

Pengembangan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay untuk Mendeteksi Infeksi *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) pada Ayam

ADIN PRIADI dan LILY NATALIA

Balai Besar Penelitian Veteriner, PO. Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 07 Juni 2006)

ABSTRACT

PRIADI, A. and L. NATALIA. 2006. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection in chicken. *JITV* 11(3): 241-247.

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) has been recognized in chicken in Indonesia and incriminated as a possible additional causative agent in respiratory disease complex. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed for the seroepidemiological study of ORT infection in chickens. Ten weeks old chickens are injected with 0.5 ml of killed *O. rhinotracheale* emulsified in Freund's complete adjuvant at a concentration of 10^9 CFU/ml. Hyperimmune sera and non-reactive control sera were used to standardized the ELISA for ORT infection. Optimum condition for the ORT ELISA was antigen dilution 1/800, serum dilution 1/100 and 1/4000 conjugate dilution. Optical density cut-off point was determined by using 31 serum samples from 2 broiler farms. Cut-off for negative serum was 0.27 (mean + 3 standard deviation). With these optima, 187 chicken sera from broiler, layer and broiler breeder farms were collected and screened. Seroconversions were detected from broiler and layer farms in Magelang district, Central Java (Bojong I, Paremono, Bojong II, Keblukan) and a broiler breeder farm in West Java. The seroconversion were 0, 10, 94, 88 and 100 percents respectively. These figures show that the prevalence of *O. rhinotracheale* infection in chicken in layer and breeder farms were very high.

Key Words: *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), ELISA, Chicken

ABSTRAK

PRIADI, A. dan L. NATALIA. 2006. Pengembangan *Enzyme-linked immunosorbent assay* untuk mendeteksi infeksi *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) pada ayam. *JITV* 11(3): 241-247.

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) telah diketahui dapat ditemukan pada ayam di Indonesia dan diduga sebagai agen yang mungkin ikut berperan dalam penyakit pernafasan yang kompleks. Untuk mendapatkan gambaran seroepidemiologi infeksi ORT, telah dikembangkan uji serologi *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Ayam umur 10 minggu disuntik dengan 0,5 ml bakteri *O. rhinotracheale* inaktif pada konsentrasi 10^9 CFU/ml dalam *Freund's complete adjuvant* untuk memperoleh anti serum hiperimun. Serum ayam sebelum imunisasi diambil dan digunakan bersama serum hiper imun untuk standarisasi ELISA. Optima ELISA ORT yang sudah dikembangkan adalah enceran antigen 1/800, enceran serum 1/100, dan enceran konjugat 1/4000. Densitas optikal dari nilai *cut-off* ELISA ORT ditentukan dari pengujian 31 sampel serum yang berasal dari 2 peternakan ayam pedaging. Nilai *cut off* yang dikalkulasi sebagai nilai rata-rata ditambah 3 deviasi standar adalah 0,27. Menggunakan *cut-off point* ini sebanyak 187 sampel serum dari peternakan ayam pedaging dan peternakan pembibitan ayam pedaging dikoleksi dan diperiksa terhadap antibodi ORT. Serokonversi ditemukan pada sampel serum yang berasal dari peternakan ayam pedaging, dan ayam petelur yang berada di Kabupaten Magelang, Jawa Tengah (Bojong I, Paremono, Bojong II, Keblukan) dan dari peternakan pembibitan ayam pedaging di Jawa Barat, yang masing-masing secara berurutan mempunyai serokonversi sebanyak 0, 10, 94, 88 dan 100%. Angka ini menunjukkan bahwa prevalensi infeksi *O. rhinotracheale* pada ayam di peternakan ayam petelur dan pembibitan sangat tinggi.

Kata Kunci: Infeksi *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), ELISA, Ayam

PENDAHULUAN

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) adalah bakteri berbentuk batang pleomorfik, gram negatif, yang menyebabkan gangguan pernafasan pada ayam dan kalkun (VAN DAMME *et al.*, 1994). Gejala klinis pada ayam yang terinfeksi ORT adalah batuk, terjadi sekresi hidung, artritis, dan terbaring dengan posisi tertelungkup. Lesi umum yang terlihat berupa edema

dan pengerasan paru-paru, pneumonia, pleuritis dan *airsacculitis* (DE HERDT *et al.*, 2001; VAN EMPEL dan HAFEZ, 1999, SPRENGER *et al.*, 2000; ODOR *et al.*, 1997). Kerugian ekonomi oleh infeksi ini disebabkan terjadinya penurunan produksi telur, hambatan pertumbuhan, kematian dan pengafkiran karkas (DE HERDT *et al.*, 2001; SPRENGER *et al.*, 2000).

