

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİĞİR TÜBERKÜLOZUNUN TEŞHİSİNDE KULLANILAN GAMMA
İNERFERON TESTİ İLE ELİSA'NIN KARŞILAŞTIRMALI
DEĞERLENDİRMESİ**

Uzm. Vet. Hekim Erhan AKÇAY

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Müjgan İZGÜR**

91085


**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**Tez No:
2000 – ANKARA**

KABUL VE ONAY YAZISI

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma , aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.07.2000


Prof Dr. Müjgan İZGÜR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof Dr. Mehmet ŞAHAL
Ankara Üniversitesi


Doç. Dr. Hakan Yardımcı
Ankara Üniversitesi


Doç. Dr. Jale Erdeğer
Ankara Üniversitesi
Raportör


Doç. Dr. Cengiz Çetin
Uludağ Üniversitesi

ÖNSÖZ

Sığır tüberkülozu bütün dünyada olduğu gibi ülkemiz hayvanlarında da yarattığı ekonomik kayıpların yanı sıra zoonoz olması nedeniyle her zaman ön planda olan bir hastalıktır. Ülkemizde 1998 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre 23.913 tüberkülozlu hasta bulunmaktadır. Yapılan araştırmalara göre her yıl sığır tüberkülozundan 2.400 ile 12.000 arasında insan infekte olmakta ve 32.7- 309.4 milyon Amerikan doları, tedavi giderine harcanmaktadır. Bu nedenle ülkeler hastalıktan korunma ve hastalığın yayılmasını önlemek amacıyla portörleri saptayabilecek en etkili, kolay ve pratik tanı yöntemleri üzerinde çalışmaktadır. Yapılan çalışmalar pozitiflikleri saptayabilen %100 güvenilir bir metot bulunmadığını göstermektedir. Ülkemizde, ELISA ve γ -IFN testleri sığır tüberkülozunun teşhisinde kullanılmamaktadır. Bu çalışmayla sığır tüberkülozunun teşhisinde tüberküline alternatif olabilecek veya beraberce kullanılacak ELISA'nın veya γ -IFN testinin kullanılabilirliği ortaya çıkartılacaktır.

Bu doktora tez çalışması sırasında katkı ve ilgilerini gördüğüm başta danışmanım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Müjgan İZGÜR olmak üzere Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, Uz. Vet. Hek. Nuray ATALA'ya, Lab. Sacit ÇETİN'e, Dr. Ahmet KOPAR'a, Vet. Hek. Ragıp BAYRAKTAR'a, Dr. Uğur KÜÇÜKAYAN'a, eşim Nurdan AKÇAY'a ve oğlum Doruk AKÇAY'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Materyallerin toplanması	27
2.2. Standart suşlar ve serumlar	27
2.3. Besiyerleri	28
2.4. Test malzemeleri	29
2.5. ELISA reagent'leri	30
2.6. ELISA	31
2.6.1. ELISA antijeni	31
2.6.1.1. Antijenin titresinin belirlenmesi	32
2.6.2. Konjugatın titresinin belirlenmesi	32
2.6.3. ELISA'nın yapılışı	33
2.7. GIFT (γ -IFN testi)	33
2.7.1. Sığır γ -IFN testi kit materyali	34
2.7.2. Kan kültürünün duyarlılaştırılması	34
2.7.3. γ -IFN testinin yapılışı	35
2.8. İstatistiksel Analizler	36
3. BULGULAR	37
3.1. ELISA	37
3.1.1. Antijenin total protein miktarı	37
3.1.2. Antijen titrasyonu sonucu	37
3.1.3. Konjugat titrasyonu sonucu	37

3.1.4. Negatiflik kriterlerinin belirlenmesi	37
3.1.5. ELISA sonuçları	38
3.2. γ -IFN testi	39
3.2.1. γ -IFN testinde kullanılan örnekler	39
3.2.2. γ -IFN testi sonuçları	40
3.3. ELISA ve γ -IFN testlerinin sonuçlarının karşılaştırılması	41
3.4. İstatistiksel analizlerin sonuçları	43
4. TARTIŞMA	45
5. SONUÇ	51
ÖZET	52
SUMMARY	53
KAYNAKLAR	54



SİMGELER VE KISALTMALAR

$\mu\text{g/ml}$	Mikrogram / mililitre
$\gamma\text{-IFN}$	Gamma interferon
μl	Mikrolitre
ARB	Aside Dirençli Bakteri
BSA	Sığır Serum Albumini
EIA	Enzim Immuno Assay
ELISA	Enzim Linked Immunosorbant Assay
g	Gram
GIFT	Gamma Interferon Testi
IU	Internasyonal Ünite
kDa	Kilo Dalton
LJ	Lowenstein Jensen
LPA	Lenfosit Proliferasyon Assay
Mab	Monoklonal Antikor
MSO	M.bovis Sonike Edilmiş Antijen
N	Normal
nm	Nanometre
NMS	Fare Serumu
OD	Optik Dansite
OIE	Office International Epizootie
PBS	Fosfat Buffer Solüsyonu
PPD	Purifiye Protein Derivesi
PPD-A	Avian Purifiye Protein Derivesi
PPD-B	Bovine Purifiye Protein Derivesi
RAI	Radio Immuno Assay
SD	Standart deviasyon
SID	Single Intradermal Tuberkülin
TB	Tüberküloz
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	ELISA'da negatif ve pozitif serumların OD'leri	38
Şekil 3.2.	ELISA ve GIFT'te pozitif örneklerin kaynaklara göre karşılaştırılmaları	41
Şekil 3.3.	ELISA ve GIFT'te negatif örneklerin kaynaklara göre karşılaştırılmaları	42
Şekil 3.4.	ELISA'da negatif bulunan örneklerin GIFT ile karşılaştırılmaları	42
Şekil 3.5.	ELISA'da pozitif bulunan örneklerin GIFT ile karşılaştırılmaları	43
Şekil 3.6.	ELISA testi	44
Şekil 3.7.	γ -IFN testi	44

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. M.bovis'in bazı önemli biyokimyasal özellikleri	4
Çizelge 2.1. Toplanan örneklerin kaynak ve sayıları	27
Çizelge 3.1. ELISA'da negatif ve pozitif serumların işletme ve köylere göre dağılımı	39
Çizelge 3.2. γ -IFN testinde kullanılan örneklerin işletme ve köylere göre dağılımları	40
Çizelge 3.3. γ -IFN testi sonuçlarının kaynaklara göre dağılımları	40



1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium* cinsine bağlı türlerin neden olduğu dünyada yaygın zoonotik karakterli kronik ,öldürücü infeksiyöz bir hastalıktır. Hastalık halk sağlığı için en büyük problemlerden biridir (Roberts, 1986). Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre her yıl yaklaşık 3 milyon ölüm ve 8 milyon yeni tüberküloz olayı ortaya çıkmaktadır (WHO, 1992; Ulusan,1994; WHO, 1998).

Tüberküloz, insan ve hayvanlar için bilinen en eski hastalıklardan biridir. İlk çağlardaki yazıtlar, hastalığın insanlığın sosyal gruplar halinde yaşamaya başlamasından itibaren varlığını sürdürdüğünü bildirmektedir. Eski Mozaik tabletlerinde, hayvan karkaslarında pleura ve akciğerler arasında yapışmaların olduğu yazılmaktadır (Wight ve ark.,1942). Ondokuzuncu yüzyıla kadar nedeni belli olmayan bu hastalık 1865 yılında Willemin tarafından keşfedilmiştir (Pritchard , 1988). Robert Koch 1882'de tüberküloz basilini keşfederek deneysel olarak çalışmaya başlamış, 24 Mart 1882'de tüberküloz basilinin bulunuşunu bilim dünyasına duyurmuştur (Griffith ve ark.,1930; Wight ve ark., 1942). Koch 1884 yılında izole ettiği patojenik tüberküloz suşunun sığır serumunda saf kültürünü elde ederek deney hayvanlarını enfekte edebilmiştir. Ayrıca Koch tüberkülozlu bireylerde görülen aşırı duyarlılığı ve bağışıklığı ortaya çıkartmıştır. Basil 1896 yılında Lehmann ve Neumann tarafından *Mycobacterium tuberculosis* olarak adlandırılmıştır (Pritchard , 1988). Bunu takip eden yıllarda R.Philp Edinburg' ta tüberküloz için bir dispanser kurulmasına öncülük ederek buradaki hastalarda izolasyon çalışmalarına başlamıştır; 1922 yılında Albert Callmette ve Camille Guerin Fransa'da BCG aşısını geliştirmiştir. 1944-1947 yılları arasında Walsman ve Schatz, streptomisini, 1943-1947 yılları arasında Lesmann para-amino salisilik asiti , Domagle 1944-1947 yılları arasında tiyoasetozonu ,Demagle ve Fox 1951' de isoniazidi, Kusher 1952-1954 yılları arasında pirazinamidi, Lepetit 1963' de rifamisini, 1967' de Lederle etambutolu bularak tüberkülozu tedavi edilebilir hastalıklar arasına sokmayı başarmışlardır (Crofton, 1994).

Sığırlarda hastalığın 17. yüzyılın ortalarından itibaren Akdeniz ülkelerinden , Avrupa sığırlarına buradan da bütün dünyaya yayıldığı sanılmaktadır (Pritchard, 1988).

Türkiye'de tüberkülozun varlığı 1900'lü yıllarda araştırılmaya başlanmıştır (Golem, 1941; Yeşilada,1966; Tekin ve Rafyi,1971). İlk sistematik bir araştırmaya 1929 yılında Hayvan Sağlık Zabıtası Kanununun kabul edilmesiyle gidilmiştir (Tekin ve Rafyi, 1971). 1929 yılında Rıza İsmail tüberkülin testi ile 7.335 sığırdan 676' sını (%9.2) tüberkülozlu bulmuştur (Tekin ve Rafyi, 1971). 1937 ve 1938 yıllarında yapılan çalışmalarda Ankara ve civarındaki 42.450 sığırdan 581'inde (%3.1) hastalık tespit edilmiştir (Tekin ve Rafyi, 1971). 1934–1964 yılları arasında Ankara Veteriner Fakültesinde yapılan kontroller sonucunda 7.344 kediden 22'si , 9.058 köpekten 6'sı , 9.844 inekten 51'i tüberkülozlu bulunmuştur (Tekin ve Rafyi, 1971).

