

TAVUK TİFOSUNUN İNDİREKT TANISINDA PLATE TEST, ROSE BENGAL PLATE TEST, TÜP ve MİKROAGLUTİNASYON TESTLERİNİN KULLANILMASI

Ömer M. ESENDAL¹
Ömer AKAY²

Müjgan İZGÜR²
Oktay KESKİN³

The use of plate test, Rose Bengal plate test, macroscopic tube and microagglutination tests in the indirect diagnosis of fowl typhoid

Summary: *Fowl typhoid is one of the most important infectious diseases of poultry. This infection needs periodical monitoring procedures in detecting carriers, especially, in breeder flocks. Plate and macroscopic tube agglutination tests are commonly used in the indirect diagnosis of fowl typhoid.*

In this study, serum samples submitted to the Department of Microbiology of Veterinary Faculty, University of Ankara for diagnosis were examined by plate test antigen supplied from Pendik Animal Diseases Central Research Institute, and also by Rose Bengal plate test, macroscopic tube and microagglutination test antigens prepared in our laboratory. Among 146 serum samples examined, 80 and 57 were found positive by plate test and Rose Bengal plate test, respectively. In the macroscopic tube agglutination test, 14 sera showed titers between 1/12.5 and 1/400 whereas, 23 sera exhibited titers between 1/12.5 and 1/200 in the microagglutination test.

Özet: *Tavuk tifosu, kanatlı hayvanların önemli bir infeksiyöz hastalığıdır. Özellikle damızlık işletmelerde, portör kontrollerinin periyodik olarak yapılmasını gerektiren bu infeksiyonun indirekt tanısında, plate test ve yavaş tüp aglutinasyon testleri kullanılmaktadır.*

Bu çalışmada, sahadan toplanan tavuk kan serumları Salmonella yönünden Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan plate test antijeni ve laboratuvarında hazırlanan Rose Bengal plate test antijeni, tüp ve mikroaglutinasyon test antijenleri ile ayrı ayrı incelenmiştir. Test edilen 146 serumun 80'i plate test ile, 57'si ise Rose Bengal plate test ile pozitif bulunmuştur. Yine kullanılan 146 serumun 14'ü tüp aglutinasyon testinde 1/12.5-1/400 arası titre gösterirken, 23'ü de mikroaglutinasyon testinde 1/12.5-1/200 titre göstermiştir.

Giriş

Kanatlı hayvan sektörünü ve dolayısı ile yurt ekonomisini olumsuz yönde etkileyen hastalıkların başında gelen tavuk tifosu, öncelikle tavuk ve hindiler olmak üzere diğer evcil kanatlı hayvanlarda da görülebilen septisemik karakterde, akut ve kronik seyirli, infeksiyöz ve salgın bir hastalıktır (5, 7, 12).

Tavuk tifosunun etkeni *Salmonella gallinarum*'dur. *S. gallinarum*, *Salmonella* cinsi içinde "D" grubunda yer alan, Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz ve çomak şekilli bir mikroorganizmadır. *S. gallinarum*, aynı cinste bulunan *S. pullorum* ile birçok ortak morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve serolojik özelliklere sahiptir. *S. pullorum* ve *S. gallinarum*, başlangıçta iki farklı tür olarak tanımlanmışlardır, Kauffman-White sınıflandırmasında bu etkenler aynı türün farklı iki biyotipi olarak bildirilmişlerdir (5, 7, 8, 12). Her ikisi de hareketsiz olan *S. pullorum* ve *S. gallinarum*'da "O" somatik antijenik yapı 1,9,12 olup, 12'nin 12₁, 12₂ ve 12₃ ortak antijenleri vardır. Her iki etkende de varyant suşlar 12₃ faktörünü yüksek, 12₂'yi az oranda; standart suşlar ise 12₃ faktörünü az, 12₂ faktörünü ise yüksek oranda bulundurlar. Bu nedenle antijen için bu

1 Dr., AÜ Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

2 Prof. Dr. AÜ Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

3 Araş. Gör., AÜ Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

iki suşun birlikte kullanılması ile kanatlı hayvanlarda Pullorum hastalığı ve tavuk tifosunun serolojik taramaları yapılır (7, 8, 12). *S. pullorum* standart (S-) ve varyant (V-) suşların birlikte kullanılması bazı durumlarda, özellikle *E. coli* infeksiyonlarından sonra veya başta *S. enteritidis* ve *S. berta* olmak üzere diğer invaziv "D" grubu *Salmonella* serotipleri ile non-spesifik reaksiyonların ortaya çıkmasına neden olur. Bu tip reaksiyonların nedeni bazı araştırmacılara göre somatik 12₂ faktörüdür (6, 8, 15, 19).