Kejadian infeksi ORT pada ayam sudah dilaporkan di Jepang (SAKAI *et al.*, 2000), dan Turki (OZBEY *et al.*,

2004), Mexico (SARIANO *et al.*, 2002), Jordania (EL-SUKHON *et al.*, 2002), Brazil (CANAL *et al.*, 2005), dan Prancis (LEROY-SETRIN *et al.*, 1998). Di Indonesia kuman ORT sudah disolasi dari ayam broiler dan broiler breeder di Jawa Barat dan Jawa Tengah pada tahun 2002 (PRIADI dan NATALIA, 2006).

Kuman ORT dapat bertahan di *litter* selama 1 hari pada suhu 37°C, 6 hari pada suhu 22°C, 40 hari pada suhu 4°C dan paling sedikit selama 150 hari pada suhu -12°C (LAPES *et al.*, 2002). Walaupun kuman ini dinyatakan sangat sensitif terhadap berbagai desinfektan (HAFEZ dan SCHULZE, 1998), pengamatan di lapangan menunjukkan bahwa kuman ORT mudah resisten terhadap antibiotik (DEVRIESE *et al.*, 1995, PRIADI dan NATALIA 2006), sehingga efektifitas medikasi sulit diharapkan. Hingga saat ini sebanyak 18 serotipe (A-R) sudah ditemukan dan serotipe A adalah yang paling umum ditemukan (HAFEZ, 2002).

Pada infeksi alam, kuman ORT tidak mudah untuk diisolasi karena pertumbuhan kuman ini yang lambat dan ukuran koloni yang sangat kecil (DE HERDT *et al.*, 2001), tetapi ayam akan memberikan respon serologis yang tinggi (VAN EMPEL *et al.*, 1999) sehingga seroepidemiologi dapat merupakan studi yang dapat memberikan gambaran infeksi oleh ORT. Beberapa uji serologi sudah dikembangkan untuk deteksi infeksi ORT secara cepat dan akurat (CANAL *et al.*, 2002; ERGANIS *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2000; dan OZBEY *et al.*, 2004).

Untuk mendapatkan gambaran yang lebih luas mengenai infeksi ORT ini di Indonesia, uji *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sudah dikembangkan dan uji ini digunakan untuk pengamatan seroepidemiologi pada beberapa peternakan ayam.

MATERI DAN METODE

Antigen *Ornithobacterium rhinotracheale*

Bakteri ORT (BB6/M5/02) hasil isolasi dari trakhea ayam bibit pedaging digunakan dalam penelitian ini. Bakteri ditumbuhkan pada *blood agar* dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu 37°C dan kandungan CO₂ sebanyak 5%. Bakteri dipanen, dicuci 3 kali dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 x g selama 10 menit dan disuspensikan dalam NaCl 0,85%. Konsentrasi bakteri dibuat hingga mencapai 10⁹ cfu/ml. Suspensi kuman kemudian dipanaskan hingga 100°C selama 1 jam. Bakteri disentrifus dan supernatan dari kuman ini digunakan sebagai *coating antigen* ELISA.

Produksi antiserum terhadap ORT

Imunogen yang digunakan untuk memproduksi antiserum dibuat dari campuran emulsi bakteri ORT yang mempunyai konsentrasi 10⁹ cfu/ml dan *Freund's Compleate Adjuvant* dalam perbandingan volume yang sama. Lima ekor ayam berumur 10 minggu disuntik dengan sebanyak 0,5 ml imunogen secara subkutan. Empat minggu kemudian dilakukan suntikan ulang dengan dosis yang sama dengan emulsi *Freund's incomplete adjuvant*. Serum yang dikumpulkan 4 minggu sesudah suntikan terakhir digunakan sebagai serum positif sedangkan serum pravaksinasi digunakan sebagai serum negatif.