Mycobacterium, *Mycobacteriaceae* familyasında tek cinstir (Wayne ve Kubica,1986). Yapı yönünden mikobakteriler, *Nocardia* ve *Corynebacteria*'lere benzerlik gösterirler. DNA G+C (%62–70) oranı ile diğer aside dirençli bakterilerle (*Acide Resistance Bacteria-ARB*) aynı özelliğe sahiptir (*Nocardia* % 60-69, *Rhodococcus* %59–69, *Corynebacterium* türleri %51–59). Mikobakteriler 0,3-0,6x1-4 µm büyüklüğünde çomakçıklar olup bazen hafif yuvarlak biçimlerde görülebilirler. Aeroburlar, %10 CO₂'li ortam üremelerine olumlu etkide bulunur. 37°C'de iyi ürerler. Hareketsiz ve sporsuzdurlar. Enerjilerini glukoz ve gliserolün oksidasyonu ile sağlarlar (Wayne ve Kubica 1986).

Mycobacterium cinsindeki mikobakteri türleri doğal olarak yavaş ve hızlı üreyenler olarak ayrılabilir. Yavaş üreyenler ideal ortamlarda görünebilir koloni oluşturabilmesi için 7 günden fazla süreye gerek duyarlar. Hızlı üreyenler için bu süre 7 günden azdır. Yavaş üreyen *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde *M. bovis* ,*M. microti* ve *M. africanum* türleri yer alır. *M. bovis* ,*M. microti* ve *M. africanum* türlerinin fenotipik karakterleri aynıdır.

Elliye aşkın mikobakteri türünün kesin identifikasyonu için değişik biyokimyasal testlere gereksinim olmakla beraber Runyon sınıflaması mikobakterilerin ayırımında halen kullanılmaktadır (Jawetz ve ark.,1987; Bisping ve Amtsberg, 1988; Nolte ve Metchock, 1994).

M. bovis , Mycobacteriaceae familyasında tek cins olan Mycobacterium cinsinde yer almaktadır (Wayne ve Kubica, 1986). Etken uzun veya hafif kıvrık çomaklar tarzındadır. Kokoid , filamentöz ve branşlı formlarına da rastlanabilir. 0.2–0.6 X 1.5–4.0 µm boyutundadır. Sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz ve asido-rezistans özelliğe sahiptirler. *M. bovis* 35 °C de 3-6 hafta içerisinde küçük (1mm den az) şeffaf, beyaz, piramidal koloniler oluşturur. *M. tuberculosis*'e göre daha yavaş ürerler. İlk izolasyonlarında besiyerine gliserin katılmaz. Middlebrook 7H10 agarda rough tipi koloni meydana getirir. Bu koloni tipi *M. tuberculosis* ile benzerlik gösterir (Finegold ve Martin 1982). 22°C ve 45°C'de üreme göstermez. Hücre duvarında bulunan lipoidal maddelerden dolayı normal boyalarla boyanamazlar. Gram boyamada hücre duvarında bulunan kalın lipid tabakaları boyanın girmesine izin vermez. Bu yüzden etken Gram boyamada zor görülür (Nolte ve Metchock,1994).

Mikobakteriler, arymethan boyalarla (örneğin fuksin ve auramin O) boyanma yeteneğine sahiptir. Etken, dekolorasyona direncinden dolayı ARB olarak adlandırılmaktadır (Koneman ve ark., 1992).

M. bovis ,Thiophene –2-carboxylic asit hidrazide (T2H), (1-5µg/ml) , izonikotinic asite (1mg/ml) , streptomisine (2µg/ml) ve paraaminosalisilik asite (2mg/ml) duyarlıdır. T2H'in düşük konsantrasyonlarına duyarlılığı *M. tuberculosis*'le ayırımında yardımcı olur. Niasini ve nitratı redükte etmez. Amidaz testlerinde *M. bovis* üreaz pozitif, nikotinamidaz ve pirazinamidaz negatiftir. Katalaz testinde; semi kantitatif testte 45 mm den küçük kabarcıklar çıkarır. Isı stabilite katalaz testinde 68°C'de 20 dakika tutulduğunda katalaz aktivitesini kaybetmez. Damlatma testinde de katalaz

pozitifdir (Nolte ve Metchock ,1994). *M. bovis*'in önemli biyokimyasal özellikleri Çizelge 1.1. de gösterilmiştir .

Çizelge 1.1. *M.bovis*'in bazı önemli biyokimyasal özellikleri (Holt ve ark., 1994)

Biyokimyasal Testler	Sonuç
Ureaz	+
Pirazinamidaz (agarda)	-
Nitrat reduksüyon	-
Asid fosfataz	+
Katalaz > 45 mm kabarcık	-
Tween hidroliz (10 günde)	-
α- Esteraz	+
Niasin akkumulataz	-
Fotokromojenite	-
Skotokromojenite	-
25 °C üreme	-
45 °C üreme	-
Üremeyi baskılayıcı maddeler	
Pikrik asit , 2mg/ml	-
p-Nitrobenzoik asit, 0.5 mg/ml	-
Hidroksilamin , HCL 0.5mg/ml	-
İsoniazid ,10µg/ml	-
Thiasetazon 10µg/ ml	-
T-2-H 1µg/ml	-
NaCl ,%5	-

M. bovis kültürü için selektif ve selektif olmayan besiyerleri bulunur. Bu besiyerleri agar veya yumurta baz alınarak hazırlanmaktadır. Hazırlanan besiyerleri malaşit yeşili ve antibakteriyel maddeler içerirler. Yumurta baz alınarak hazırlanan besiyerlerinin başında Lowenstein Jensen (LJ) besiyeri gelir. Agar baz alınarak yapılan besiyerlerinde şeffaf görüntüsü nedeniyle kolonileri görebilmek daha kolaydır. Agar bazlı besiyerlerinde 10-12 günde görülebilen koloniler yumurta bazlı besiyerlerinde ancak 18-24 günde görülebilir. Üretilmesi ve incelenmesi amacıyla en çok kullanılan organik besiyeri LJ besiyeridir. Middlebrook 7H11 veya 7H11 gibi selektif besiyerleri

LJ besiyerine antimikrobiyal maddelerin (siklohekzimid, linkomisin, nalidisik asit gibi) katılması ile hazırlanır. Bunun yanında sentetik (Sauton, Proskauer, Long, Beck), yarı sentetik (Dubos, Kirschner, Middlebrook) besiyerleri de kültürde kullanılmaktadır (Bisping ve Amtsberg, 1988).

Son zamanlarda üremenin tesbitinde ümit veren çalışmalardan birisi de radyometrik kültür yöntemidir (Koneman ark., 1992; Yearsley ve ark., 1998). BACTEC olarak adlandırılan sistemde kültür ve ilaç duyarlılık sonuçları 5–10 gün içerisinde sağlanabilir. BACTEC ile kültürde materyal, C¹⁴ ile işaretlenmiş palmitik asit içeren besiyerine ekilir. Mikobakterinin üremesi sırasında yağ asidini metabolize ederek oluşturdukları ¹⁴CO₂ miktarının radyometrik yöntemle ölçülmesiyle sonuca gidilir (Cassidy ve ark.,1999). Ayrıca BACTEC TB 460 sistemi tüberküloz etkenlerini diğer saprofit mikobakterilerden NAP (P-Nitro- α acetylamino- β hydroxypropioiphenone) testi ile ayırt edebilmektedir (Nolte ve Methchock ,1994).

Mikobakteriler antitüberkülozik maddelere karşı farklı duyarlılıklar gösterirler (Nolte ve Methchock, 1994; WHO, 1998). Isoniazid (INH), paraaminosalisilik asit (PAS), rifamisin, etambutol, morfozinamid, streptomisin, pirazinamid, rifamisin, tiyoasetazona duyarlıdırlar (Öktem, 1967; Arda ve ark.,1992). Bazen bu kemoterapiklere karşı dirençli suşlar ortaya çıkabilmektedir (Tezok, 1966; Crofton, 1994). Son yıllarda kemoterapötiklere dirençli suşlara karşı kinolon grubu ilaçların etkili olduğu bildirilmektedir (Studdert ve Hughes ,1992).

M. bovis fiziksel ve kimyasal maddelere oldukça dirençlidir. Fenol (%2), krezol (%1), formalin (%3) ve NaOH (%5) içinde 4 saatte (Arda ve ark., 1992). 70-95 derecelik alkolde 10 dakikada içerisinde ölürler. Direkt güneş ışınlarına ve ultraviyole ışınlarına karşı duyarlıdır, pastörizasyon ısısında genellikle ölürler (Öktem ,1967).

Mikobakterilerin hücre duvarının kimyasal yapısı karmaşıktır. Hücre duvarı yüksek oranda lipid içerir (Chatterjee ve ark.,1989). Toplam lipid miktarı, hücre duvarı kuru ağırlığının %60 kadarını oluşturur. En iç tabaka

mikolik asit-arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşur. En dış tabaka peptidoglikolipid yapısındaki "Mikozid C" den oluşur. Ayrıca yapıda polianyonik glikolipidler (fosfo ve sülfolipidler) ve peptidoglikolipidler (Wax-D) bulunur. Hücre duvarındaki lipidler boyanma özelliklerinde rol oynayan, aynı zamanda adjuvant özelliğinde maddelerdir (Thoen ve Himes, 1986). Lipidlerin purifiye edilmesi ile sülfür içeren glikolipidler ortaya çıkartılmıştır. Bu sülfolipidler sülfotid olarak adlandırılırlar. Hücre duvarında yer alan bu lipidler virulent tüberküloz basilinin makrofajlar içerisinde yaşamını devam ettirmesine yardımcı olurlar. Sülfotidler mitokondriyalarda fosforilatif oksidasyona da engel olmaktadır. Ayrıca sülfotidler fagozom–lizozom fuzyonunu durdurmaktadır. Tüberküloz basillerinden ayrılan çeşitli komponentler değişik hücre reaksiyonlarına yol açarak konakçı yanıtını etkilerler. Hücre ağırlığının %50'sini oluşturan proteinler tüberkülo-protein ve Wax-D, geç aşırı duyarlılıktan ve deri testinin pozitifliğinden sorumludur. Ayrıca Wax-D peptidlere bağlanarak granulom oluşumu ve makrofajların etkilenmesine katkıda bulunur. Polisakkaridler, nötrofillerin duvardan dokuya geçişini sağlarlar. Fosfatidler, tüberkül oluşumunda rol oynarlar. Dış tabakada yer alan maddelerden kord faktörü bir trehaloz-dimikolat olup tüberküloz patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir (Thoen ve Himes, 1986). Kord faktörü tüberkülin duyarlılığına neden olmamasına karşın fagositlerin göçünü önler, leukositler üzerine toksik etki eder, granulom oluşumuna neden olur. Ayrıca kord faktörü hücrelerin mitokondri zararına toksik etkilidir. Kord faktörü karaciğer mitokondriyalılarının bozulmasına ve büyümesine neden olmaktadır. Karaciğer hücre ribozomlarına ve endoplazmik retikulum üzerinde de olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Mikozid-C ise basil ve toksik kord faktör etrafında koruyucu zırh oluşturur (Thoen ve Himes, 1986). Mikobakterilerin parçalanma ürünleri ve kültür süzüntülerinden antijen özelliğinde, protein, lipid ve lipopolisakkarid yapısında pek çok madde ayrılmıştır. Bunlar sitoplazmada (soluble) ve hücre duvarında (insoluble) lipidlere bağlı olarak bulunmaktadır. Bunların bir çoğu hücre duvarının yapısında bulunan ve immunolojik özelliği bulunan maddelerdir (Pepys ve ark., 1959).