Özellikle yetişkin tavuklarda yeşil renkli bir ishal ile karakterize olan tavuk tifosunun bir kümes içinde yayılmasında ve bir nesilden diğerine geçmesinde, dolayısı ile devamlılığının sürmesinde, hastalıktan kurtulmuş portör hayvanlar önemli bir rol oynarlar (5, 7, 12). Böyle portör hayvanlar dışkı ve yumurtaları ile mikrop çıkararak kuluçka raflarını ve kümesleri kontamine ederler. Hastalığın kontrol altına alınmasında ve eradikasyon programlarının başarılı bir şekilde yürütülebilmesinde, sürü içindeki kronik portör hayvanların belirlenerek ayıklanmaları ve imha edilmeleri stratejik bir önem taşımaktadır (5, 6, 12, 19).

Tavuk tifosunun laboratuvar teşhisi direkt olarak, kültürel ve indirekt olarak da serolojik yöntemlerle yapılmaktadır. Günümüzde tavuk ve hindilerde *S. pullorum* ve *S. gallinarum* infeksiyonlarının saha taramalarında ve infekte hayvanların indirekt teşhisinde en geçerli olan serolojik yöntemlerin başında; lamda kan ve serumla yapılan çabuk aglutinasyon reaksiyonları gelmektedir (5, 6, 8, 13, 14). Diğer tekniklerden tüp aglutinasyon yöntemi (5, 13, 19) ve bunun bir modifikasyonu olan mikroaglutinasyon tekniği de (8, 18, 21) infekte hayvanların teşhisi amacıyla spesifik aglutininlerin saptanmasında kullanılmaktadırlar (21, 22). Farklı yaş gruplarındaki hayvanlarda şekillenen spesifik antikor yanıtlarını plate ve mikroaglutinasyon testleri ile araştıran Bourhy ve ark. (8), çok genç hayvanların serolojik olarak teste tabî tutulmalarının yararsız olacağını, hayvanlar ancak 10-12 haftalık olduklarında infeksiyona karşı önemli düzeyde bir antikor yanıtının şekilleneceğini bildirmişlerdir. Thaxton ve ark. (18), inaktive *S. pullorum* süspansiyonlarının i.v. inokülasyonundan sonra tavuklarda deneysel olarak meydana getirdikleri aglutininlerin ortaya konulması için mikroaglutinasyon tekniğini kullanmışlardır. Araştırmacılar, tüp aglutinasyon testini mikroaglutinasyon testi ile karşılaştırdıklarında, her iki testle elde edilen titrelerin uyum gösterdiğini açıklamışlardır. Williams ve Whittemore (21), yaptıkları benzer bir çalışmada, tavuklarda Pullorum hastalığı ve tavuk tifosu portörlerinin saptanması için tetrazolium ile boyanmış *S. pullorum* antijenini mikroaglutinasyon testinde uygulamışlar ve testi tüp aglutinasyon testi ile karşılaştırarak her iki testle elde edilen titrelerin birbirlerine paralellik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Portörleri saptamada mikroaglutinasyon ve tüp aglutinasyon testleri-

ni eşit düzeyde geçerli bulan araştırmacılar aynı zamanda, mikroaglutinasyon testinin non-spesifik aglutininlerden fazla etkilenmediğini de ortaya koymuşlardır. Minga ve Wray (13), plate test ile 1 dak.'dan sonra şekillenen reaksiyonların şüpheli kabul edileceğini; tüp aglutinasyon testinde ise 1/40 ve daha yüksek titrelerin pozitif, 1/20 titrenin şüpheli ve 1/20'nin altındaki titrelerin de negatif olarak değerlendirileceğini açıklamışlardır. Aynı çalışmada, araştırmacılar, *S. enteritidis* ile aşılı hayvanlardaki antikorları saptamada plate test, tüp aglutinasyon ve ELISA yöntemleri arasında büyük bir fark tesbit edememişlerdir. Benzer şekilde *S. enteritidis* ile araştırma yapan Chart ve ark. (9), kültür pozitif tavuk sürülerinin saptanmasında ELISA yönteminin tek başına yeterli ve güvenilir olmayacağını aksine, kan ile yapılan plate testinin daha kesin sonuç verdiğini, daha ucuz ve kolay uygulanabilir bir test olduğunu ve kümes koşullarında dahi kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. Waltman ve Home (19), inceledikleri 134171 serum örneğinden 680'ini (%0.51) tüp aglutinasyon testi ile pozitif bulmuşlar ve bu serum örneklerinin alındığı hayvanların 226'sından (%33.2) *Salmonella* izolasyonu yapmışlardır. Serolojik testlerin yanlış pozitif sonuçlar verebileceklerini bildiren araştırmacılar, serolojik testlerin aynı zamanda *S. pullorum* ve *S. enteritidis* yönünden doğrulanmaları için reaktör hayvanların veya sürülerin bakteriyolojik yönden de incelenmelerinin zorunluluğunu ortaya koymuşlardır. Gast ve Beard (10) *S. enteritidis* ile deneysel infeksiyon oluşturdukları yumurtacı tavuklarda oluşan spesifik antikor yanıtını *S. pullorum* ve *S. enteritidis*'den hazırladıkları antijenlerle plate, tüp ve mikroaglutinasyon testleriyle incelemişler ve her üç test ile de seropozitif hayvanları etkin bir şekilde identifiye ettiklerini ve testler arasında duyarlılık bakımından fazla bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *S. enteritidis* antijeni ile elde edilen ortalama mikroaglutinasyon titrelerinin, *S. pullorum* antijeni ile elde edilenlere oranla daha yüksek olduğunu ve *S. pullorum* antijeninin kullanılmasi ile plate testte oluşabilecek non-spesifik reaksiyonların en aza indirildiğini ortaya koymuşlardır.

