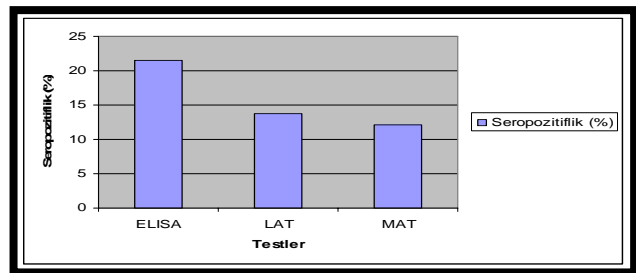
Test sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi: ELISA, LAT ve MAT ile incelenen toplam 900 hindi serumunun 194'ü ELISA ile (% 21.6), 124'ü (% 13.8) LAT ile, 109'u (% 12.1) ise MAT ile seropozitif olarak bulundu. ELISA, LAT, MAT'ne göre hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği Tablo 1'de; ELISA, LAT ve MAT'ne göre hindi serumlarında *B. avium* seropozitiflik oranlarının dağılımı Şekil 1'de verilmiştir.

Tablo 1. ELISA, LAT, MAT'ne göre hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği

Table 1. *B. avium* seropositivity in turkey sera according to ELISA, LAT, and MAT tests

TEST	Sayı (n/N)	Yüzde (%)
ELISA	194/900	21.6
LAT	124/900	13.8
MAT	109/900	12.1

n: Pozitif serum sayısı, N: İncelenen serum sayısı



Şekil 1. Testlere göre hindi serumlarında *B. avium* seropozitiflik oranlarının dağılımı
Figure 1. The distribution of *B. avium* seropositivity ratio in turkey sera according to tests

İncelenen hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden LAT ve MAT'nin ELISA'ya göre sensitivite, spesifite, negatif prediktif değer (PV -), pozitif prediktif değer (PV +), doğruluk ve kappa değerlerinin toplu sunumu Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışma bulguları
Table 2. Findings of the study

TEST	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	(PV-) (%)	(PV +) (%)	Doğruluk (%)	Kappa (%)	p
LAT	44.3	94.6	86.1	69.4	83.8	44.0	0.001
MAT	40.2	95.6	85.3	71.5	83.6	42.0	0.001

İncelenen 900 hindi serumunun 194'ü (% 21.6) ELISA pozitif, 124'ü (%13.8) LAT pozitif sonuç verdi. Her iki test pozitif 86 (% 9.6), negatif sonuç veren 668 (% 74.2), ELISA pozitif LAT negatif 108 (% 12.0), LAT pozitif ELISA negatif 38 (% 4.2) serum bulunmaktadır. Bu verilere göre, hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden, LAT'nin ELISA'ya göre sensitivitesi % 44.3; spesifitesi % 94.6 olarak hesaplandı. Çalışmada ELISA referans test olarak kabul edildiğinde LAT sonuçları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.001$). Ayrıca bu test ile ELISA arasında düşük derecede bir uyum elde edildi (kappa= % 44.0).

İncelenen 900 serumunun 194'ü (% 21.6) ELISA, 109'u (% 12.1) MAT pozitif sonuç verdi. Her iki test pozitif 78 (% 8.7), her iki test negatif 675 (% 75.0), ELISA pozitif MAT negatif 116 (% 12.9), ELISA negatif MAT pozitif sonuç veren 31 (% 3.4) serum bulunmaktadır. Bu verilere göre, hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden, MAT testinin ELISA'ya göre sensitivitesi % 40.2, spesifitesi % 95.6 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada ELISA testi referans test olarak kabul edildiğinde MAT sonuçları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Ayrıca bu test ile ELISA arasında düşük derecede bir uyum elde edildi (kappa= % 42.0).

