

Tavuklarda Salmonella Enteritidis Antikorlarının Serum ve Yumurta Sarısında ELISA ile Saptanması

Gülay ALTAY

A.İ.B.Ü., Mudurnu Meslek Yüksekokulu, Mudurnu, Bolu - TÜRKİYE

Hakan YARDIMCI

A. Ü., Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 26.10.2000

Özet: Adapazarı, Afyon, Ankara ve Konya illerindeki toplam 11 yumurtacı ve damızlık işletmeye ait değişik yaş ve ırklardaki tavuklardan 473 serum ve 430 yumurta alındı. ELISA'nın standardizasyonunda LPS, HE ve flagella antijenleri denendi ve saha örneklerinin değerlendirilmesinde flagella antijeninin kullanılmasına karar verildi.

Çalışmada 473 serumun 48'i (% 10,2) çabuk lam aglutinasyon testi ile pozitif bulunurken, bu serumlardan yedisi ELISA'da negatif olarak saptandı. ELISA sonuçlarına göre 473 serumun 173'ü (% 36,6) ve 430 yumurta sarısının 76'sı (% 17,7) pozitif olarak bulundu. ELISA ile pozitif olduğu saptanan serumların 41'i (% 23,7) çabuk lam aglutinasyon testi ile pozitif sonuç verdi.

Anahtar Sözcükler: ELISA, Salmonella enteritidis, serum, tavuk, yumurta sarısı

Detection of Antibodies Against Salmonella Enteritidis in Chicken Serum and Egg Yolk with ELISA

Abstract: A total of 473 sera from hens of different age groups and different breeds and a total of 430 eggs were collected from 11 breeders and egg producers in the districts of Adapazarı, Afyon, Ankara and Konya. Lipopolysaccharide (LPS), heat-extract (HE) and flagella antigens were tested in the standardizing ELISA technique. Flagella antigen was found useful in the screening of field samples.

Of the 48 (10.2%) rapid plate agglutination positive sera, 7 were negative in ELISA. One hundred and seventy-three (36.6%) of the 473 sera and 76 (17.7%) of the 430 egg yolks were found to be positive with ELISA. Forty-one (23.7%) of the ELISA positive sera were also positive in the rapid plate agglutination test.

Key Words: ELISA, Salmonella enteritidis, serum, chicken, egg yolk

Giriş

Kanatlılarda gıda zehirlenmesine neden olan serotiplerin kloakal svablardan izolasyonundaki güçlüklerden ve konvansiyonel serolojik testlerin nispeten hassas olmamasından dolayı, infeksiyonları saptamada ELISA tekniği üzerinde durulmuştur (1). Tavuklarda S. enteritidis infeksiyonunu saptamak için ELISA tekniğinde antijen olarak LPS, heat-extract (HE), flagella, dış membran proteini (OMP) veya fimbria başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (2, 3, 4)

S. enteritidis antikorlarının saptanmasında ELISA tekniği bir tarama testi olarak büyük bir öneme sahiptir. Presipitasyon, aglutinasyon, komplement fiksasyon ve

immunflouresan gibi diğer testler ile karşılaştırıldığında ELISA'nın daha sensitif olduğu bildirilmiştir (3). Barrow (5), deneysel olarak Salmonella ile infekte tavukların serumlarını ELISA ile incelediğinde B ve D grubu Salmonella'lar arasında iyi bir ayırımı sağladığını bildirmiştir. Ayrıca, pratikte uzun yıllardır kullanılan lam aglutinasyon testinin tutarsız sonuçlar verdiğini de açıklamıştır.

McLeod ve Barrow (6), S. enteritidis ile infekte olduğu bilinen broyler damızlık ve yumurtacı sürülerden aldıkları yumurtaların sarılarında, S. enteritidis'in LPS'i ile reaksiyona giren IgG düzeylerini saptamak için indirekt ELISA yapmışlar ve Salmonella infeksiyonu ile ELISA'da

bulunan yüksek değerler arasında pozitif korelasyon saptamışlardır. Antijen olarak LPS kullanılarak yapılan ELISA'nın, invaziv Salmonella serotiplerinin neden olduğu infeksiyonları yumurta sarılarında saptamada kullanışlı olacağını ileri sürmüşlerdir.