Alton ve ark. (1) tarafından hayvanlardaki Brucellosis infeksiyonunun indirekt teşhisi için bildirilen ve düşük pH'lı antijen kullanımından dolayı IgM sınıfı antikorları elimine ederek sadece serumdaki IgG sınıfı antikorların varlığını ortaya koyan Rose Bengal plate testi, Sanchis ve Abadie (16) tarafından, aynı prensip ile koyunlardaki *S. abortus ovis* infeksiyonunun serolojik teşhisinde başarı ile kullanılmıştır. İnfekte, sağlıklı ve aşılı koyunlardan temin ettikleri serumlarla, Rose Bengal plate test ve tüp aglutinasyon testlerini karşılaştıran araştırmacılar, Rose Bengal plate testinin epidemiyolojik çalışmalarda ve tüp aglutinasyon testinin de koyunlardaki *S. abortus ovis* infeksiyonlarının serolojik teşhisinde iyi sonuçlar verdiklerini açıklamışlardır.

Yapılan bu çalışmada, tavuk tifosunun indirekt teşhisinde ve ayrıca portör hayvanların saptanmasında rutin olarak kullanılan plate test ve tüp aglutinasyon testlerinin yanısıra, tüp aglutinasyon testinin bir modifikasyonu olan mikroaglutinasyon testi ile birlikte *S. abortus ovis* infeksiyonunun teşhisi için geliştirilmiş olan Rose Bengal plate testinin de (16) denenmesi ve bu testlerin pratikteki önemlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Serumlar

Test serumları: Çalışmada, AÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na teşhis amacıyla getirilen toplam 146 adet tavuk serumu incelenmiştir.

Standart serumlar: Çalışmada, *S. pullorum* standart (S-) ve varyant (V-) suşlarıyla hiperimmünize edilen iki adet tavuğun serumları pozitif kontrol ve ayrıca plate test ve tüp aglutinasyon test sonuçları negatif olan iki adet tavuğa ait serumlar da negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Antijenler

Plate test antijeni: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından hazırlanmış olan kristal viyole ile boyalı *S. pullorum* plate test antijeni kullanılmıştır.

Rose Bengal plate test antijeni: Bu antijen, Sanchis ve Abadie'nin (16) bildirdikleri yöntemle hazırlanmıştır. Bu amaçla *S. pullorum* S- ve V- suşları 37°C'de 18 saat süreyle üretilerek 3 kez yıkanmış, süzülmuş ve PBS içinde %12.5 olacak şekilde süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 56°C'de 1 saat süreyle inaktive edildikten sonra üzerine hacmi kadar PB S ilave edilmiş ve final konsantrasyonu %6 olacak şekilde, %1'lik Rose Bengal boyasından katılarak +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Süre sonunda süspansiyon süzülerek santrifüje edilmiş ve 0.4 M tris maleat tamponu (20) ile yıkanarak yine aynı tampon içinde final konsantrasyonu %6 olacak şekilde sulandırılmıştır.