Polisakkaridler esas olarak hücre duvarında bulunurlar. I ve II olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Antijeniktirler ve çabuk tipte aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olurlar. Arabinomannan ve arabinogalaktan adlı antijenler, alkali ekstraksiyon, etanol presipitasyon, iyon değiştirici kromatografi ile elde edilirler. Oldukça saflaştırılmış antijenlerdir. Bu işlemlerde antijen özelliği olmayan mannan ve glukon da elde edilir. Antijen özelliğindeki arabinogalaktan ve arabinomannan, konkanavalin-A kromatografisiyle de elde edilebilir (Uluslan, 1994).

Peptidler ve proteinler etkenin hücre duvarı ve sitoplazmasında bulunurlar. Geç tip aşırı duyarlılığa neden olurlar. A, B, C, D olmak üzere 4 fraksiyona ayrılmışlardır (Uluslan, 1994).

Old tüberkülin (OT), pürifiye protein derivesi (PPD) ve BCG, tüberküloz basilinin ısıtılarak sterilize edilmesi ile elde edilir. PPD, triklorasetik asit ya da nötral amonyum sülfat ile presipite edilmiş olan basilin ısıtılarak öldürülmüş kültür filtratıdır. BCG, M. bovis basillerinin pasaj ile virulansını kaybetmiş, canlı ve attenuue BCG kökeninden hazırlanır. Diğer ham bazı antijenleri de BCG ve tüberküloz basilinin basınç veya ses dalgaları uygulamasıyla hazırlanabilir (Uluslan, 1994).

Lipidler, etkenin hem hücre duvarının yapısında hem de serbest olarak yer alırlar. Bu lipidler, trehaloz mikolat, trehaloz sulfolipid, trehaloz lipooligosakkarid, mikozid, fosfatidil inositol dimannozid, fosfatidil inositol pentamannozid, lipoarabinomannan'dır (Thoen ve Himes, 1986).

Mikobakteriler, antikor ve lenfokin oluşumunu uyaran antijenler yönünden zengindir. Ancak karmaşık antijenik yapısı nedeniyle çapraz reaksiyonlar teşhiste önemli bir sorun teşkil etmektedir (Thorns ve ark., 1983).

Tüberküloz basilinin hücre duvarı, organizmada geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ve enfeksiyona karşı dirençten sorumludur. Bundan dolayı enfeksiyonun seyrinde hücrel immunité ön planda gelmektedir (Thorns ve

ark.,1983). Hücresel immun yanıt tüberküloz basillerinin organizmada yayılmasını önler. Basilin Wax-D ve tüberkülo-proteinlerine karşı gelişen geç tip aşırı duyarlılık klinikte hastalık şeklinde ortaya çıkmaktadır. Organizmaya giren tüberküloz basilleri ilk önce polimorf çekirdekli lökositler (PNL) ile karşılaşır. Basilleri fagosite eden PNL'ler lipidden zengin hücre duvarını parçalayamazlar ve basile kısa bir süre hücre içi parazitlik olanağı sağlarlar. Bu sürenin sonunda PNL'ler lizise uğrar ve serbest kalan basiller makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Aktive olmuş T hücresi dirençte anahtar rol oynayan lenfokinleri (IL-4, IL-5, IFN- γ , GM-CSF gibi) salgılayarak makrofaj aktivasyonu ve kemotaksisini sağlar (Harlow ve Lane, 1988; Corbeil,1991; Goodman, 1994; Oppenheim ve ark., 1994). Gamma interferon (γ -IFN), makrofajlarda mikobakterilerin öldürülmesinde başrolü oynar (Landolfo ve ark., 1987; Herbert ve ark., 1995). γ -IFN seviyesi hücresel immuniteye bağlı olarak hızla yükselebilmektedir. Dolayısıyla koruyucu immunitede rol oynayan antijenlerin saptanmasında bir kriter olarak bu sitokin artan düzeylerinden yararlanılabilmektedir (Wayne,1989). İmmunitenin gelişiminde, duyarlı lenfoid hücrenin mikobakteriyel antijeni tanınması önemlidir. CD*8 T lenfositler gen kompleksinden bağımsız (MHC Sınıf I) antijenle enfekte hedef hücreleri nonspesifik lizise uğratırlar. CD*4 T lenfositleri ise spesifik (MHC Sınıf II) antijenleri aracılığıyla lizise neden olurlar. Mikobakteriler NK hücrelerini de aktive ederler. Makrofajların fagositozu gerçekleştirmelerine karşın, c-AMP artışı ve virulent suşlarda sülfatidler nedeniyle fagozom-lizozom füzyonu engellenir. Tüberküloz basilleri hücresel yaşamını böylece devam ettirir. Aktif tüberkülozda bazen immunosüpressif mekanizmalar da rol oynayabilir. Süpresyonda en önemli faktörlerden biri süpressör T lenfositlerindeki artıştır. Mikobakterinin D-arabino D-galaktan gibi polisakkaridlerini içeren immun kompleksler nonspesifik süpresyon yapabilir. Aktive monositlerin PGE₂ yapmaları da immunsüpresyona yol açar. Bu durum PPD'ye cevabın baskılanmasına neden olur. Monositlerdeki süpresyon aktivitesi MHC Sınıf II kompleksindeki değişiklik ve IL-1 yapımındaki artma ile beraberdir. Bütün mikobakteriyel infeksiyonlarda güçlü antikör cevabı, esas olarak peptidoglikana bağlı arabinogalaktan kompleksi

ve hücre duvarı lipoarabinomannanlarının 5-alfa-D-arabinofurasonil birimlerine, daha az derecede ise sitoplazmik membran fosfatidil- inositol mannosidlerin uç mannopiraanosil birimlerine bağlıdır. Yapılan değişik çalışmalarda basilden elde edilen değişik antijenlere karşı özellikle IgG olmak üzere IgA ve IgM cevaplarının geliştiği gösterilmiştir. Tüberkülozun akut döneminde IgM antikorları oluşurken, IgA düzeyleri hastalığa göre paralel olarak artış göstermektedir. Özgül IgE lere rastlanmamıştır (Thorns ve ark., 1983; Kaufmann, 1988; Uluşan, 1994).

Tüberküloz, hayvanlar arasında en çok sığırlarda görülür. Bunun dışında domuz, kedi, köpek, koyun, keçi, at ve kanatlılar gibi evcil hayvanlarla bir çok yabancı hayvan da enfeksiyona duyarlıdır (Leifsson ve ark., 1997 ; Sevcikova ve ark., 1999; Barlow ve ark., 1999 ; Monies ve ark., 2000). Barlow ve ark. (1999), bir lamanın (Lama glama) bronkmediastinal lenf yumrusundan M. bovis'i izole etmişlerdir. Akay ve ark.(1984), bir minkte rastlanan ve M. bovis'ten ileri gelen tüberküloz olgusunu bildirmişlerdir.

Sığırlarda enfeksiyon, solunum ve alimantar yolla olur. Bunun dışında konjenital, deri ve genital yolla da bulaşma olabilmektedir. Deri yoluyla bulaşmaya sık rastlanmaz (Paterson ve ark., 1959; Hughes,1991; Dungworth,1993). Çok sık veya kalabalık ahırlarda tüberkülozlu hayvanların öksürmesi veya tıksırması sonu dışarı çıkan mikroplar diğer hayvanların enfeksiyonu almalarına neden olurlar (Morrison ve ark., 2000).

Üst solunum yollarından giren mikroorganizmalar gerek mukus gerekse epitelyal hareketlerle engellenmeye çalışır. Bu mukosilyal tabakadan kolayca geçebilen bakteriler alveolar boşluklara girerler ve hücrel dejenerasyona veya nekroza neden olurlar (primer efekt). Burada bakteriler makrofajlarca fagosite edilerek veya bağımsız olarak bu organlardaki lenf yumrularına giderek tüberkellerin oluşmasına neden olurlar (primer kompleks). Primer kompleks genellikle hayvanın ilk enfeksiyonunda görülür. Hayvanın yaşına ve direncine bağlı olarak bu lezyonlar iyileşebileceği veya lokalize olabildiği gibi (tam olmayan primer kompleks) direncin zayıfladığı durumlarda lokalize olduğu odaklarda yeniden üremeye

başlayarak kan yoluyla diğer organ ve dokulara yayılır. Bu organlarda çok sayıda küçük tüberkellerin oluşmasına neden olur (miliar tüberküloz.). Vücutlarında primer kompleks bulunan bireyler yeniden mikropla enfekte olabilirler ve kronik organ tüberkülozu şekillenebilir. Vücut direnci zayıf bireylerde şekillenebilen bu tip generalizasyonlarda (geç generalizasyon) hastalık çabuk gelişerek bireyin ölümüne neden olabilir (Arda ve ark.,1992; Dungworth,1993).