Tartışma ve Sonuç

B. avium, genellikle hindi korizası olarak isimlendirilen "Bordetellozis" hastalığının etkenidir. Bordetellozis pek çok ülkede ekonomik önemi olan bir hastalık olduğu yapılan çalışmalar ile vurgulanmıştır (11,13,17, 18). Özellikle kanatlı hayvanlarda solunum sistemi patojenlerinin kısa sürede teşhis edilmesi ve buna yönelik tedaviye en kısa sürede başlanması hastalıktan ileri gelen ekonomik kayıpların önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda *B. avium*'a karşı oluşan antikorların tespitinde ELISA (2, 9, 12, 13, 17) Mikroaglutinasyon Testi (10,13) ve Lam Aglutinasyon Testi (19) gibi serolojik testler kullanılmıştır.

Bu araştırmanın amacı hindi yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı İzmir'de hindilerde *B. avium* antikorlarının seroprevalansının belirlenmesi olmamakla birlikte, yapılan serolojik testler sonucunda yöredeki seroprevalans de ilk kez bu kadar geniş kapsamlı araştırma ile % 21.6 olarak belirlenmiş oldu. Yapılan bir çalışmada, solunum sistemi hastalığı geçirmiş sürülerden bakteri izole edilememesine rağmen; *B. avium* antikorlarının serolojik olarak saptandığı bildirilmiştir (16). Hopkins ve ark. (9) Arkansas'ta yabani hindilerde ELISA ile % 95 oranında *B. avium* antikorlarını tespit etmişler, *B. avium*'un yabani hindiler için de önemli bir problem olabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı çalışmada, bir günlük yaşta kanatlılardaki maternal antikorları, deneysel veya doğal olarak infekte olmuş hindilerde serum antikorlarını (IgG) tespit edebilen bir ELISA kiti geliştirmişler ve çok sayıda serum çalışılan laboratuvarlar için kullanımı kolay, güvenilir bir metot olduğunu bildirmişlerdir.

Yurt dışında *B. avium* antikorlarının ELISA ile belirlendiği pek çok çalışma olmakla birlikte, (2, 9, 12, 17); Türkiye'de *B. avium* infeksiyonunun durumunun belirlenmesine yönelik olarak sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (13,18). Bu çalışmalardan ilki Ocak (13) tarafından gerçekleştirilmiştir. Ocak (13) çalışmasında Türkiye'de *B. avium* tarafından oluşturulan hindi rhinotracheitis hastalığına karşı şekillenen antikorların tespitinde ilk kez ELISA, IFAT ve MAT testlerini karşılaştırarak, hastalığın indirekt tanısında serolojik tekniklerin geçerliliklerini araştırmıştır. Hindi ve broyler olmak üzere toplam 1550 serumun incelendiği çalışmada ELISA ile % 22.9, MAT ile % 17.3 oranında seropozitiflik saptadığını bildirilmiştir. Böylece, Türkiye'de *B. avium* antikorlarının indirekt tanısına ilişkin ilk veriler bu çalışma ile elde edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise Aydın yöresinde ilk kez *B. avium* infeksiyonu yönünden hindilerin % 29.1'inin seropozitif olduğu tespit edilmiştir (18). Kanatlı hayvanlarda *B. avium* antikorları yönünden seropozitiflik görülme oranı materyallerin alındığı coğrafi bölgeye, kanatlı hayvan hareketlerinin yoğunluğuna, iklim gibi faktörlere göre farklılıklar gösterebilir. Nitekim yakın denebilecek bir coğrafya içerisinde gerçekleştirilmiş olan bu çalışmalarda *B. avium* yönünden seropozitiflik oranları aşağı yukarı birbirlerine benzer olarak belirlenmiştir.

Çalışmada ELISA referans test olarak kabul edilmiştir. ELISA ve MAT sonuçları karşılaştırıldığında, incelenen toplam 900 hindi serumunun 194'ü ELISA ile (% 21.6), 109'u (% 12.1) ise MAT ile seropozitif bulunmuştur. Bu verilere göre, hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden, MAT'nin ELISA'ya göre sensitivitesi % 40.2; spesifitesi % 95.6 olarak