Timoney ve ark. (4), flagellin ELISA'nın, pullorum antijeni ile yapılan çabuk lam aglutinasyon testinden daha duyarlı olduğunu ve üstelik pullorum testinde zayıf pozitiflik veren serumların flagellin ELISA'da güçlü pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Zijderveld ve ark. (7), damızlık sürülerde gerçekleştirdikleri çalışmalarında S. enteritidis infeksiyonunun saptanmasında flagella antijeni kullanarak yaptıkları ELISA sonuçlarını, çevresel örneklerin bakteriyolojik inceleme sonuçlarından daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

S. enteritidis antikorları infekte tavukların yumurta sarılarında da saptanabilir (6, 8). Gast ve ark. (9), deneysel olarak infekte ettikleri yumurtacı tavuklardan 4 hafta boyunca topladıkları yumurtaların sarılarını ELISA tekniği ile S. enteritidis flagella antikorları yönünden test etmişlerdir. ELISA ile 10^7 cfu etken verilen gruptaki tavukların hepsini, 10^5 cfu oranında etken verilen gruptaki tavukların % 66'sını ve 10^3 cfu oranında etken verilen gruptaki tavukların % 35'ini infekte olarak saptamışlardır. Minga ve Wray (10), S. enteritidis ile deneysel olarak immunize ettikleri ve ayrıca doğal olarak S. enteritidis ve S. gallinarum ile infekte olan tavuklardan aldıkları serum ve yumurta örneklerini incelediklerinde konvansiyonel serolojik testler ile ELISA sonuçlarının uyumlu olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmada, ELISA tekniğinin tavuk kan serumu ve yumurta sarılarında S. enteritidis antikorlarının saptanması için standardize edilmesi ve bir tarama testi olarak rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bakteriler: Çalışmada antijen hazırlamak ve immunizasyon amacıyla kullanılan S. enteritidis PT4 suşu, Doç. Dr. Tayfun Çarlı'dan (Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi) sağlandı. Kontrol ve kros reaksiyon çalışmalarında kullanılan S. gallinarum, S. typhimurium, E. coli, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis bakterileri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edildi.

Deneme Hayvanları: Bu çalışmada immun serum elde etmek amacıyla 21 adet, 56 haftalık, kahverengi yumurtacı tavuk Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi uygulama çiftliğinden sağlandı.

Test Serumları ve Yumurtaları: Adapazarı, Afyon, Ankara ve Konya illerindeki yumurtacı ve damızlık tavuk işletmelerine ait değişik yaş ve ırklardaki tavuklardan 473 saha serum örneği ve 430 yumurta sarısı toplandı.

Kontrol Serumları ve Yumurtaları: S. enteritidis ve kros reaksiyon çalışmalarında kullanılan bakterilerin herbirinden 3'er adet deneme hayvanına verilmesiyle elde edilen kan serumları pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol serumları, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Manisa Aşı Üretim ve Araştırma Enstitüsü'ne ait SPF tavuklardan ve Salmonella'dan ari olan bir damızlık tavuk işletmesinden alındı. Pozitif ve negatif kontrol yumurtaları, kontrol serumlarının elde edildiği hayvanlardan ve ünitelerden sağlandı.

Solüsyonlar ve Tampon Sıvılar: Bu çalışmada PBS (pH 7,2), yıkama solüsyonu (PBS+ % 0,05 Tween 20), serum, yumurta sarısı ve konjugat sulandırma bufferi (PBS+ % 0,05 Tween 20 + % 1 siğir serum albumini), coating buffer (pH 9,6), sitrat fosfat buffer ve fizyolojik tuzlu su (FTS)'dan yararlanıldı.