Hastalığın inkubasyon süresi suşun niteliği, virulansı, dozu, inokulasyon yolu ile doğrudan ilişkilidir. Deneysel infeksiyonlarda bu süre doğal infeksiyonlara göre daha kısadır. Genellikle 3-5 hafta içerisinde değişebilir (Arda ve ark., 1992).

Sığırlarda tüberküloz genellikle kronik seyreder. İnfeksiyon pneumonia, arthritis, mastitis, derialtı abseler, keratokonjunktivitis, meningitis ve infertilite bozukluklarına neden olur. Hasta hayvanlarda kısa kuru öksürük, iştahsızlık, zayıflama, tüylerde bozulma, mediastinal lenf yumrularında şişmeler görülebilir. Klinik belirtiler patognomonik değildir (Paterson ve ark., 1959; Dungworth,1993).

Sığırlarda lezyonlar hastalığın yerleştiği organa göre değişiklik gösterir. Mikropla bulaşık yiyecek ve suların alınması ile bağırsak lenf yumrularında primer odaklar ortaya çıkabilmektedir (Thoen ve ark., 1981). Aeresol yolla alınan tüberküloz basilleri torasik ve akciğer lenf yumrularında infeksiyon odağı oluştururlar. Cassidy ve ark. (1999) tüberkülin testinde pozitif bulunan 32 sığırdan, 6'sının tonsil, nasofarenks ve burun mukozalarından bakteriyi izole etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre, tonsillerde görülen infeksiyonun diğer organ ve dokular için bir odak oluşturduğu ve infeksiyonun ilk döneminin tüberkülozun teşhisinde yardımcı olabileceği sonucuna varmışlardır.

Otopside, akciğer infeksiyonlarında, burun ve burun mukozasında nodüllere ve ülserlere, akciğer lenf yumrularında kazeöz veya kazeö-kalseröz nitelikte lezyonlara rastlanır. Bazen pleurada nodüller (incili

tuberculosis) görülebilir. Sindirim sistemi infeksiyonlarında, sindirim kanalında lezyonlara, ince bağırsaklarda tüberkeller ve ülserlere rastlanır. Mezenteriyel lenf yumruları şişkindir. İnfeksiyonun şiddetine göre karaciğer, dalak, uterus, böbrek, testis, ovaryum ve memede de lezyonlar görülebilir (Feldman, 1955; Arda ve ark.,1992).

Corner ve ark. (1990) sığır karkaslarında yaptıkları incelemelerde tüberküloz lezyonlarının %15.9'unun torasik boşlukta ve mediastinal lenf yumrularında şekillenmediğini bu yüzden et kontrollerinde tüberkülozun gözden kaçabileceğini bildirmektedirler.

İnsanlar hasta hayvanlardan veya bu hayvanların karkasları ile temas ile doğrudan veya et ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile dolaylı olarak enfekte olurlar. (Roberts 1986).

Bourne ve ark. (2000) ikinci dünya savaşından önceki on yıl içerisinde İngiltere'de her yıl 50.000 hasta insan ve 2.500 ölüm görüldüğünü, bu yıllarda sığırların % 40'ının tüberkülozlu olduğunu, insanlara bulaşmanın çoğunlukla pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleriyle olduğunu bildirmektedirler.

M. bovis infeksiyonlarının teşhisi için klinik semptomlar yeterli değildir. Hastalığın teşhisi için laboratuvara hasta hayvanlardan toplanan idrar, süt, uterus akıntısı ve sperma, hastalıktan ölen hayvanlardan alınan lezyonlu doku ve organlar gönderilir. M. bovis şüpheli hayvanlardan toplanan örnekler soğuk zincirle laboratuvara gönderilir. Sıcak hava koşullarında kontaminasyonu önlemek için borik asit (% 0.5 [m/v]) bakteriyostatik madde olarak katılır. Örnekler blender içerisinde steril şartlarda parçalanır. İçerisine asit (%5 oksalik asit) veya alkali (%2 sodyum hidroksit) katılan şüpheli materyaller 10 dakika oda ısısında tutulduktan sonra 5.000 g de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır, tortudan ince bir tabaka alınarak mikroskopik incelemeler ve kültür için kullanılır. Etkeni boyamada karbol füksin boyama tekniği olarak Ziehl-Neelsen (sıcak boyama) ve kinyon boyama (soğuk boyama) teknikleri kullanılır. Etken bu boyamalarda , mavi veya yeşil zeminde kırmızı renkte görülür (Koneman ve ark., 1992). Ayrıca

fluoresans antikor teknikleri de etkeni boyamada (auramine O veya auramine-rhodamine) kullanılır. Auramin rhodamine boyama tekniği karbol fuksin boyamaya göre daha kullanışlı bir tekniktir. Fluorochrome boyamalarda etkenin görülmesi daha kolaydır. Bu boyamada sarıdan portakal rengine kadar değişik renklerde etken görülür. Karbol fuksin boyamalarda 1000 büyütme, fluoresans antikor teknikleri ile yapılan incelemelerde 150 'den 200 bytmeye kadar değişen büyütmeler kullanılabilir. Morfolojik incelemeler söz konusuysa 40 veya 1000 büyütme ile inceleme yapılmalıdır. Boyamada etkenin doğrudan tanısı kolay olmasına karşın , kültürel metoda göre duyarlılığı daha düşüktür. İnfeksiyonun ilk dönemlerinde yapılan boyamalarda etken daha kolay görülür. (Koneman ve ark., 1992).

Etkenin kültürü için ilk izolasyonda, elde edilen sedimentten yumurta bazlı LJ veya Stonebrink's besiyerlerine (piruvatla zenginleştirilmiş gliserinli ve gliserinsiz) veya agar bazlı Middlebrook 7H10 veya 7H11 besi yerlerine ekim yapılır. Radiometrik metotlar için Middlebrook 7H12 kullanılabilmektedir. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'de 8-12 hafta inkubasyona bırakılır. Haftada bir defa kontrol edilen kültürlerde şüpheli koloni görülürse preparat hazırlanarak mikroskopik olarak incelenir (Grsel, 1954; National Vet. Serv. Lab., 1985; OIE, 1996).

Kültür yapılan besiyerlerinde bakteri veya mantar kontaminasyonları görüldüğünde veya negatif kültür durumlarında makroskopik ve histopatolojik bulgulara göre pozitif olgularda ,işlenmiş materyalden PBS içerisinde yapılan süspansiyondan kobayın arka bacağına 1ml IM yolla verilir. 4-5 hafta sonunda 80 IU avian ve 80 IU bovin tberklinle test edilir. 24 saat sonra deride yapılan ölçümlerle reaksiyon okunur. Pozitif sonuçlarda kobaylar post mortem incelenir. Negatif durumlarda test 4-6 hafta sonra yenilenir (OIE,1996).

Tüberkülozun serolojik tanısına ilişkin ilk çalışma 1898 yılında Ailoing'in geliştirdiği aglütinasyon testi ile başlamıştır. 1901'de Koch tarafından da denenmiştir. Bu araştırmacılar tüberküloz basilinden homojen

bir süspansiyon elde edemedikleri için spesifik sonuçlara gidememişlerdir (Berker ve Engez 1955; Daniel ve Debanne, 1987).

1903'de Bordet ve Gengou komplement fikzasyon testi ile tüberkülozdan enfekte hayvanların kan serumlarında tüberküloza karşı oluşan antikörlerin olduğunu göstermişlerdir (Daniel ve Debanne , 1987).

Berker ve Engez (1955), insanlarda komplement fikzasyon testiyle hastalarda %10 hatalı pozitiflik tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, sağlam şahıslarda testin %90 doğru sonuç verdiğini bildirmektedir.

Barutçu ve ark. (1955), tüberkülozlu hastalardan alınan örneklerle uyguladıkları hemagglütinasyon testinde, testin %60.1 sensitiviteye sahip olduğunu bildirmektedir.

Spesifite ve sensitivite yönünden düşük bulunan bu testlerin bir çoğu artık tüberkülozun teşhisinde kullanılmamaktadır. Bugün tüberkülin deri testi, Fleuresan Antikor Tekniği, Radio-İmmuno Assay (RAI), ELISA, GIFT (γ -IFN testi), lenfosit proliferasyon testi (LPA) , PCR, kromatografi , faj tiplendirme ve DNA fingerprint gibi testler kullanılmaya başlanmıştır (Del Portillo ve ark., 1991; Plikaytis ve ark., 1991; Collins ve ark., 1993).

Kromatografik analizlerde bakterinin lipid kompozisyonunu analize eden ince tabaka kromatografi, kapiller gaz kromatografisi ve HPCL kullanılmaktadır (Jarnagin ve ark., 1982; Nolte ve Metchock,1994).

LPA, tüberkülozun serolojik teşhisinde başarı ile kullanılan bir testtir. Ancak laboratuvar çalışmalarının komplike olması, radyoaktif nükleotidlerin kullanılması ve uzun zaman periyoduna gerek duyulması nedeniyle pratikte kullanımı zordur (OIE,1996).

Tüberkülozun tanısında kullanılan ilk immunodiagnostik test tüberkülin testidir (Rothel ve ark., 1990). Robert Koch, tüberkülin testi ile tüberkülozu teşhis edebildiğinde M. tuberculosis kültürlerinden hazırlanan maddenin hayvanları koruyucu ve tedavi edici nitelikte olduğunu sanmaktadır.

Tüberkülinin tüberkülozun tanısında kullanılmaya başlamasından itibaren kullanılan antijen ve uygulama yöntemleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Aygün ve Heper,1941; Wood ve ark.,1990). Hall ve Thoen (1983), aşırı duyarlılık reaksiyonlarını saptamada PPD yerine allerjen olarak etkenin lizozim ekstratlarının Triton X-100 veya potasyum klorid kullanılarak hazırlanan biyolojik aktif komponentlerinin alternatif olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Tüberkülinin sığır tüberkülozunun tanısında kullanılmaya başlanması ile birlikte testin duyarlılığı günümüzde hala tartışma konusu olmuştur. (Francis ve ark.,1978). Neil ve ark. (1994b), 15 tüberkülin negatif hayvanın akciğer lenf yumrularından ve üst solunum yollarından *M. bovis*'i izole etmişlerdir. Araştırmada 7 hayvanda tipik tüberküloz lezyonlarına da rastlanmıştır. Araştırmacılar, tüberkülozda düşük bakteri konsantrasyonunun ve infeksiyonun ilk dönemlerinde hücresel yanıtın yeterli olmadığını bildirmektedir. Bu nedenle infeksiyonun ilk dönemlerinde uygulanan deri testlerinin tanıya yanlış sonuçlar doğurabileceği sonucuna varmışlardır.