hesaplanmıştır. Çalışmada ELISA ile MAT sonuçları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$) ayrıca bu test ile ELISA arasında düşük derecede bir uyum elde edilmiştir ($kappa= \% 42.0$). Tsai ve Saif (1991), yaptıkları çalışmada maternal ve oluşmuş antikorların tespitinde MAT'nin ELISA'dan daha az duyarlı olduğu da bildirilmiştir. Bu çalışma ile benzerlik gösteren başka bir çalışmada ELISA ile MAT sonuçları arasında istatistiksel olarak önemli farklılık olduğu ($p<0.001$), ancak iki test arasında yüksek derecede uyum ($\% 83.6$) olduğu bildirilmiştir (13). MAT'nin temel olarak IgM sınıfı antikorların, yani infeksiyonların akut dönemlerinin belirlenebildiği ve bakteriyel izolasyon ile oldukça uyumlu sonuçlar veren bir test olduğu bildirilmektedir (10). MAT ile ELISA arasında düşük korelasyon bulunması; ELISA'da esas olarak IgG'ler tespit edilirken MAT ile IgM'ler tespit edilmesi (7) ile açıklanabilir.

Yapılan çalışmalarda ortak olarak MAT sonuçlarının değerlendirilebilmesi için bir gece beklenilmesi, ELISA'nın MAT'ne göre daha kısa sürede (2.5 saatte) sonuç vermesi ve kullanım kolaylığı gibi nedenlerle ELISA'nın MAT'ne tercih edilebileceği bildirilmiştir (13,19). Yapılan bu çalışmada yine bir aglutinasyon testi olan LAT ile primer bağlanma testlerinden olan ELISA'nın spesifite ve sensitiviteyi karşılaştırılmıştır. İncelenen 900 hindi serumunun 194'ü ($\% 21.6$) ELISA pozitif, 124'ü ($\% 13.8$) LAT pozitif sonuç verirken; hindi serumlarında *B. avium* seropozitifliği yönünden LAT'nin ELISA'ya göre sensitivitesi $\% 44.3$; spesifitesi $\% 94.6$ olarak hesaplanmıştır. Çalışmada ELISA ile LAT sonuçları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$) ayrıca bu test ile ELISA arasında düşük derecede bir uyum elde edilmiştir ($kappa= \% 44.0$). Bu konu ile ilgili yapılmış fazla çalışma bulunmamakla birlikte, bizim çalışmamız ile çok benzerlik gösteren başka bir çalışmada (19) benzer bir şekilde her iki test arasındaki farklılık önemli bulunmakla birlikte ($p<0.001$), korelasyon $\% 66.0$; LAT'nin ELISA'ya göre sensitivitesi $\% 77.0$ olarak bildirilmektedir. Yapılan çalışmada incelenen 900 hindi serumunun 109'u ($\% 12.1$) MAT, 124'ü ($\% 13.8$) LAT'de pozitif olarak belirlenmiştir. Her iki test pozitif sonuç veren 92 ($\% 10.21$), negatif sonuç veren 759 ($\% 84.3$), MAT pozitif LAT negatif 17 ($\% 1.9$), LAT pozitif MAT negatif 32 ($\% 3.6$) serum bulunmaktadır. Bu verilere göre testler arasında yüksek derecede bir uyum elde edilmiştir. Yüksek derecedeki bu uyumun ve testler arasında önemli bir farklılık görülmemesinin nedeni her iki testin aglutinasyon testi olması ve primer olarak IgM sınıfı antikorları tespit etmesi şeklinde açıklanabilir (7).

Çalışmada İzmir İli'nde *B. avium* antikorlarının seroprevalansının yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu

nedenle, solunum sistemi hastalığı semptomu gösteren hindilerin, diğer patojenler ile birlikte *B. avium* açısından da incelenmesi gerektiği düşünülmektedir. MAT'nin geç sonuç vermesi nedeni ile pratik olmadığı, özellikle saha koşullarında akut infeksiyonların belirlenmesinde bir tüm hücre antijeni olan LAT'nin de oldukça kullanışlı olduğu, bununla birlikte serolojik olarak antikor yanıtının belirlenmesinde en duyarlı yöntemin ELISA olduğu sonucuna varılmıştır. Araştırma, yörede bordetellozis ile ilgili yapılacak bundan sonraki çalışmalar için bir ön araştırma niteliğindedir. *B. avium*'un sahadan izole edilmesi, izole edilen bu saha suşlarının antijenik yapılarının belirlenmesi, yine bu suşlardan faydalanılarak aşı çalışmalarının gerçekleştirilmesi, bu araştırmanın devamı olarak yapılabilecek diğer çalışmalardır.