Konjugat: ELISA'da konjugat olarak tavşandan elde edilmiş peroksidaz enzimi ile işaretli ticari anti-tavuk IgG (H+L) (SIGMA) kullanıldı.

Substrat: Orto-fenilendiamin (SIGMA) sitrat fosfat buffer (pH 5,0) içerisinde % 0,04 oranında çözülürerek, renkli şişelere 25 ml miktarında konuldu. Testte kullanılmadan önce her bir şişeye 12,5 µl hidrojen peroksit (H_2O_2 , MERCK) ilave edildi.

Durdurma Solüsyonu: ELISA reaksiyonunun durdurulması için 1,25 M H_2SO_4 'den yararlanıldı.

İmmunizasyon Çalışması: Üçerli gruplara ayrılan 21 adet deneme hayvanı ayrı kafeslere yerleştirildi. İmmunizasyon amacıyla S. enteritidis ve bununla kros reaksiyon veren bazı bakteriler için ayrılan gruplardaki her bir deneme hayvanının bacak kasına, McFarland No:10'a ayarlanan, içerisine % 0,5 oranında formol ilave edilerek +4 °C'de 1 gece bekletilen ve inaktivasyon kontrolleri yapılan sıvı kültürlerden 0,5 ml inokule edildi. İnokulasyon bir hafta ara ile 1, 1,5, 2, 2,5 ve tekrar 2,5 ml miktarlarında olmak üzere tekrarlandı.

Serolojik Testler

Çabuk Lam Aglutinasyon Testi: Eşit miktarda boyalı S. pullorum plate test antijeni ve serum temiz bir lam üzerinde karıştırıldı, 2 dakika içerisinde oluşan aglutinasyon pozitif olarak değerlendirildi.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): ELISA; antijenlerin elde edilmesi, ELISA'nın optimizasyonu, ELISA'nın uygulanması, negatiflik eşiğinin belirlenmesi ve doğrulama çalışmaları olmak üzere 5 aşamada gerçekleştirildi.

Antijenlerin Elde Edilmesi: ELISA'da LPS, HE ve flagella olmak üzere üç çeşit antijen hazırlandı. LPS antijeni Hassan ve ark. (11), HE antijeni Nicholas ve Andrews (8)'un bildirdikleri yöntemle göre hazırlandı. Flagella antijeni ise Parton (12)'un yönteminin modifikasyonu ile elde edildi.

ELISA'nın Optimizasyonu

Antijen, konjugat, serum ve yumurta sarısı sulandırılmalarının belirlenmesi: Antijenlerin ve konjugatın sulandırma oranlarını saptamak amacıyla satranç tahtası metodu uygulandı. Her antijen için S. enteritidis pozitif serum, negatif saha serumu ve SPF serum arasındaki farkın en iyi görüldüğü en yüksek antijen, konjugat, serum ve yumurta sarısı sulandırması optimal olarak belirlendi.

Uygun antijenin belirlenmesi: Antijen ve konjugatın titresi belirlendikten sonra, S. enteritidis ve bununla kros reaksiyon veren bazı bakterilere karşı hazırlanan immun serumlar bir pleytte her üç antijen için değerlendirildi. LPS ve HE antijeni kullanıldığında, S. enteritidis ve S. gallinarum pozitif serumlarının OD değerleri birbirinden ayırt edilemeyecek kadar yakın bulundu ve ELISA çalışmalarında S. enteritidis ile kros reaksiyon veren bakterilere karşı hazırlanmış serumlarla en iyi farkı veren flagella antijeni kullanıldı.

ELISA'nın Uygulanması: ELISA, Desmidt ve ark. (13)'ün bildirdikleri yöntemin modifikasyonu ile yapıldı. Herbir çukurun absorbanı 405 nm'de ELISA okuyucusu ile okundu. Çalışmada her mikroye için 20 adet negatif saha kontrolü ve 6 adet S. enteritidis pozitif kontrol kullanıldı.