Bugün tüberkülin testi birçok ülke için hastalığın eradikasyonunda önemli rol oynamaktadır (Whipple ve ark.,1995). Üçüncü dünya ülkelerinde özellikle gelir düzeyi düşük ülkelerde TB önemli bir sorun olmasına karşın batı ülkelerinde sığır tüberkülozu sporadik seyretmektedir. Bu ülkeler sığır sürülerinden tüberkülozun eradikasyonunda rezervuar hayvanlardan bulaşmanın önlenmesine çalışmaktadırlar. Porsuk (*Meles meles*) İngiltere'de ve su samurları (*Trichosorus vulpecula*) Yeni Zelanda'da *M. bovis* rezervuarı hayvanlar arasındadır (Gallagher ve ark.,1998). Keet ve ark. (1996), Yeni Zelanda'da ferret'lerde (*Mustela putorius furo*) ve vahşi kedilerde persiste olarak seyreden infeksiyonların sığırlar ve geyiklerde infeksiyon kaynağının nedeni olduğunu belirtmektedirler.

Mikobakteriyel antijenler farklı türlerdeki bakterilerle ortak özelliklere sahiptir. *M. avium*, *M. paratuberculosis* ve *M. leprae* dışında patojen olmayan *Nocardia asteroides* gibi türlerde aynı patojenik lezyonlara ve antijenik reaksiyonlara rastlanılmaktadır. Bu antijenik reaksiyonlar tüberkülin

testinde yanlış sonuçlara neden olabilmektedir (Morrison ve ark., 2000). Tüberkülin testi infekte hayvanların %80'inde başarı sağlarken stres altındaki hayvanlarda ve bireysel farklılıklarda %60'dan daha düşük bir başarı gösterebilmektedir (Wayne, 1989). PPD testi uygulanan hayvanların 3 gün süresince sonuçların görülmesi için barındırılmaları, hayvanların beslenme giderleri ve test bölgesinde fiziki çarpmalar sonucunda oluşabilecek reaksiyonlar testin sonuçlarını olumsuz etkileyen nedenler arasındadır. Stres, immun yanıtı orta dereceli hayvanlarda tüberkülin testine karşı yanlış negatif veya pozitif sonuçlar doğurmaktadır. Ayrıca şüpheli durumlarda hayvanların yeniden test edilmesi için 60 ila 90 günlük sürenin geçmesi de gerekmektedir (Wayne, 1989). TB eradikasyon programlarında Tüberkülin testi yapılan hayvanlardan %15'i yanlış negatif, %2-5'i yanlış pozitif sonuç vermektedir (Gaborick ve ark.,1996). Bu nedenler tüberkülozun teşhisinde ek veya alternatif diagnostik testlere gerek duyulduğunu göstermektedir.

Tüberkülozlu hastalarda ELISA tekniğini, ilk kez 1976 yılında Nassau ve ark. antijen olarak *M.tuberculosis* H37Rv suşunun kültür filtratını kullanarak uygulamışlardır (Daniel ve Debanne, 1987).

Thoen ve ark. (1978) *M. avium* ile enfekte domuzlardaki antikoları saptamada ELISA'yı kullanmışlardır. Araştırmacılar avian-PPD (PPD-A)'yi antijen olarak kullanarak yaptıkları test sonucunda PPD-A'nın ELISA'da antijen olarak kullanılabilirliği sonucuna varmışlardır. Bu yıllardan itibaren ELISA'nın spesifite ve sensitivitesini yükseltmek için değişik antijenlerin kullanılmasına ilişkin araştırmalar yapılmıştır (Fournie ve ark., 1990; Dowling ve Schleeauf 1991; Gaborick ve ark., 1996).

Hall ve ark. (1985), *M. bovis* ATCC 19210 suşunun lizozim ekstraktını filtre ve ısı ile iki ayrı şekilde sterilize ederek hazırlanan antijenle uyguladıkları ELISA'da filtre edilerek hazırlanan antijenle 8 hayvanın 8'inde pozitiflik, ısı ile sterilize edilerek hazırlanan antijenle 8 hayvanın 7'sinde pozitiflik saptamışlardır. Araştırmacılar, ELISA'da antijen olarak kullanılan lizozim antijeninin ısı ile denatüre olduğu sonucuna varmışlardır.

Ritacco ve ark. (1987), ısı ile hazırlanan PPD-B antijeninin ELISA 'da kullanılması ile %90 spesifite, %89.8 sensitivite elde etmişlerdir. Araştırmacılar otoklavlanarak hazırlanan PPD 'nin M. bovis infeksiyonlarını saptamada daha güvenilir olduğu sonucuna varmışlardır.

Auer (1987), M. bovis'le enfekte sığırlarda M. bovis sonike edilmiş antijen (MSO) ile ELISA 'da sensitivitenin tüberkülin testi yapılarak pozitif bulunanlarda %63.0 -%88.7 arasında, spesifitenin ise %52.6 olduğunu bildirmektedir. Araştırmacıya göre indirekt anti-IgG ELISA'nın sensitivitesi, anti-IgM ve IgA konjugatlarının kullanılması ile daha da artırılabilir.

Daniel ve Debanne (1987), ELISA'da PPD-B antijeninin 5-1.000µg/ml arasında kullanılabilirliğini bildirmektedirler.

Auer ve Schleeauf (1988), MSO antijeni ile ELISA'da, M. avium-intracellulare scrofuloceleum (MAIS) 2,8,9,14,18 suşları ve M. flavescens ile deneysel enfekte edilen hayvanlarda %39.5 hatalı pozitifliğe rastlamışlardır. ELISA 'da hatalı pozitif çıkan hayvanların hiçbirisinde M. bovis izole edilememiştir. Araştırmacılar tüberkülin pozitif, tüberkülin negatif ve tüberkülin uygulanmamış hayvanlarda ELISA'da sırasıyla %15.4, %73.6 ve %42.4 pozitifliklere rastlamışlardır. Spesifik olmayan immun yanıtın tüberkülozun teşhisinde yanıltıcı sonuçlar doğurabildiğini, bu nedenle ELISA'da kullanılacak negatif kontrollerin seçiminde dikkat edilmesi gerektiğini bildirmektedirler.

Hammam ve ark. (1989), ELISA'da çapraz reaksiyonların anti-avian PPD serumları ile bovin PPD-B antijenin absorbe edilmesi ile önlebileceğini bildirmektedir.

Plackett ve ark. (1989), M. bovis AN/5 suşundan hazırladıkları antijenle 19 sığırı test ederek 5 hayvanda pozitiflik saptamışlardır. Bu hayvanlara PPD deri testi uygulandığında 4 hayvan tüberkülin pozitif reaksiyon göstermiştir. Araştırmacılara göre bu sonuçlar ELISA'nın spesifite ve sensitivitesinin PPD deri testine göre az da olsa fark gösterdiğini ve bazı

anerjik hayvanlarda yanlış pozitif reaktörlerin ortaya çıkartılmasında ELISA'nın kullanılabileceğini göstermektedir.

Ritacco ve ark. (1990), *M. bovis*'le enfekte 53 ve tüberküloz negatif sürüden seçilen 101 hayvandan alınan örneklerle 10 µg/ml *M. bovis* PPD-B antijeni kullanarak yaptıkları ELISA'da, testin sensitivitesini %73.6, spesifitesini %94.1 bulmuşlardır. Tüberkülin deri testinde pozitif çıkan 3 hayvanda herhangi bir lezyona rastlanmamıştır. Bu örnekler ELISA'da negatif çıkmıştır. Araştırmacılar ELISA'nın tüberkülozun teşhisinde uygun olduğunu bildirmektedir. Ayrıca araştırmacılara göre aktif tüberküloz olgularında mikobakteriyel antikorların yüksek düzeyde bulanabileceği halde subklinik olgularda antikor düzeyi düşük bulunmaktadır.

Kuchinka ve ark. (1990), virulent *M. bovis* ATCC 19120 suşundan elde ettikleri monoklonal antikorları kullanarak uyguladıkları ELISA'da, mikobakteriyel infeksiyonların ilk dönemlerinde, ELISA'da düşük bulunan sensitivitenin monoklonal antikorlar kullanılması ile yükseltilebileceğini göstermişlerdir.

Fifis ve ark. (1992), 12 pürifiye *M. bovis* antijeni kullandıkları ELISA'da diğer mikobakteriyel antijenlerle enfekte hayvanların çapraz reaksiyon verdiğini görmüşlerdir. Araştırmacılar bu reaksiyonların önlenmesi çapraz reaksiyon veren epitoplara uzaklaştırılması ile mümkün olabileceği sonucuna varmışlardır.

Hanna ve ark. (1992), deneysel olarak enfekte edilen 5 buzağının humoral yanıtlarını incelemek için ELISA uygulamışlardır. PPD-B ve fosfotid antijen kullanılarak yapılan ELISA'da tüberkülin uygulamasının testin sensitivitesinde yükselmeye neden olduğunu saptamışlardır.

Savage ve ark. (1993), *M. tuberculosis*'in serolojik tanısında anti-sülfolipid IV Ig antijenini ELISA'da kullanmışlardır. 41'i sağlıklı , 263'ü tüberkülozlu hastalarda yapılan incelemelerde testin spesifitesini %88.27-%98.76, sensitivitesini %25 ve %11.45 bulmuşlardır.

Fifis ve ark. (1994), türe spesifik epitoplara kullanılması ile çapraz reaksiyonların önlenemediğini bildirmişlerdir.

Boirreau ve ark. (1994), A60 antijeninin ELISA'da kullanılmasının özellikle karnivorlardaki mikobakteriyel infeksiyonların tanısında yardımcı olacağını bildirmektedir.

Saçılık (1991), MSO antijeni kullanarak 56 hasta ve 24 kontrol grubuna uygulanan ELISA'da aktif pulmoner tüberkülozun serolojik tanısında testin kullanılabilirliğini bildirmektedir .