Tüp aglutinasyon antijeni: Bu antijen, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü'nün "Kanatlıların Pullorum ve Tifüs Gallinarum Hastalığı Mücadele Yönetmeliği"ne (2) göre hazırlanmıştır. *S. pullorum* S- ve V- suşlarının Nutrient buyyondaki kültürlerinden Roux şişelerinde hazırlanan Nutrient agara 2-6 ml miktarında ekilerek yüzeyin kültürü emmesi için 2 saat 37°C'de bekletilmiş ve besi yerleri ters çevrilerek 37°C'de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, üreme %0.5 fenollü FTS ile toplanmış, 3 kez yıkanmış ve antijenin yoğunluğu fenollü FTS ile McFarland No 1'e, pH'sı ise 1/10 N NaOH ile 8.0'e ayarlanmıştır.

Mikroaglutinasyon antijeni: Bu antijen, Williams ve Whittemore'un (22) bildirdikleri yöntemle hazırlanmıştır. *S. pullorum* S- ve V- suşları 200 ml TSB'e üretilmiştir. Daha sonra, içinde 2000 ml buyyon bulunan erlenmayere kültürün tümü ekilmiş ve belirli zaman aralıkları ile çalkalanarak 37°C'de 6 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, kültüre 100 ml %0.5'lik trifenil tetrazolium klorid (TTC) katılmış ve 30 dak süreyle mikroorganizmaların boyanması sağlanmıştır. Boyama işleminden sonra kültüre %0.5 formol katılarak 37°C'de 2 saat süreyle inaktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben kültür, FTS ile 3 kez yıkanmış ve son yıkamadan sonra içinde %0.5 formol içeren 200 ml FTS ile süspansiyon edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan antijenin konsantrasyonu yaklaşık olarak McFarland No 3'e ayarlanmıştır (5-8 x 10⁸/ml).

Plate testi (PT): Bir damla şüpheli serum ile bir damla boyalı plate test antijeni lam üzerinde karıştırılmış ve 2 dak içinde meydana gelen aglutinasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir (3).

Rose Bengal plate testi (RBPT): Bu testte, 30 µl antijen ile 30 µl şüpheli serum lam üzerinde karıştırılmış ve 4 dak içinde meydana gelen aglutinasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir (16).

Tüp aglutinasyon testi (TAT): Bu testte, şüpheli serumun 1/12.5'tan başlamak üzere 1 ml içinde iki katlı sulandırmaları yapılmıştır. Bu amaçla birinci tüpe 1 ml FTS ve 0.04 ml serum, diğer tüplere ise 0.5 ml FTS konularak birinci tüpten 0.5 ml ikinci tüpe aktararak sulandırma yapılmıştır. Sulandırmaların üzerine eşit miktarda (0.5 ml) tüp aglutinasyon antijeninden eklenerek tüpler 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüpün dibinde dantela tarzında çöküntü ve üst sıvıda da berraklık görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (21). Aynı işlemler testte kullanılan pozitif ve negatif kontrol serumları ile de yapılmıştır ve sonuçların değerlendirilmesinde kriter olarak, meydana gelen reaksiyonlar dikkate alınmıştır.

Mikroaglutinasyon testi (MAT): Bu test, Williams ve Whittemore'un (21) bildirdikleri yöntemle mikroplate'lerde yapılmıştır. Bir tüpte 1000 µl FTS ve 40 µl şüpheli serum karıştırılmış ve bu karışımdan 100 µl alınarak mikroplate'in birinci gözüne konulmuştur. Mikroplate'in diğer gözlerine ise 50 µl FTS konularak, birinci gözden 50 µl aktarılmak suretiyle serumun iki katlı sulandırmaları yapılmıştır. Sulandırmaların üzerine 50 µl TTC boyalı mikroaglutinasyon antijeni damlatılarak mikroplate'in üzeri adhesiv bantla kapatılmış ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda mikroplate çukurlarının dibinde meydana gelen dantela tarzındaki çöküntüler kontrol serumları ile karşılaştırılarak değerlendirilmeleri yapılmıştır.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan tavuk serumlarının PT, RBPT, TAT ve MAT sonuçları.
Table 1: PT, RBPT, SAT and MAT results of chicken sera examined in the study.

İncelenen serum sayısı	Serolojik testler							
	PT		RBPT		TAT		MAT	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)*	(-)	(+)*	(-)
146	80 (54.79)**	66 (45.21)	57 (39.04)	89 (60.96)	14 (9.59)	132 (90.41)	23 (15.75)	123 (84.25)

*: TAT ve MAT testlerinde titre veren serum sayıları

** : Yüzde oranı

Tablo 2: Test edilen tavuk serumlarının TAT ve MAT titreleri.

Table 2: SAT and MAT titers of chicken sera tested.

	Negatif	Titre					
		1/12.5	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400
TAT	132*	3	6	3	-	-	2
MAT	123	4	6	11	1	1	-

*: Serum sayısı

Tablo 4: TAT ve MAT pozitif bulunan serumların PT ve RBPT sonuçları.