Negatiflik Eşiğinin Belirlenmesi: Test süresince her pleytte kullanılan 20 adet negatif serum ve yumurta sarısı kontrollerinin OD değerlerinin ortalamasına, kros reaksiyon veren bakterilere karşı hazırlanmış immun

serum ve yumurta sarısı OD değerleri göz önüne alınarak SD (Standart sapma) değeri ilave edildi.

Doğrulama Çalışması: S. enteritidis ile aynı flagellar antijenik yapıya sahip bazı Salmonella'lardan kaynaklanabilecek pozitiflikleri belirlemek için, flagella antijeni kullanılarak yapılan ELISA'da pozitif bulunan serum ve yumurta sarısı örneklerinden farklı işletmelere ait toplam 20'şer adet serum ve yumurta sarısı rastgele seçilerek aynı pleytte flagella ve LPS antijeni ile test edildi.

İstatistiksel Değerlendirme: Serum ve yumurta sarısıyla yapılan ELISA'da bulunan sonuçlar ki-kare testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular

Çabuk Lam Aglutinasyon Testi Sonuçları: Çalışmada incelenen 473 serumun 48'i (% 10,2) S. pullorum boyalı plate test antijeni ile yapılan çabuk lam aglutinasyon testinde pozitif olarak saptanırken, 425 serum (% 89,9) negatif bulundu.

ELISA Sonuçları

Antijen Titrasyonu: Antijen titrasyonunda flagella antijeninin en iyi sonuç verdiği protein oranı 15 mg/ml olarak bulundu. HE antijeni 1/800, LPS antijeni ise 1/400 sulandırmada en iyi pozitif/negatif ayırımı gösterdi.

Serum ve Yumurta Sarısı Sulandırma Oranları: Satranç tahtası yönteminde, S. enteritidis pozitif ve negatif serum ve yumurta sarıları için en iyi sulandırma 1/40 olarak saptandı.

Konjugat Titrasyonu: Standardizasyon çalışmasında ELISA en iyi 1/2500 konjugat sulandırmasında sonuç verdi.

Negatiflik Eşiğinin Belirlenmesi: Serumlar için 4 SD ve yumurtalar için de 3 SD ilave edildi.

ELISA Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirme: ELISA sonuçlarına göre, 473 serumun 173'ü (% 36,6) ve 430 yumurta sarısının ise 76'sı (% 17,7) pozitif olarak değerlendirildi. Serum ve yumurta sarısında pozitif yüzdeleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulundu ($p < 0,001$) (Tablo 1).

Toplam 473 serumdan 48'i (%10,2) çabuk lam aglutinasyon testinde pozitif bulunurken, bu serumlardan 173'ü (% 36,6) ELISA'da pozitif olarak saptandı (Tablo 2).

Tablo 1. Çeşitli damızlık ve yumurtacı işletmelerde ELISA ile S. enteritidis antikorları yönünden pozitif bulunan serum ve yumurta sarısı oranları (%).

İşletme Tipi	İşletme No	Serum Sayısı n	ELISA Pozitif Serum		Yumurta n	ELISA Pozitif Yumurta		Ki kare değeri
			n	(%)		n	(%)	
Damızlık	1	103	69	(67,0)	96	28	(29,2)	28,45***
	2	50	1	(2,0)	30	3	(10,0)	0,11-
Yumurtacı	1	57	8	(14,0)	59	5	(8,5)	0,90
	2	55	23	(41,8)	61	7	(11,5)	13,89***
	3	52	2	(3,9)	30	7	(23,3)	7,39**
	4	40	26	(65,0)	29	4	(13,8)	17,94***
	5	30	13	(43,3)	30	6	(20,0)	3,77*
	6	30	7	(23,3)	30	0	(0,0)	+
	7	20	15	(75,0)	22	9	(40,9)	4,97*
	8	20	9	(45,0)	23	3	(13,0)	5,43*
	9	16	0	(0,0)	20	4	(20,0)	+
Toplam	11	473	173	(36,6)	430	76	(17,7)	40,29***

*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; -: Önemsiz

+: Analiz yapılmadı

Tablo 2. Çeşitli damızlık ve yumurtacı işletmelerde S. enteritidis antikorları yönünden ELISA ve çabuk lam aglutinasyon testi ile pozitif bulunan serum oranları (%).