Haznedaroğlu ve ark. (1992), akciğer tüberkülozlu insanlarda PPD'ye karşı IgG antikorlarını ELISA ile araştırmışlardır. Araştırmacılar aktif pulmoner tüberkülozlu hastaların sağlıklı kişilerden ayırt edilmesinde ve antitüberküloz tedavinin etkilerini izlemede ELISA'nın yararlı olabileceği sonucuna varmışlardır.

Öztürk (1993), 79 aktif, 24 inaktif tüberkülozlu hasta ve 75 sağlıklı insan kan serumuyla uyguladığı ELISA'da antijen olarak MSO kullanıldığında testin sensitivite değerini %89.9, spesifite değerini %98.7, PPD-B antijeninde değerleri sırasıyla %87.3 ve %94.7 bulmuştur. Ayrıca araştırmacı PPD deri testi sonuçları ile antikor seviyeleri arasında bir ilişkiye de rastlamamıştır.

Ulusan (1994), ELISA'da antijen olarak PPD-B , sonike antijen ve sonike adsorbe antijen (MSOA) kullanarak 57 tüberkülozlu hasta serumuyla yaptığı çalışmada sırasıyla testlerin sensitivite değerlerini %35, %57.9 ve %54.4 spesifite değerlerini %95, %96 ve %96 bulmuştur. Araştırmacıya göre ELISA'da antijen olarak MSO'nun kullanılması daha uygun bulunmuştur.

Keskin ve İzgür (1996), 850 sığır serum örneği ile uyguladıkları ELISA'da kros reaksiyonların giderilmesi ve uygun antijenin kullanılması durumunda ELISA'nın tüberkülin deri testine göre tercih edilebileceği sonucuna varmışlardır.

Hastalığın teşhisinde daha spesifik bir antijen kullanılması amacıyla araştırmacılar çalışmalarını MPB70 antijeni üzerinde yoğunlaştırmışlardır. Fifis ve ark. (1989), MPB70 antijeni kullanılan ELISA'da spesifite ve sensitivitenin artacağını bildirmektedirler. Harboe ve ark. (1990), doğal yolla sığır tüberkülozu ile enfekte hayvanlarda PPD-B testinin anti MPB70 antikoru üzerinde uyarıcı etkisi olduğunu bildirmektedirler. Araştırmacılar M. bovis MPB70 antijenine karşı antikor seviyesinin PPD-B uygulanmasında 10-20 gün sonra yükseldiğini bildirmektedir. Griffin ve ark. (1994), ELISA'da antijen olarak MPB70 ve PPD-B antijenini kullanmış ve her iki testi karşılaştırmıştır. MPB70'e karşı immun yanıtın daha spesifik olduğunu, PPD-B antijeni kullanıldığında testin sensitivitesinin düştüğünü saptamıştır. Evcil geyiklerde yapılan bu çalışma sonucunda sığır tüberkülozunun tanısında antijen olarak MPB70'in, PPD-B antijeni yerine kullanılması ile testin spesifitesinin yükseldiğini bildirmektedir. Lightbody ve ark. (1998), deneysel olarak enfekte edilen sığırlarda PPD-B, MPB70, MPB64 ve MPB59 antijenlerini ELISA'da kullanarak testin sensitivite ve spesifitedeki değişimlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar tüberkülin uygulamasından itibaren 16. günde alınan serumun testin duyarlılığını yükselttiğini bildirmektedirler. Gaborick ve ark. (1996), M. bovis AN5 suşundan PPD-B, MPB70 d2lipoarabinomannan antijeni, Virulent Erdman (ERD), virulent M. tuberculosis H37 Ra suşlarından hazırlanan antijenlerle uyguladıkları ELISA ve kaudal tüberkülin test sonuçlarına göre ELISA'nın spesifite ve sensitivite değerlerinin tüberküline göre düşük olduğu sonucuna varmışlardır. Araştırmacılara göre ELISA'da Protein A ve G konjugatları IgG leri saptadığı için diğer antikor tiplerini saptayamamaktadır. ELISA'nın gelişimi içerisinde farklı antikor tiplerini içine alan geliştirilmiş konjugatlar bu testin sensitivite ve spesifite değerlerini artıracığı sonucuna varılmıştır.

Yapılan araştırmalar sonucunda MPB70'in ELISA antijeni olarak başarıyla kullanılıp kullanılmayacağı konusunda soru işaretleri bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar MPB70'in M. bovis için türe spesifik olduğunu bildirmektedirler (Wood ve ark. 1992; Pollock ve ark.,1994). Araştırmalar TB ile enfekte edilmeyen bazı hayvanların antikorumlarının

saflaştırılmış MPB70 ile çapraz reaksiyon verdiğini saptamıştır (Wayne,1989; Wood ve ark., 1992). Wood ve ark. (1992), MPB70 antijeni kullandıkları ELISA'nın sensitivitesini %17 olarak saptamışlardır. Araştırmacılara göre MPB70'in antijenik özelliklerinin zayıf olduğu bulunmuştur. Pollock ve ark. (1994), M. bovis MPB70 antijeninin N. asteroides ve M. tuberculosis'e karşı oluşan antikorlarla çapraz reaksiyon verdiğini, türe spesifik epitoplardan (MPB70, 19.000MW ve MPB 57) 19.000Mw'in antijen olarak kullanıldığında M. bovis'e ve M. tuberculosis 'e dominant bu antijenle sonuçların daha olumlu olacağını bildirmektedirler.

Antikor–antijen reaksiyonları üzerine yoğunlaşan araştırmalar (Plackett ve ark.,1989) düşük sensitivite ve diğer mikobakteriyel antijenlerle çapraz reaksiyonlar nedeniyle M. bovis'in immun spektrumu göz önüne alınarak humoral yanıtın çok hücreli yanıtın önemli olduğu ve bunun ortaya çıkartılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Wood ve ark. (1990), in-vitro bir test olan γ -IFN testinin sığır tüberkülozunun tanısında kullanılabileceğini bildirmişler, Rothel ve ark. (1990), Wood ve ark. (1990) tarafından bildirilen testi geliştirerek pratik kullanımlı bir test haline getirmişlerdir.

Rothel ve ark. (1990), M. bovis'le enfekte sığırlarda hızlı ve güvenilir sensitivitesi yüksek bir test olan γ -IFN testinin kanda 25 pg/ml 'den daha düşük düzeylerde rekombinant sığır γ -IFN 'lerini ölçebileceğini ve bu testin geyik ,domuz ve insanlar dışında sığırlarla birlikte koyun ,keçi ve buffalolarda kullanılabileceğini bildirmektedirler. Araştırmacılar 12.000 den fazla sığır üzerinde uyguladıkları test sonucuna göre testin sensitivitesini %93.6 olarak saptamışlardır.

γ -IFN testinde bütün kan PPD antijenleri ile 16-24 saat inkube edilir. Kanda sıfır düzeyinde ve stabil olan γ -IFN yalnızca infeksiyon durumunda T lenfositlerince salgılanabilmektedir. Bu test sisteminde tam kan PPD antijenleri ile önce duyarlılaştırılarak ölçülebilir düzeyde γ -IFN salgılanması sağlanır , sonra plazma alınarak bir enzim immunoassay yardımıyla γ -IFN'a karşı Mab'la kaplı pleytlerde γ -IFN düzeyleri saptanır. Bilinen lenfosit

proliferasyonuna dayanan çalışmalara göre , γ -IFN test sisteminin spesifik hücresel immunitiyi ölçmede diğer testlere göre daha seri ve duyarlı olduğu bildirilmektedir (Wayne, 1989 ; Rothel ve ark., 1990 ; Wood ve ark., 1990).

Sığırlarda γ -IFN testinin kullanılmaya başlamasından itibaren , tam kan kültüründe IFN- üretimini etkileyen faktörler araştırılmaya başlanmıştır (Rothel ve ark.,1992). Bu konuda yapılan araştırmalarda optimal γ -IFN üretimi için, kanın alınmasından sonra 8 saat içerisinde PPD (20 μ g/ml) ile duyarlılaştırılmasına gerek duyulduğu görülmüştür (Rothel ve ark.,1992). Ayrıca post mortem alınan kanın kullanılması testin sensitivitesinde azalma meydana getirmiştir (Rothel ve ark., 1992).

Rothel ve ark. (1992), *M. bovis* ile deneysel enfekte 4, *M. avium* ile deneysel enfekte 4 ve tüberkülozla ilgili bir geçmişi bulunmayan bir çiftlikten 50 sığıra intradermal yolla 300 μ g miktarında PPD-B enjekte etmişlerdir. Daha sonra bu sığırlardan, düzenli aralıklarla kan alınarak γ -IFN testi ile incelemişlerdir. Araştırmacılar, kan örneklerinin toplanmasında kullanılan antikoagülanın da tam kan kültürlerinde γ -IFN üretimini büyük ölçüde etkilediğini bildirmektedirler. *M. bovis* ile enfekte bir hayvandan potasyum, EDTA (1,5 mg/ml.) sodyum sitrat (0,38) ya da lityum heparin (15 IU) içeren tüplere aldıkları kan örneklerini PPD ile inkübe etmişler, heparin içeren tüpe alınan plazmada γ -IFN'a rastlamışlar, ancak EDTA ya da sitrata alınan örneklerde γ -IFN'a rastlamadıklarını açıklamışlardır. Değişik tipte heparin tiplerinin (Li,Na,Ca,Mg veya Diosynth) kullanılmasının γ -IFN üretiminde bir değişiklik meydana getirmediğini, ancak PPD'nin çeşitli titrasyonlarının (0, 2, 5, 20, 50, 100 μ g/ml) tam kan kültürünün duyarlılaştırılmasında kullanılmasının farklı sonuçlar doğurduğunu görmüşler ve sonuç olarak testte PPD'nin 20 μ g/ml kullanılmasının uygun olacağını belirtmişlerdir.

Tam kan kültürünün 20 μ g/ml PPD ile duyarlılaştırılmasında γ -IFN salınmasının kinetiği 4, 8, 12, 16, 24, 32 saatlik inkubasyondan sonra toplanan tam kan kültürlerinde çalışılarak gösterilmiştir (Rothel ve ark.,1992). γ -IFN, PPD ile duyarlılaştırılmasından 4 saat sonra belirlenmiş 16 saatte

maksimuma ulaşmıştır. 16-32 saat arasında fazla bir değişiklik gözlenmemiştir (Rothel ve ark.,1992).