Table 4: PT and RBPT results of sera found positive in SAT and MAT.

Serolojik testler		
TAT (+)	PT(+)	RBPT (+)
11*	11	9
MAT (+)	PT (+)	RBPT (+)
19	19	10

*: Serum sayısı

Tablo 3: Pozitif kontrol serumlarının TAT ve MAT titreleri.
Table 3: SAT and MAT titers of positive control sera.

	Haftalara göre titre							
	1. Hafta		2. Hafta		3. Hafta		4. Hafta	
	TAT	MAT	TAT	MAT	TAT	MAT	TAT	MAT
1. Hayvan	2/200	1/100	4/200	1/400	4/200	1/400	4/200	1/400
2. Hayvan	2/200	1/400	4/200	1/400	KESİLDİ			

*: TAT ve MAT testlerinde titre veren serum sayıları

** : Yüzde oranı

Bulgular

Plate test (PT) sonuçları: İncelenen toplam 146 tavuk serumunun 80'i (%54.79) plate testte pozitif ve 66'sı (%45.21) ise negatif bulunmuştur (Tablo 1).

Rose Bengal plate test (RBPT) sonuçları: Toplam 146 adet tavuk serumunun Rose Bengal plate test ile 57'si (%39.04) pozitif ve 89'u (%60.96) negatif bulunmuştur (Tablo-1).

Tüp aglutinasyon test (TAT) sonuçları: Toplam 146 adet test serumunun tüp aglutinasyon testi ile incelenmesi sonucunda 14'ü (%9.59) titre gösterirken 132'si (%90.41) titre vermemiştir (Tablo 1). Titre gösteren 14 serumdan 11'i (%78.57) pozitif (1/25 ve üstü titre) ve 3'ü (%21.43) negatif bulunmuştur (Tablo-2). TAT'da pozitif kontrol olarak kullanılan, hiperimmunize edilmiş iki adet tavuğa ait serumlarla da 2/200-4/200 arasında titreler elde edilmiştir (Tablo-3).

Mikroaglutinasyon test (MAT) sonuçları: Toplam 146 adet test serumunun mikroaglutinasyon testi ile incelenmesi sonucunda 23'ü (%15.75) titre gösterirken 123'ü (%84.25) titre vermemiştir

(Tablo-1). Titre gösteren 23 serumdan 19'u (%82.61) pozitif (1/25 ve üstü titre) ve 4'ü (%17.39) negatif bulunmuştur (Tablo-2). MAT'da pozitif kontrol olarak kullanılan hiperimmunize edilmiş iki adet tavuğa ait serumlarla da 1/100-1/400 arasında titreler elde edilmiştir (Tablo-3).

Tüp aglutinasyon ve mikroaglutinasyon pozitif sonuç veren serumların plate ve Rose Bengal plate test sonuçları karşılaştırıldığında ise; tüp aglutinasyon pozitif 11 serumdan tümü (%100) plate test ile de pozitif bulunurken, 9'u (%81.82) Rose Bengal plate test ile pozitif olarak saptanmıştır. Benzer şekilde mikroaglutinasyon pozitif 19 serumdan tümü (%100) plate test ile de pozitif bulunurken, 10'u (%52.63) Rose Bengal plate test ile pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo-4).

Tartışma ve Sonuç

S. gallinarum tarafından meydana getirilen tavuk tifosu, başta tavuk ve hindiler olmak üzere diğer evcil kanatlı hayvanlarda da görülebilen septisemik karakterde, akut ve kronik seyirli, infeksiyöz ve salgın bir hastalıktır (5, 7, 12).

Hastalığın laboratuvar teşhisi direkt olarak, kültürel ve indirekt olarak da serolojik yöntemlerle yapılabilir. Direkt teşhis yönteminde hastalıktan şüpheli hayvanların kalp kanı, karaciğer, dalak ve kemik iliklerinden genel ve özel (selektif ve diferensiyel) besi yerlerine ekimler yapılarak, kültürler 37°C'de 24-48 saat inkübe edilirler. İnkübasyon sonunda üreyen koloniler morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve serolojik olarak *S. gallinarum* yönünden değerlendirilirler (5, 11, 12). Hastalığın indirekt teşhisinde ise, hayvanların kan serumlarında oluşan spesifik antikorların varlığını ortaya koyan, lamda kan ve serum ile yapılan plate test ve serumla yapılan tüp ve mikroaglutinasyon testleri kullanılmaktadır (5, 6, 8, 13, 18, 19, 21).