Prosedur *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Titrasi antigen dan konjugat ELISA ORT

Antigen ORT diencerkan 1 : 25 hingga 1 : 800 dalam 0,06 M *bicarbonate buffer* pH 9,6 dan volume sebanyak 100 µl dimasukkan dalam mikroplat (Nunc-immuno plate, Maxisorb, 96-well U-bottomed, Denmark). Antigen diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C. Mikroplat kemudian dicuci 3 kali dengan PBST (*phosphate buffered saline* + Tween 20 : 0,01 M; 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,2). Antigen kemudian direaksikan dengan serum positif dan negatif yang sudah diencerkan 1 : 100 dalam *Tris-EDTA-NaCl buffer* yang mengandung 0,05% Tween dan 0,2% *kasein*. Sesudah bereaksi selama 1 jam, *plate* dicuci 3 kali dan kemudian direaksikan kembali dengan konjugat *Rabbit anti chicken IgY* + HPO (Jackson Laboratories, USA) yang sudah diencerkan 1 : 4000, 1 : 8000 dan 1 : 16000. Hasil reaksi divisualisasi dengan menambahkan substrat ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid), H₂O₂ *citrate buffer* pH 4,2 dan dibaca pada ELISA *plate reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Optima ELISA ditentukan berdasarkan Positif/Negatif (P/N) rasio. *Cut-off point* untuk ELISA ORT ditentukan dengan menguji sampel serum dari lapangan dan *cut-off point* dikalkulasi berdasarkan rumus: *Mean* + 3 deviasi standar (SPENCER, 1993).

Pengujian serum lapang

Untuk uji skrining ORT, sebanyak 177 serum ayam dari berbagai peternakan ayam Jawa Barat dan Jawa Tengah telah diuji dengan ELISA ORT. Perincian asal sampel adalah sebagai berikut. Sebanyak 57 sampel serum diambil dari beberapa peternakan ayam pedaging

di Jawa Tengah, sebanyak 50 sampel serum ayam petelur diambil dari satu peternakan di Jawa Tengah dan 80 sampel serum ayam yang berasal dari satu peternakan pembibitan ayam pedaging.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Titrasi antigen dan konjugat ELISA *Ornithobacterium rhinotracheae*

Serum hiperimun dikoleksi dari 5 ekor ayam yang diambil 14 hari sesudah imunisasi yang terakhir. Serum hiperimun ini kemudian digunakan untuk titrasi penentuan optima ELISA-ORT. Hasil titrasi antigen dan konjugat ELISA ORT terlihat pada Tabel 1.

Antigen yang berupa supernatan hasil pemanasan suspensi bakteri dapat memberikan perbaikan reaksi yang jelas antara serum positif dan serum negatif secara baik. Antigen hasil pemanasan lebih spesifik dibandingkan dengan ekstraksi dengan SDS (HAFEZ dan STING, 1997). HAFEZ *et al.* (2000) menunjukkan bahwa ELISA yang dikembangkan di laboratorium lebih sensitif dibandingkan dengan kit komersil. Hal ini berkaitan dengan reagen yang digunakan pada ELISA ini lebih spesifik dan digunakan segera. LOPEZ *et al.* (2000) menunjukkan bahwa ELISA menggunakan antigen *outer membrane protein* ORT lebih sensitif dibandingkan dengan uji aglutinasi dalam mendeteksi antibodi ORT pada kalkun.

Dalam penelitian ini hasil titrasi ELISA menetapkan bahwa optima untuk ELISA ORT adalah: enceran antigen 1 : 800, enceran serum 1:100, enceran konjugat 1 : 4000. Penentuan ini berdasarkan nilai rasio densitas optikal serum positif dan serum negatif. Pada optima di atas, rasio P/N mencapai 13,3 dan densitas optikal serum positif 2,0 (tinggi) sedangkan densitas optikal serum negatif rendah (0,15). Dengan nilai rasio P/N yang tinggi maka pembedaan serum positif dan negatif akan sangat jelas.