Kaynaklar

1. **Back A, Halvorson G, Rajashekara G, Nagaraja VK** (1998): *Development of serum plate agglutination test to detect antibodies to Ornithobacterium rhinotracheale*. J Vet Diag Invest, **10**, 84–86.
2. **Barbour EK, Brinton MK, Torkelson 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.
3. **Barnes H J, Hofstad M S** (1977): *Turkey coryza: an emerging disease of young poults*. J Am Vet Med Ass, 1171–1174.
4. **Blackall PJ, Doheny CM** (1987): *Isolation and characterisation of Bordetella avium and related species and an evaluation of their role in respiratory disease in poultry*. Aust Vet J, **64**, 235–239.
5. **Burns EH, Norman JM, Hatcher MD** (1993): *Fimbriae and determination of host species specificity of Bordetella bronchicestica*. J Clin Microbiol, **31**, 1838–1844.
6. **Conover WJ** (1999): *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley Series, USA, 90-181.
7. **Diker K S** (1998): *İmmunoloji*. 294–298. Medisan Serisi, Ankara, Türkiye.
8. **Hafez HM, Sting R** (1999): *Investigation on different Ornithobacterium rhinotracheale "ORT" isolates*. Avian Dis, **43**, 1–7.
9. **Hopkins BA, Skeeles JK, Houghten GE, Story JD** (1988): *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for Bordetella avium*. Avian Dis, **32**, 353–361.
10. **Jacwood DJ, Saif YM** (1980): *Development and use of microagglutination test to detect antibodies to Alcaligenes faecalis in turkeys*. Avian Dis, **24**, 685–701.
11. **Lister SA, Alexander DJ** (1986): *Turkey rhinotracheitis*. Vet Bul, **56**, 637–663.
12. **Neighbor NK, Skeeles JK, Beasley JN, Kreider DL** (1991): *Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure antibody levels in turkey breeder hens, eggs and progeny following natural infection or immunization with a commercial Bordetella avium bacterin*. Avian Dis, **35**, 315–320.

13. **Ocak F** (2005): *Kanatlı hayvanlarda Bordetella avium'a karşı oluşan antikorların MAT, IFAT and ELISA teknikleri ile saptanması*. Erciyes Üniv Vet Fak Derg, **2**, 85–89.
14. **Özdamar K** (2001): *SPSS ile Bioistatistik*. Dördüncü baskı, Kaan Kitabevi, Ankara, Türkiye.
15. **Skeeles JK, Arp LH** (1998): *Turkey bordetellosis (coryza)*. 275-287, In: Disease of Poultry. BW Calnek, HJ Barnes, CW Beard, McDougald LR, Saif YM Jr (Eds), 10th ed. Iowa state University Press, Ames, Iowa, USA.
16. **Slavik MF, Skeeles JK, Memecke CF, Holloway L** (1981): *The involvement of Alcaligenes faecalis in turkeys submitted for diagnosis as detected by bacterial isolation and microagglutination test*. Avian Dis, **25**, 761–763.
17. **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**, 810–808.
18. **Türkyılmaz S, Kaya O** (2005): *Detection of antibodies Ornithobacterium rhinotracheale and Bordetella avium by enzyme-linked immunosorbent assay in hens and turkeys in Aydın province of Turkey*. Turk J Vet Anim Sci, **29**, 897–902.
19. **Türkyılmaz S, Türkyılmaz K, Kaya O** (2006): *A comparative study on detection of B. avium antibodies in turkeys by ELISA, SPAT and AGID tests*. Turk J Vet Anim Sci, **30**, 165–169.

Geliş tarihi: 30.01.2007 / Kabul tarihi: 19.03.2007

Yazışma adresi

Yrd. Doç. Dr. Süheyla Türkyılmaz

ADÜ. Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Aydın

e-mail: suhturkyilmaz@yahoo.com