Tavuk tifosunun kontrolü için birçok yöntem kullanılabilir. Bunlardan, damızlık tavuk sürülerinin 9R suşundan hazırlanan attenüe aşılara aşılanmaları ve furazolidon gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin yemlerle birlikte hayvanlara verilmesi infeksiyonun ve mortalitenin azalmasında etkili olabilir (4, 12). Ancak, 9R suşunun bazı tavuk ırkları için virulens göstermesi ve yemle birlikte uzun süre hayvanlara antibiyotik verilmesinin de dirençli mutant suşların ortaya çıkmasına neden olmasından dolayı, bu iki yöntemin pratikteki kullanımları kısıtlanmaktadır. Tavuk tifosunun koruma ve kontrolünde uygulanan en etkin yöntem, iyi bir bakım ve beslenme ile birlikte eradikasyon programlarının beraber yürütülmesidir. Eradikasyon programları ise, serolojik olarak infekte sürülerin belirlenmesi ve bireysel reaktör hayvanların ayıklanarak elimine edilmesi ile gerçekleştirilir. Tavuk tifosunda genellikle, serolojik teşhis yöntemleri tercih edilir. Çünkü, *S. gallinarum* diğer *Salmonella* serotiplerinin aksine dışkıda fazla miktarda bulunmaz. Oral infeksiyonu takiben, etken yüksek oranda invazyon gösterir ve kan dolaşımında şekillenen antikorlar serolojik yöntemlerle kolaylıkla saptanır (6).

Bourhy ve ark. (8), spesifik antikorları belirlemede, mikroaglutinasyon testinde yüksek bir duyarlılık saptarken, plate testte daha az bir duyarlılık bulmuşlardır. Mikroaglutinasyon testinde *S. gallinarum* S- ve V- suşlarının birlikte kullanılması ile antijen duyarlılığının arttığını açıklayan araştırmacılar, plate testin özellikle 56 haftalık yetişkin hayvanlarda oldukça duyarlı çalıştığını ve 1/4 serum sulandırmasının bu testte non-spesifik reaksiyonları elimine etmede faydalı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Thaxton ve ark. (18), mikroaglutinasyon tekniği ile inceledikleri tavuk serumlarında 1/8-1/512 arasında titreler saptamış ve TAT ile benzer titreler elde edilmesine karşın teknikte TAT'a oranla çok daha az miktarlarda reaktif ve serum kullanıldığını ve titrelerin çok daha kolay saptanabildiğini açıklamışlardır. Williams ve Whittemore (21), doğal infekte tavuk serumlarında TAT ve mikroaglutinasyon teknikleri ile 1/100-1/1600 arasında antikor titreleri saptamışlar ve mikroaglutinasyon testinin; zaman, kullanılan

alan ve maliyet yönünden tüp aglutinasyon testinden daha ekonomik olduğunu, bu nedenle de daha çok tercih edilen bir teknik olduğunu vurgulamışlardır. Minga ve Wray (13), saha taramalarında kullanılan plate testinin duyarlılığının az olduğunu ve deneyimsiz kişiler tarafından yanlış pozitif veya yanlış negatif değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir. Waltman ve Horne (19), tüp aglutinasyon testi ile pullorum-tifo yönünden inceledikleri 134171 serum örneğinden 680 (%0.51) adedini pozitif saptamışlardır. Serolojik olarak pozitif saptanan 680 hayvanın 226'sından (%33.24) "D" grubu *Salmonella* izole ettiklerini açıklamışlardır. Çalışmada incelenen toplam 146 tavuk serumundan 80'i plate test ile pozitif bulunurken, 14'ü tüp aglutinasyon ve 23'ü de mikroaglutinasyon testi ile titre göstermiştir. Tüp aglutinasyon testinde titre gösteren 14 serumdan 3'ü negatif (1/12.5), 11'i pozitif (1/25≤); mikroaglutinasyon testinde titre gösteren 23 serumdan da 4'ü negatif (1/12.5) ve 19'u pozitif (1/25≤) olarak değerlendirilmiştir (2). Nonspesifik reaksiyonlardan fazlaca etkilenebilen plate test (6, 8, 15, 19) sonuçları tüp ve mikroaglutinasyon test sonuçları ile karşılaştırıldığında, bu yüksek pozitiflik oranının *S. gallinarum* infeksiyonu ile ilişkili olmadığı, serumda diğer bakteriyel etkenlere karşı şekillenmiş antikorların varlığından kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Tüp ve mikroaglutinasyon titreleri karşılaştırıldığında ise, infekte hayvanların belirlenmesinde her iki test arasında büyük bir fark bulunamamıştır. Araştırmacılar tarafından diagnostik düzey olarak kabul edilen 1/25 serum sulandırmasında (2, 21) her iki test arasında %100 bir korelasyon bulunurken, saptanabilen yegane önemli fark, 1/50 serum sulandırmasında tüp aglutinasyon testinde 3, mikroaglutinasyon testinde ise 11 hayvanın titre vermiş olmasıdır. Saptanan bu farkın, Williams ve Whittemore'un (21) da bildirdikleri gibi, mikroaglutinasyon testinde daha konsantre bir antijen kullanılması ve antijenin, tüp aglutinasyon antijeninin aksine boyalı olmasından ileri geldiği kanısına varılmıştır. Testte 1/25 serum sulandırmasından sonra azalan antikor titresi boyasız antijenle uygulanan tüp aglutinasyon testinde gözden kaçabilirken, boyalı antijenle uygulanan mikroaglutinasyon testinde daha etkin bir şekilde saptanabilmektedir.