Rothel ve ark. (1992), saklama sıcaklığının ve süresinin, tam kan kültürlerinde γ -IFN düzeyine etkisini araştırmak amacı ile topladıkları kanları 4°C, 25°C ve 37°C'de tutarak incelemiştir. 0, 8, 24, 48 saat aralıklarla yapılan ölçümlerde, 25°C de 8 saat tutulan heparinize kanın değişikliğe uğramadığı ancak 24 saat sonra γ -IFN seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Kan kültürlerinin PPD ile duyarlılaştırılırken 25°C'de tutulmasının , 4°C veya 37°C'de tutulmasından daha iyi sonuç verdiği bildirilmektedirler.

Rothel ve ark. (1992), γ -IFN testinde sığır tüberkülozunun mezbahada izlenebilmesi için post-mortem alınan kan örneklerinde IFN- γ üretimini araştırmışlardır. M. bovis ile enfekte 6 sığır kesilerek v. jugularis'ten 5'er dakika ara ile ve 90 dakika süresince kan örneği toplanmıştır. Kesim öncesi toplanan kan örneklerine göre post-mortem alınan kanın γ -IFN üretimi, 4 sığırdan %50'den fazla düşüş göstermiştir. Araştırmacılar diğer iki sığırdan alınan örnekte, ölümden sonra 25 dakika ya da daha uzun sürenin γ -IFN üretiminde benzer bir düşmeye neden olduğunu görmüşlerdir.

Rothel ve ark. (1992), γ -IFN testinde aynı hayvandan alınan arteriyel ve venöz kanın karşılaştırılmasında hiçbir fark bulamamışlardır. Kültürde kullanılan malzemenin γ -IFN üretimine fazla etkisi olmadığı görülmüştür. 24 gözlü doku kültürü pleytleri, plastik santrifüj tüpleri veya serum şişelerinin kullanılmasının γ -IFN üretiminde herhangi bir farklılık doğurmadığı görülmüştür. Plazma örneklerinin hazırlanmasında kolaylık sağlaması açısından 24 gözlü pleytler en uygun gereçler olarak kabul edilmiştir. Kültür gözleri içinde inkübe edilen kanın miktarının 0,5-2,5 ml miktarlarında olmasının önemli bir değişikliğe yol açmadığı, daha geniş hacimli gereçlerin ise üst kısımdaki plazmanın toplanmasını zorlaştırdığı görülmüştür.

Wood ve ark.(1992), γ -IFN testinde hayvanların immun yanıtındaki günlük değişimleri *M. bovis* ile enfekte 2 sığırı kullanarak incelemiştir. Bu iki sığır 5 gün süre ile günde bir kez test edilmiş; bunlardan her gün aynı saatlerde kan alınarak, kan kültürleri kan alındıktan yaklaşık iki saat sonra hazırlanmıştır. Bazı hayvanlarda γ -IFN üretimi günden güne değiştiği halde, avian ve bovine PPD örnekleri arasında yanıtın birbirine yakın olduğu ve sürenin PPD'lere gösterilen reaksiyon türüne etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Tam kan kültüründen elde edilen plazma örneklerinin -20°C ' de 1 yıl, 4°C 'de 2 ay steril şartlarda saklandığı takdirde γ -IFN düzeyinde değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Rothel ve ark ., 1992).

Wood ve ark. (1992), single intradermal (SID) testin, γ - IFN testinin spesifitesine etkisini incelemek amacı ile hastalısız bir sürüden 50 sığıra kaudal 300 μg PPD-B uygulamışlardır. Bu hayvanlardan SID testinden önce alınan kan örnekleri ile testten sonra haftada bir ve 4 hafta süreyle alınan kan örneklerine γ - IFN testi uygulamışlardır. PPD-B ile uyarılan örneğin PBS için OD değerinin 0,05'ten yukarı olması ve PPD-A ile stimüle edilen örneğin OD'sine eşit ya da yukarısında olması durumunda hayvanı γ - IFN pozitif olarak kabul etmişlerdir. Araştırmacılar bu kriter kullanılarak her testte hatalı pozitiflerin sayısını sırasıyla 1,0, 1, 1 ve 2 olarak belirlenmiştir. Bu kriterlere göre hiçbir hayvan hatalı pozitif sonuç vermemiştir.

Rothel ve ark. (1992), *M. bovis* ile enfekte 4 ve *M. avium* ile enfekte 4 olmak üzere toplam 8 sığıra uygulanan SID testinin, γ -IFN testi üzerindeki etkisini incelemek amacı ile yaptıkları araştırmada, SID testinden hemen önce ve haftada iki defa , sekizbuçuk hafta süre ile toplanan kan örnekleri PBS, PPD-A ve PPD-B ile duyarlılaştırılmış ve bu örnekler γ -IFN üretimine etkisi yönünden test edilmiştir. SID testinden sonra γ -IFN yanıtının 3 ile 5. haftalar arasında üst seviyede olduğu görülmüştür. SID testinden sonraki 59. günden sonra bu artan yanıt pre-SID değerlerine dönmemiştir. Ancak *M. bovis* ile enfekte sığırlardan ikisi SID sonrası 7 günlük bir periyotta γ -IFN

yanıtında belirgin bir düşüş göstermiştir. PPD-B ve PPD-A'ye karşı oluşan yanıtın oranlarında fazla bir farklılık saptanmadığını bildirmişlerdir. Radunz ve Lepper (1985) SID testinin sığırlarda en az 60 gün süre ile immun yanıtı devam ettirdiğini bu nedenle SID testi yapılan hayvanlarda PPD-B ve PPD-A'ya karşı yanlış sonuçlar elde edilebileceğini bildirmektedir. Rothel ve ark. (1992), enfekte olmayan hayvanların kanlarında γ -IFN üretimi üzerinde SID testinin hiçbir etkisinin bulunmadığını, bununla beraber *M. bovis* ile enfekte 2 sığırda çok hızlı bir yükselmenin görüldüğünü, SID testinden 7 gün sonra PPD'ye spesifik γ -IFN üretiminde belirgin bir düşüş göstermediğini bildirmişlerdir. Araştırmada tüberkülin uygulanan tüberküloz negatif hayvanlarda γ -IFN testinde yanlış bir sonuç saptanmamıştır. Doherty ve ark. (1995), PPD-B ve PPD-A uygulanan sığırlardan 7 gün sonra alınan kan örnekleri ile yaptıkları LPA ve γ -IFN testlerinde, PPD uygulanan hayvanlarda lenfosit blastogenezis'inin azaldığını ancak γ -IFN üretimi üzerinde herhangi bir etki göstermediğini saptamışlardır.

Jones ve ark. (1992), γ -IFN testinde reaksiyona giren proteinlerin antijene bağlanma bölgelerinin dışındaki bölgelerde spesifiteye sahip olduklarını bu nedenle testte hatalı pozitif reaksiyonlar görülebileceğini saptamışlardır. Araştırmacılar testte bu tür etkileşimleri önlemek için plazma örneklerinin %1 kazein - %0.05 PBS - tween eklenmiş normal fare serumu ile sulandırılmasını ve normal Ig yerine $F(ab')_2$ antikor fragmantının kullanılması gerektiğini söylemektedirler. γ -IFN testinde aynı IgG_1 izotopuna sahip olan ve fare gamma globulini ile çapraz reaksiyon veren bovine RF'lerince kolay bağlanabilen spesifik olmayan monoklonal antikorlar (IFN-2, IFN-9) kullanılan çalışmada sığır, insan ve kedilerin serumlarında, fare immunglobulinlerine karşı oluşan heterofilik antikorlar hatalı pozitifliklere neden olabilmektedir. Araştırmacılar, spesifik olmayan bu reaksiyonların giderilmesi için pleyt gözlerinin IFN9 $F(ab')_2$ monoklonal antikor fragmantları ile kaplanması ve numunenin %5 oranında allotipik olarak uyumlu NMS ile karıştırılması gerektiği sonucuna varmışlardır.

Sığır tüberkülozunun teşhisinde uygun güvenilir ve pratik testlerin bulunabilmesi için yapılan araştırmalar testler arasında duyarlılıklarını araştırılması ile mümkün olabilmektedir. Wood ve ark. (1992), tüberkülin, ELISA ve γ -IFN testi yapılan hayvanlarda test sonuçlarında sırasıyla spesifite değerlerini %96.7, %96.4, %99.1 ve sensitivite değerlerini % 68.1, %18.1, %81.8 olarak bulmuşlardır. Ayrıca araştırmacılar γ -IFN 'de MPB70 antijeninin, PPD-B yerine kullanıldığında sensitivitede herhangi bir yükselmenin olmadığını ancak spesifitenin yükseldiğini saptamışlardır.

Ritacco ve ark. (1991), kesimhanede, hayvanlardan kesimden hemen sonra topladıkları kan örnekleri ile ELISA ve γ -IFN testi uygulamışlardır. Tüberküloz lezyonları görülen 39 sığırdan 21'i (%53.8) γ -IFN testinde pozitif sonuç verirken, ELISA' da 14'ünü (35.9) pozitif bulabilmişlerdir. Araştırmacılar γ -IFN testinin ELISA'ya göre daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Neill ve ark. (1994b) tüberkülin negatif 98 sığır kan örnekleri ile uyguladıkları LPA, ELISA (PPD-B ve fosfatit ekstratı kullanılarak) ve γ -IFN testlerinde, LPA'da 32, ELISA (PPD-B) 'da 4, ELISA (fosfatit)'da 18 ve γ -IFN testinde 98 hayvanı pozitif bulmuşlardır. Ayrıca araştırmacılar 15 hayvandan M. bovis'i izole etmişlerdir. Araştırmacılara göre bazıları anejik, bazıları infeksiyonun başında olan bu hayvanlarda γ -IFN testi bütün pozitiflikleri saptayabilmiştir.