Penentuan nilai *cut-off* ELISA ORT

Sebanyak 31 sampel serum ayam diambil dari 2 peternakan ayam pedaging di Jawa Tengah untuk penentuan nilai *cut-off* ELISA ORT. Serum ayam tersebut dipastikan diambil dari ayam yang tidak menunjukkan gangguan pernafasan atau gejala klinis lainnya. Nilai *cut-off* ini akan memberikan batasan nilai OD ELISA yang dinyatakan sebagai hasil negatif untuk titer antibodi ORT. Rataan densitas optikal dari 31 sampel di atas adalah 0,15 dengan deviasi standar 0,04. Jadi, nilai *cut-off* yang ditentukan berdasarkan $Mean + 3 SD$ adalah 0,27, sebagaimana yang diuraikan SPENCER (1993). Data untuk penentuan nilai *cut-off* terlihat pada Tabel 2.

Hasil uji lapang

Dengan menggunakan optima ELISA ORT yang sudah ditentukan, sebanyak 187 serum ayam diuji terhadap adanya antibodi ORT. Hasil seroepidemiologi menunjukkan terdapat variasi prevalensi ORT pada peternakan ayam pedaging mulai dari 0 hingga 94% (Tabel 3). Infeksi oleh ORT pada ayam pedaging sangat mempengaruhi produktifitas yang diukur dari tingkat mortalitas, *feed conversion ratio* dan pertambahan bobot hidup. Dari komunikasi dengan peternak broiler, dinyatakan bahwa peternakan Bojong II dimana prevalensi ORT mencapai 94%, produktifitasnya lebih rendah dari peternakan Bojong I dan Paremono yang masing-masing berprevalensi 0 dan 10%. Korelasi positif antara serokonversi antibodi terhadap ORT dengan penurunan bobot hidup dan gejala pernafasan ayam broiler juga dilaporkan oleh CANAL *et al.* (2002). Sebaran serokonversi setiap individu ayam broiler dapat dilihat pada Gambar 1. Tingkat prevalensi ORT pada ayam pedaging sebesar 26; 9,4; 13,5; 10,2% masing masing dilaporkan oleh HAFEZ dan STING (1996), HEEDER *et al.* (2001), SAKAI *et al.* (2000) dan OZBEY

Tabel 1. Hasil titrasi antigen dan konjugat pada ELISA-ORT

Enceran konjugat	Enceran serum		Densitas optikal pada pengenceran antigen (1/x)					
			25	50	100	200	400	800
1 : 4000	1 : 100	Positif	3,0	2,95	2,76	2,66	2,4	2,0
		Negatif	0,16	0,16	0,17	0,18	0,18	0,15
		Rasio P/N	18,75	18,44	16,23	14,78	13,3	13,3
1 : 8000	1 : 100	Positif	1,79	1,7	1,59	1,54	1,38	1,23
		Negatif	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15
		Rasio P/N	12,78	12,14	11,35	10,27	9,2	8,2
1 : 16000	1 : 100	Positif	0,96	0,92	0,86	0,84	0,78	0,58
		Negatif	0,14	0,13	0,12	0,11	0,13	0,12
		Rasio P/N	6,86	7,8	7,17	7,64	6	4,83

Tabel 2. Penentuan nilai *cut-off* ELISA ORT

Asal peternakan	Densitas optikal
Bojong I	0,13
Bojong I	0,14
Bojong I	0,12
Bojong I	0,15
Bojong I	0,15
Bojong I	0,15
Bojong I	0,15
Bojong I	0,15
Bojong I	0,18
Bojong I	0,15
Bojong I	0,14
Bojong I	0,14
Bojong I	0,14
Bojong I	0,16
Bojong I	0,15
Bojong I	0,17
Bojong I	0,14
Bojong I	0,13
Bojong I	0,15
Bojong I	0,12
Bojong I	0,14
Bojong I	0,13
Paremono	0,14
Paremono	0,14
Paremono	0,15
Paremono	0,35
Paremono	0,13
Paremono	0,14
Paremono	0,14
Paremono	0,13
Paremono	0,13
Paremono	0,16