İşletme Tipi	İşletme No	Serum n	Çabuk Lam Aglutinasyon Testi Pozitif Serum		ELISA Pozitif Serum	
			n	(%)	n	(%)
Damızlık	1	103	16	(15,5)	69	(67,0)
	2	50	1	(2,0)	1	(2,0)
Yumurtacı	1	57	0	(0,0)	8	(14,0)
	2	55	8	(14,6)	23	(41,8)
	3	52	0	(0,0)	2	(3,9)
	4	40	5	(12,5)	26	(65,0)
	5	30	11	(36,7)	13	(43,3)
	6	30	1	(3,3)	7	(23,3)
	7	20	6	(30,0)	15	(75,0)
	8	20	0	(0,0)	9	(45,0)
	9	16	0	(0,0)	0	(0,0)
Toplam	11	473	48	(10,2)	173	(36,6)

Toplam 473 serumdan 41'i (% 8,7) ELISA ve çabuk lam aglutinasyon testinin her ikisinde birden pozitif bulundu. Çabuk lam aglutinasyon testinde pozitif bulunan 48 serumdan 7'si ELISA'da negatif olarak saptandı.

Doğrulama Çalışması: Flagella antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonucu pozitif bulunan serum ve yumurta sarılarından farklı işletmelere ait örneklerden rastgele

seçilen toplam 20'şer adet serum ve yumurta sarısının tamamı LPS ELISA'da da pozitif bulundu.

Tartışma ve Sonuç

Salmonella infeksiyonlarına karşı oluşan antikor yanıtını saptamak amacıyla aglutinasyon, antiglobulin,

komplement fiksasyon testleri ve ELISA kullanılmaktadır (14).

Bu çalışmada 473 serumun 48'i (% 10,2) çabuk lam aglutinasyon testinde pozitif olarak bulunurken, bu pozitif serumlardan yedisi ELISA'da negatif olarak saptandı. ELISA ile pozitif olduğu saptanan serumların 41'i (% 23,7) çabuk lam aglutinasyon testi ile pozitif sonuç verdi. ELISA tekniği aglutinasyon testine göre daha spesifik ve duyarlı bir testtir (3). D1 grubunda S. enteritidis dışında S. enteritidis ile aynı O somatik antijen yapısına sahip olan S. pullorum ve S. gallinarum gibi etkenler de bulunmaktadır. Bu etkenler boyalı pullorum plate test antijeni ile aglutinasyon vermektedir. Çabuk lam aglutinasyon testinde pozitifken, ELISA tekniğinde negatif bulunan bu serumlar, S. enteritidis dışında D1 grubunda bulunan etkenlerle infekte olmuş hayvanlara ait olabilir. Ayrıca, aglutinasyon testi öncelikli olarak IgM sınıfı antikorları saptarken (3), çalışmada ELISA IgG sınıfı antikorları saptamaktadır. Eğer hayvanlar S. enteritidis ile yeni infekte olmuş ve henüz IgG sınıfı antikorlar oluşmamış ise aynı şekilde ELISA'da negatiflik şekillenebilir. Çalışmanın sonuçları diğer araştırmacıların (15, 16) buldukları sonuçlarla uyumludur.

Turan (17), çalışmasında kesimhaneden aldığı kan serumlarından yaptığı ELISA'da % 13,9 pozitiflik bulurken, çabuk lam aglutinasyon testi ile % 6,7 pozitiflik saptamıştır. Akalın (18), İzmir bölgesinde 6 adet broyler damızlık işletmeden sağladığı toplam 1680 serumdan 365'inin (% 21,7) S. enteritidis yönünden pozitif olduğunu bildirmiştir. Çalışmada diğer araştırmacıların sonuçlarından farklı olarak, serumların çabuk lam aglutinasyon testi ile % 10,2'si ve ELISA ile de % 36,6'sı pozitif olarak saptandı.