Koyunlardaki *S. abortus ovis* infeksiyonunun serolojik teşhisinde Rose Bengal plate test ve tüp aglutinasyon testlerini karşılaştıran Sanchis ve Abadie (16), inceledikleri 2343 şüpheli koyun serumundan 896 (%38.24) adedini Rose Bengal plate test ile pozitif olarak saptarlarken, mikroaglutinasyon testi ile 352 (%15.02) adedinin pozitif (1/640≤), 241 (%10.29) adedinin şüpheli (1/320) ve 303 (%12.93) adedinin de negatif (1/160≥) olarak değerlendirildiğini, infeksiyon sonrası 10-15. günde pike çıkan (1/5120) ve 90. günde bile mikroaglutinasyon testi ile diagnostik düzeyin (1/640) üzerinde bulunan spesifik antikorların (17) Rose Bengal plate testte daha uzun bir süre ile saptana-

bildiklerini bildirmişlerdir. İncelenen toplam 146 tavuk serumundan 57'si Rose Bengal plate test ile pozitif bulunmuştur. Düşük pH'lı antijen kullanımına bağlı olarak serumdaki IgM sınıfı antikorları inaktive eden ve sadece IgG sınıfı antikorların varlığını ortaya koyan Rose Bengal plate testi, *S. gallinarum* ile infekte hayvanların belirlenmesinde standart plate teste oranla daha duyarlı bulunmuştur. Plate test ve Rose Bengal plate test ile tüp ve mikroaglutinasyon testleri karşılaştırıldığında, infekte hayvanların saptanmasında plate test ile pozitif korelasyon saptanırken, Rose Bengal plate test ile daha az sayıda hayvan pozitif olarak değerlendirilmiştir. Tüp aglutinasyon testinde pozitif saptanan 11 hayvanın tümü plate test ile de pozitif bulunurken, 9'u Rose Bengal plate test ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde mikroaglutinasyon testinde pozitif saptanan 19 hayvanın tümü plate test ile de pozitif bulunurken, 10'u Rose Bengal plate test ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, özellikle kronik infekte ve portör hayvanların saptanmasında Rose Bengal plate testinin daha duyarlı çalıştığı sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Yurdumuzda damızlık kümeslerin *S. pullorum* ve *S. gallinarum* yönünden kontrolleri, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerinin Sağlık Kontrol Yönetmeliği (3) uyarınca, 4 aylıktan büyük ve aşılınmamış hayvanlardan ve kümesin en az %5'inden alınan kan örneklerinin çabuk kan aglutinasyon, çabuk serum aglutinasyon ve yavaş tüp aglutinasyon testleriyle incelenmesi şeklinde uygulanmaktadır. Bu yönetmeliğe göre, kan ve serumla yapılan çabuk aglutinasyon testinde 2 dakika içinde meydana gelen aglutinasyon ve yavaş tüp aglutinasyon testinde de 1/40 ve daha yüksek titrelerdeki reaksiyonlar pozitif olarak değerlendirilir ve bireysel reaktör hayvanlar imha edilir (3). Ancak, araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, yurdumuzda halen yürürlükte olan yönetmeliğe göre (3) uygulanan 1/40 diagnostik serum titresinin, teşhis laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan tüp aglutinasyon testi ile yanlış değerlendirilebileceği ve infekte hayvanların gözden kaçabileceği endişesi ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak, *S. gallinarum* infeksiyonunun serolojik tanısında ve kronik infekte hayvanlarla portörlerin saptanmasında rutin olarak kullanılan plate test ve tüp aglutinasyon testlerinin yanısıra, tüp aglutinasyon testinin bir modifikasyonu olan mikroaglutinasyon testi ile birlikte Rose Bengal plate testinin de kullanılmasının, infeksiyonun saptanmasında ve kontrol programlarının daha sağlıklı yürütülmesinde olumlu olacağı kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E. (1975). *Laboratory techniques in brucellosis*. World Health Organization. Geneva.