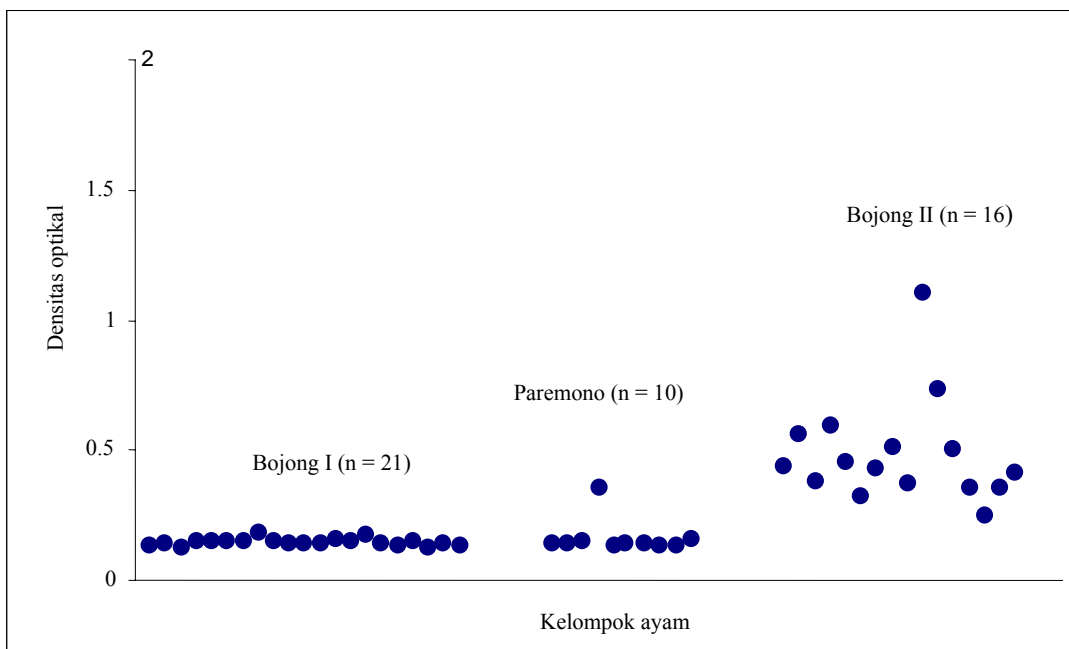
et al. (2004). CANAL *et al.* (2002) melaporkan bahwa 63,83% dari 50 flock ayam pedaging dan 100% dari 40 flock ayam bibit pedaging yang diperiksa di Brazil bereaksi positif secara serologis.

Dari ayam 31 ekor ayam asal Bojong I dan Paremono yang tidak menunjukkan gangguan pernafasan dan penurunan produksi ditemukan 1 sampel bereaksi positif secara serologis. Spesivitas ELISA ORT mencapai $30/31 \times 100 = 96,8\%$. Dari 146 serum kelompok ayam yang menunjukkan gangguan pernafasan, sebanyak 139 serum (15 dari ayam potong di Bojong II, 44 dari ayam petelur Jawa Tengah dan 80 dari ayam *breeder* Jawa Barat) menunjukkan reaksi serologis yang positif. Sensitivitas ELISA ORT ini mencapai $139/149 \times 100 = 95,2\%$.