Kaynaklar

1. Nicholas, R.A.J.: Serological response of chickens naturally infected with Salmonella typhimurium detected by ELISA. *Br. Vet. J.*, 1992; 148: 241-248.
2. Cooper, G.L., Thorns, C.J.: Evaluation of SEF 14 fimbrial dot blot and flagellar western blot tests as indicators of Salmonella enteritidis infection in chickens. *Vet. Rec.*, 1996; 138: 149-153.
3. Kim, C.J., Nagaraja, K.V., Pomeroy, B.S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Salmonella enteritidis infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 1991; 52: 1069-1074.
4. Timoney, J.F., Sikora, N., Shivaprasad, H.L., Opitz, M.: Detection of antibody to Salmonella enteritidis by a gm flagellin-based ELISA. *Vet. Rec.*, 1990; 127: 168-169.
5. Barrow, P.A.: Serological analysis for antibodies to S. enteritidis. *Vet. Rec.*, 1991; January 12, 43-44.
6. Mcleod, S., Barrow, P.A.: Lipopolysaccharide-specific IgG in egg yolk from two chicken flocks infected with Salmonella enteritidis. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1991; 13: 294-297.
7. Zijderveld, F.G., Zijderveld-Bemmel, A.M., Brouwers, R.A.M., Vries, T.S.DE, Landman, W.J.M., Jong, W.A.DE.: Serological detection of chicken flocks naturally infected with Salmonella enteritidis, using an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against the flagellar antigen. *Vet. Quart.*, 1993; 15: 135-137.

8. Nicholas, R.A.J., Andrews, S.J.: Detection of antibody to Salmonella enteritidis and S. typhimurium in the yolk of hens' eggs. *Vet. Rec.*, 1991; 128: 98-100
9. Gast, R.K., Porter, R.E., Holt, P.S.: Assessing the sensitivity of egg yolk antibody testing for detecting Salmonella enteritidis infections in laying hens. *Poult. Sci.*, 1997; 76: 798-801.
10. Minga, U.M., Wray, C.: A disc ELISA for the detection of salmonella group D antibodies in poultry. *Res. Vet. Sci.*, 1992; 52: 384-386.
11. Hassan, J.O., Barrow, P.A., Mockett, A.P.A., Mcleod, S.: Antibody response to experimental Salmonella typhimurium infected in chickens measured by ELISA. *Vet. Rec.*, 1990; 126: 519-522.
12. Parton, R.: Envelope proteins in Salmonella minesota mutants. *J. Gen. Microbiol.*, 1975; 89: 113.
13. Desmidt, M., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., De Groot, P.A., Verlinden, M., Wjffels, R., Hinton, M., Bale, J.A., Allen, V.M.: Detection of antibodies to Salmonella enteritidis in sera and yolks from experimentally and naturally infected chickens. *Vet. Rec.*, 1996; 138: 223-226.
14. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R.: *Clinical Veterinary Microbiology. Section 2: Bacteriology*, 18. Enterobacteriaceae. p. 226-234. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London, England, 1994.
15. Cullen, G.A., Nicholas, R.A.J.: Serological analysis for antibodies to Salmonella enteritidis. *Vet. Rec.*, 1991; 128: 387-388.
16. Hopper, S.A., Mawer, S.: Salmonella enteritidis in commercial layer flock. *Vet. Rec.*, 1988; 123: 351.
17. Turan, N.: Broyler ve yumurtacı tavuk serumlarında Salmonella enteritidis ve Salmonella typhimurium antikorlarının serolojik testlerle araştırılması ve deneysel infeksiyon çalışmaları. Doktora tezi, İstanbul Ü. Sađ. Bil. Ens., İstanbul, 1995.
18. Akalın, N.: Broyler damızlıklarda Salmonella antikorlarının ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testi ile aranması ve klasik aglutinasyon testleri ile karşılaştırılması