2. Anon. (1962). *Kanatlıların Pullorum ve Tifus Gallinarum Hastalığı Mücadele Yönetmeliği*. Tarım Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü, Ongun Kardeşler Matbaası, Ankara.
3. Anon. (1990). *Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerinin Sağlık Kontrol Yönetmeliği*. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Lalahan, Ankara.
4. Arda, M., Akay, Ö., Aydın, N. ve İzgür, M. (1983). *Tavuk tifosuna karşı etkin bir aşı hazırlanması üzerinde araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 30:420-429.
5. Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö. ve İzgür, M. (1994). *Kanatlı hayvan Hastalıkları*, s.76-79, Medisan Yayınevi, Ankara.
6. Barrow, P.A., Berchleri, A. and Al-Haddad, O. (1992). *Serological response of chickens to infection with Salmonella gallinarum-S. pullorum detected by enzyme-linked immunosorbent assay*. Avian Dis., 36:227-236.
7. Başkaya, H. ve Minbay, A. (1981). *Kümes Hayvanları Hastalıkları*. İkinci Baskı, A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayın No:379, Ders Kitabı: 227, s.55-58, AÜ Basımevi, Ankara.
8. Bourhy, H., Guittet, M., L'Hospitalier, R., Benne-jean, G., Morin, M., LeCoq, H. et Morin, Y. (1988). *Diagnostic serologique de l'infection a Salmonella gallinarum pullorum. Etude comparative de la sensibilité et de la spécificité des tests d'agglutination rapide sur lame et de microagglutination lente chez des poulets de différents âges*. Rec. Méd. Vét., 164:213-220.
9. Chart, H., Rowe, B., Baskerville, A. and Humphrey, T.J. (1990). *Serological analysis of chicken flocks for antibodies to Salmonella enteritidis*. Vet. Rec., 127:501-502.
10. Gast, R.K. and Beard, C.W. (1990). *Serological detection of experimental Salmonella enteritidis infections in laying hens*. Avian Dis., 34:721-728.
11. Hinz, K.H., Glünder, G., Rottmann, S. und Friederichs, M. (1989). *Über Salmonella gallinarum-Feldisolate der Biovar Pullorum und Gallinarum*. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 102:205-208.
12. Jordan, F.T.W. (1990). *Fowl Typhoid*. In: Poultry Diseases. 3 rd ed. Jordan, F.T.W. ed. Bailliere Tindall. Cambridge University Press. pp. 17-21.
13. Minga, U.M. and Wray, C. (1992). *A disc ELISA for the detection of salmonella group D antibodies in poultry*. Res. Vet. Sci., 52:384-386.
14. Nicholas, R.A.J., Cullen, G.A. and Duff, P. (1990). *Detection of salmonella*. Vet. Rec., 126:147.
15. Papageorgiou, C., Valette, L., Beranger, G. et Joubert, L. (1968). *Spécificité, fidélité et sensibilité des antigènes pulloriques de dépistage*. Bull. Acad. Vet., 90:107-117.
16. Sanchis, R. et Abadie, G. (1990). *Utilisation d'un antigène coloré au Rose Rengal pour le sérodiagnostic de la salmonellose ovine. Comparaison avec la technique de séroagglutination*. Rec. Méd. Vét., 166:431-436.
17. Sanchis, R., Polveront, G. et Pardon, P. (1985). *Sérodiagnostic de la salmonellose abortive des brebis a Salmonella abortus ovis. Microtechnique de séroagglutination*. Bull. Lab. Vet., 19/20:45-51.
18. Thaxton, P., Williams, J.E. and Siegel, H.S. (1970). *Microtitration of Salmonella pullorum agglutinins*. Avian Dis., 14:813-816.
19. Waltman, W.D. and Horne, A.M. (1993). *Isolation of Salmonella from chickens reacting in the pullorum-typhoid agglutination test*. Avian Dis., 37:805-810.
20. Williams, C.A. and Chase, M.W. (1968). *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Vol. II. Physical and Chemical Methods. Academic Press.
21. Williams, J.E., and Whittemorfe, A.D. (1971). *Serological diagnosis of pullorum disease with the microagglutination system*. Appl. Microbiol., 21:394-399.
22. Williams, J.F., and Whittemore, A.D. (1973). *Avian Salmonella stained microtest antigens produced on solid media*. Appl. Microbiol., 26:1-3.