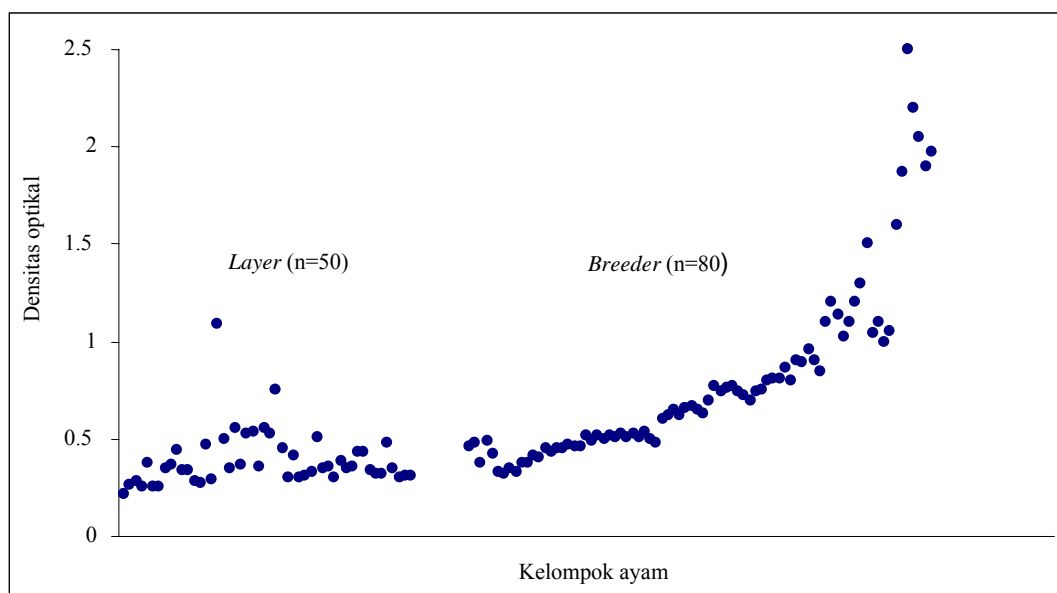
Pada ayam yang mempunyai daur hidup lebih panjang seperti ayam *layer* dan *breeder* tingkat serokonversi masing-masing sebanyak 88 dan 100%. HEEDER *et al.* (2001) dan SAKAI *et al.* (2000) melaporkan tingkat prevalensi ORT pada ayam *layer* masing-masing sebesar 52 dan 12,7%. SPRENGER *et al.* (2000) mengamati adanya penurunan produksi telur hingga 10% per minggu dan kematian mencapai 6,8% per minggu pada ayam *layer*. Semua (100%) dari 80 ekor serum dari ayam *breeder* menunjukkan reaksi positif pada ELISA ORT. Hal yang sama juga dilaporkan di Brazil (CANAL *et al.*, 2002) dimana 100% dari 480 sampel *breeder* bereaksi positif pada ELISA ORT. Angka ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan oleh HAFEZ dan STING (1996) dan SAKAI *et al.* (2000) yang masing-masing setinggi 79 dan 13,9%. Hasil ini menunjukkan bahwa ORT sudah menyebar luas pada ayam *layer* dan *breeder* di Cianjur Jawa Barat dan Magelang Jawa Tengah. Sebaran serokonversi ayam *layer* dan *breeder* terlihat pada Gambar 2.

Tabel 3. Hasil uji serum lapang dengan ELISA ORT

Jenis ayam	Asal ayam	Daerah	Jumlah sampel	Positif (%)
Broiler	Bojong I	Jateng	21	0
	Paremono	Jateng	10	1 (10%)
	Bojong II	Jateng	16	15 (94%)
Layer	Keblukan	Jateng	50	44 (88%)
Breeder	Cianjur	Jabar	80	80 (100%)



Gambar 1. Serokonversi ayam broiler terhadap *Ornithobacterium rhinotracheale*



Gambar 2. Serokonversi ayam layer dan breeder terhadap *Ornithobacterium rhinotracheale*

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ELISA yang dikembangkan dapat digunakan untuk mendeteksi tingkat infeksi ORT di peternakan ayam. Spesifisitas dan sensitivitas ELISA ORT masing-masing adalah 96,8 dan 95,2%. Seroprevalensi infeksi oleh *Ornithobacterium rhinotracheale* telah terjadi pada ayam broiler, ayam layer dan ayam breeder di Indonesia. Pengamatan terhadap pengaruh infeksi *Ornithobacterium rhinotracheale* terhadap produktivitas ayam broiler, layer dan breeder perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- CANAL, C.W., J.A. LEO, S.L.S. ROCHA, M. MACAGNAN, C.A.V. LIMA-ROSA, S.D. OLIVEIRA and A. BACK. 2005. Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil. *Res. Vet. Sci.* 78: 225-230.
- CHARLTON, B.R., S.E. CHANNING-SANTIAGO, A.A. BICKFORD, C.J. CARDONA, R.P. CHIN, G.L. COOPER, R. DROUAL, J.S. JEFFREY, C.U. METEYER, H.L. SHIVAPRASAD and R.L. WALKER. 1993. Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. *J. Vet. Diagnostic Invest.* 5: 47-51
- CHIN, R.P., and R. DROUAL. 1997. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Disease of Poultry. 10th Ed., B. Calnek Ed. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 1012-1015.
- DE HERDT, P., K. CAUWERTS, J. VARVLOESEM and R. DUCATELLE. 2001. The relevance and efficacy of *Ornithobacterium rhinotracheale* control in chickens. *World Poult.* 17: 32-33.
- EL-SUKHON, S.N., A. MUSA and M. AL-ATTAR. 2002. Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in Northern and Middle Jordan with special reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Bordetella avium*. *Avian Dis.* 46: 605-612.
- HAFEZ, H. M. 2002. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Int. J. Poult. Sci.* 1: 114-118.
- HAFEZ, H.M. and R. STING. 1996. Serological surveillance on *Ornithobacterium rhinotracheale* in poultry flocks using self-made ELISA. Proc. 45th Western Poultry Disease Conference. Caccun, 1-5 May 1996. Caccun Mexico. pp. 163-164.
- HAFEZ, H.M. and R. STING. 1997. Comparative investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. Proc. 46th western Poultry Disease Conference, Sacramento. California. p. 12-13
- HAFEZ, H.M. and D. SCHULZE. 1998. Efficacy of clinical disinfectants on *Ornithobacterium rhinotracheale* in vitro: Short communication. Proc. of the 1st International Symposium on Turkey Diseases. Berlin, 20 February 1998. Berlin. Pp. 146-150.
- HEEDER C.J., V.C. LOPEZ, K.V. NAGARAJA, D.P. SHAW and D.A. HALVORSON. 2001. Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying hens in the north central region of the United State. *Avian Dis.* 45: 1064-1067.
- LEROY-SETRIN, S., G. FLAUJAC, K. THENAISY and E. CHASLUS-DANCIA. 1998. Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 189-193).
- LOPES, V., B. VELAYUDHAN, D.A. HALVORSON, and K.V. NAGARAJA. 2002. Survival of *Ornithobacterium rhinotracheale* in sterilized poultry litter. *Avian Dis.* 46: 1011-1014
- LOPES, V., C. RAJASHEKARA, A. BACK, D.P. SHAW, D.A. HALVORSON and K.V. NAGARAJA. 2000. Outer membrane protein for serologic detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys. *Avian Dis.* 44: 957-962.
- ODOR, E.M., M. SALEM, C.R. POPE, B. SAMPLE, M. PRIMM, K. VANCE and M. MURPHY. 1997. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial broiler flocks on the Delmarva Peninsula. *Avian Dis.* 41: 257-260.
- OZBEY, G., H. ONGOR, D.T. BALIK, V. CELIK, A. KILIC and A. MUZ. 2004. Investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Elazığ Province located in the East of Turkey. *Vet. Med. Czech.* 49: 305-311.
- PRIADI, A. dan L. NATALIA. 2006. Infeksi *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) pada ayam di Indonesia. *JITV* 11: 61-68.
- SAKAI, E., Y. TOKUYAMA, F. NONAKA, S. OHISHI, Y. ISHIKAWA, M. TANAKA and A. TANENO. 2000. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: preliminary investigations. *Vet. Rec.* 146: 502-503.
- SARIANO, V.E., D.A. VERA, C.R. SALADO, R.P. FERNANDEZ, and P.J. BLACKALL. 2002. In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. *Avian Dis.* 47: 476-480.
- SPENCER, T. 1993. Standardisation of serology. *Penyakit Hewan* 25(46A): 1-6.
- SPRENGER, S.J., D.A. HALVORSON, K.V. NAGARAJA, R. SPASOJEVIC, R.S. DUTTON and D.P. SHAW. 2000. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying-type chickens. *Avian Dis.* 44: 725-729.
- VAN BEEK, P. 1994. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), clinical aspects in broilers and turkeys. Annual Meeting of the Veterinary Study Group of the EU, Amsterdam, November, 1994.
- VAN DAMME, P., P. SEGERS, M. VANCANNEYT, K. VAN HOVE, R. MUTTERS, J. HOMMEZ, F. DEWHIRST, B. PASTER, K. KERSTERS, E. FALSEN, L.A. DEVRIESE, M. BISGAARD, K. H. HINZ, and W. MANNHEIM. 1994. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. Nov., sp. Nov., isolated from the

- avian respiratory tract. *Intern. J. System Bacterio.* 44: 24-37.
- VAN EMPEL, P.C.M. and H.M. HAFEZ. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathol.* 28: 217-227.
- VAN EMPEL, P., M. VRJENHOEK, D. GOOVAERTS and H. VAN DEN BOSCH. 1999. Immunohistochemical and serological investigation of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens. *Avian Pathol.* 28: 187-193.