Whipple ve ark. (1995), tüberkülin testi ile γ -IFN testini karşılaştırmışlar, tüberkülinin sensitivitesini %80.4-%84.4, γ -IFN testinin sensitivitesini ise, %55.4-%97.1 saptamışlardır. Araştırmacılar bu sonuçlara göre tüberkülinin duyarlılığının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Streeton ve ark. (1998), 952 kan örneği ile yaptıkları çalışmada γ -IFN testinin sensitivitesini %90, spesifitesini %98 bulmuşlardır. Araştırmacılara göre insanlarda tüberkülozun teşhisinde γ -IFN testinin kullanılması uygun ve pratik bulunmuştur.

Lilenbaum ve ark. (1999), tüberkülin testi ve γ -IFN testi yapılan hayvanlarda elde ettikleri sonuçlara göre γ -IFN testinin ,tüberkülin testinden 60-120 gün daha erken pozitiflikleri saptayabildiğini ve bu testlerin beraberce hastalığın teşhisinde kullanılmasının daha doğru olacağı sonucuna varmışlardır.

Morrison ve ark. (2000) Avustralya ve Kuzey İrlanda'da yapılan çalışmalarda tüberkülin ve γ -IFN testi sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Tüberkülin testi sensitivite ve spesifite sonuçları Avustralya'da %68.1, %96.7, Kuzey İrlanda'da %83.1, %84.3 bulunurken , γ -IFN test sonuçları Avustralya'da %81.8, %99.1 ve Kuzey İrlanda'da %84.3 ve %99.6 saptanmıştır. Bu sonuçlara göre γ -IFN testinin spesifitesinin tüberkülin testi ile benzerlik gösterdiği, sensitivitesininin yüksek olduğu bildirilmektedir.

Hayvanlarda tüberkülozun eradike edilmesine yönelik tanı çalışmalarının yanı sıra hayvanları hastalıktan korumaya yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Hayvanların tüberküloza karşı korunmasında, insanlarda 1920 yılından beri etkili bir şekilde kullanılan BCG nin denemeleri yapılmaktadır. Aşının etkinliği henüz bilinmemektedir. Ayrıca sığır tüberkülozunun tanısında kullanılan testlerde yanlış sonuçlar vermektedir. Ayrıca enfekte hayvanlarda hastalığı şiddetlendirmektedir . Sığırlarda oral, derialtı , deri içi olarak kullanılan mikobakteri suşlarından hazırlanmış canlı veya ölü aşılarda çalışmalara devam edilmektedir (Newell ve Hewinson, 1995).

Bu çalışmada, Türkiye'de periyodik tüberküloz kontrolleri yapılan işletmelerden seçilen örnekler ve geçmişte tüberkülozla enfekte olmuş ahırlardan seçilen örnekler kullanılarak sığır tüberkülozunun serolojik teşhisinde ELISA'nın duyarlılığının γ -IFN testi ile karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır. ELISA ve γ -IFN testinin Türkiye'de sığır tüberkülozunun teşhisinde kullanılabilirliğinin karşılaştırılması çalışması, bir ilk olması ve bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı düşüncesi ile orijinal nitelik taşıdığı düşünülmektedir.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Materyallerin Toplanması

Sığır tüberkülozunun serolojik teşhisi amacıyla; ELISA ve γ -IFN testlerinde kullanılan kan örnekleri Tarım İşletmelerine bağlı 3 çiftlikten (A,B,C) periyodik olarak her yıl yapılan tüberkülin testinde negatif sonuç veren ve klinik olarak tüberküloz belirtileri göstermeyen kontrollü 2 yaş üstü hayvanlardan 536 adet ve Ankara çevresinde 2 köyden (D,E) tüberküloz belirtileri göstermeyen tüberkülin testi yapılmayan kontrolsüz 2 yaş üstü hayvanlardan 210 adet lityum heparinli ve normal kan tüplerine alınarak temin edildi (Çizelge 2.1.). Normal kan tüplerine alınan kanların serumları çıkartıldı ve numara verilerek -20 °C'de saklandı lityum heparinli tüplere alınan örnekler antijenle duyarlılaştırıldıktan sonra numaralandırılarak -20 derecede saklandı. 746 serum örneği ELISA ile test edilerek tüberküloz negatif ve pozitif olarak ayrıldı. Negatif çıkan örneklerin lityum heparinli tüplere alınan karşılıkları (75 adet) ile pozitif çıkan örneklerin lityum heparinli tüplere alınan karşılıkları (75 adet) γ -IFN testinde kullanıldı.

Çizelge 2.1. : Toplanan örneklerin kaynak ve sayıları

Kaynak		PPD tüberkülin test sonucu	Yaş	Sayı
İşletme	A	Negatif	>2	140
	B	Negatif	>2	223
	C	Negatif	>2	173
Köy	D	Test edilmedi	>2	142
	E	Test edilmedi	>2	68
Toplam				746

2.2. Standart Suşlar ve Serumlar

ELISA 'da antijen hazırlamak için kullanılan M. bovis AN/5 suşu Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tüberküloz-Paratüberküloz

ve Ruam Teşhis Laboratuvarı'ndan, 2 negatif, 2 pozitif referans kontrol serumları ID-Lelystad 'tan (Hollanda), 18 negatif, 18 pozitif kontrol serumları ise Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tüberküloz-Paratüberküloz ve Ruam Teşhis Laboratuvarı'ndan sağlandı.

2.3. Besiyerleri

M. bovis AN/5 suşununun pasajı ve antijen üretimi için, aşağıda açık formülü verilen Lowenstein Jensen ve BAI (Modifiye Dorset Henley) sentetik besi yerleri kullanıldı.

Lowenstein Jensen besiyeri (Finegold and Martin , 1982)

L- Asparajin	3.60	g
Potasyum fosfat , monobazik	2.40	g
Magnezyum sülfat	0.24	g
Magnezyum sitrat	0.60	g
Patates flour	30.00	g
Malaşit Yeşili	0.40	g
Distile su	600	ml

121⁰C'de 15 dakika tutularak sterilize edilen yukarıdaki solüsyona 12 ml gliserin ve 1000 ml tavuk yumurtası içeriği eklenerek besiyeri hazırlandı. Tüplere dağıtılan besiyeri 85 ⁰C'de 56 dakika tutularak steril hale getirildi. Besiyeri sterilite kontrolü için 37⁰C'de 2 gün bekletildi.

BAI (Modifiye Dorset Henley) besiyeri (Henley , 1935; Svenkerud, 1955)

L -Asparajin	12.0	g
Potasyum dihidrojen fosfat	1.08	g
Sodyum sitrat	0.90	g
Magnezyum sülfat	1.51	g
Ferrik sitrat	0.31	g

Glukoz	10.0 g
Gliserin	80 ml
Distile su	1000 ml

Her bir kimyasal madde ayrı ayrı distile suda eritilerek 1 litrelik besiyeri hazırlandı. pH 6.8' e ayarlanarak 2 litrelik fleming's şişesine konuldu. 121 °C de 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri sterilite kontrolü için 37°C'de 2 gün bekletildi.

2.4. Test Malzemeleri

Mikropleytlar: ELISA ve γ -IFN testinde 96 çukurlu F tabanlı polisteren mikropleytlar (Maxi Sorp ,Nunc,Danimarka) kullanıldı .

Otomatik Pipetler : 12 kanallı 50 μ l'lik (Socorex), 8 kanallı 100 μ l'lik (Socorex) çok kanallı pipetlerle, tek kanallı 10 μ l'lik (Rainin), 50 μ l'lik (Biohit) 1ml'lik (Gilson) pipetler kullanıldı.

Okuyucu: 405 ve 450 nm filtreleri bulunan okuyucu (DYNATEC MR5000 V Dynatec laboratories Inc. Alexandra. VA) kullanıldı.

Pleyt Çalkalayıcı : 1100/dakikalık çalkalayıcı (Ika schütler) kullanıldı.

Filtreler: Antijenin hazırlanmasında ve sterilize edilmesinde, Whatman No 14 kağıtları, 0.45 μ l'lik ve 0.2 μ m'lik membran filtreler (Sartorius) kullanıldı.

Mikropleyt yıkayıcı : Testerde pleytlari yıkamak amacıyla 250 ml'lik plastik manuel pisuvarlar (Azlon, İngiltere) kullanıldı.

Steril vakumlu normal kan tüpü : ELISA'da 10ml'lik tüpler (Vanoject,Leuven,Belçika) kullanıldı.

Steril vakumlu lityum heparinli kan tüpü: GIFT'te 10ml'lik tüpler (Vanoject,Leuven,Belçika) kullanıldı.

2.5. ELISA Reagentler'i

Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS) : pH 7.4 olan PBS paket (Sigma Chemical Co) ticari olarak temin edildi. 1 litre deiyonize suda 1 paket içeriği (0.138 M NaCl 0.0027 M KCL) eritilerek PBS solüsyonu hazırlandı.

PBS / Tween solüsyonu : ELISA'da pleytlerin yıkanmasında kullanılmak üzere PBS solüsyonununun 1/5 oranında distile su ile sulandırılması ve %0.05 Tween 20 (Merck Chemical Co) katılması ile hazırlandı.

PBS / Tween / Sığır Serum Albumin (BSA) solüsyonu : PBS solüsyonuna %1 Sığır Albumini (Fraction V, Sigma Chemical Co) ve %0.5 Tween 20 eklenerek hazırlandı. Bu solüsyon serumların sulandırılmalarında ve konjugat hazırlanmasında kullanıldı.

Karbonat Buffer Solüsyonu : Antijen sulandırılmasında kullanılmak üzere kapsül formasyonunda (Sigma Chemical Co) ticari olarak temin edildi. Bir kapsül 100 ml deiyonize suda eritilerek solüsyon hazırlandı (pH 9.6). +4⁰C'de saklandı.

Konjugat : ELISA'da kullanılan konjugat, tavşanda hazırlanmış ve peroksidazla işaretlenmiş antibovine Ig (H+L) (Sigma Chemical Co) ticari olarak temin edildi. -20⁰C'de saklandı.

Sitrat Buffer Solüsyonu: Aşağıdaki formüle göre hazırlandı.

Buffer 1

Sitrik asit monohidrat	4.2 g
Distile su	200 ml

Buffer 2

Sodyum di-hidroksifosfat 12 H ₂ O	7.16 g
Distile su	200 ml

Buffer 1 ve Buffer 2 eşit oranda karıştırılarak solüsyon elde edildi (pH 4).

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Solüsyonu : Hidrojen peroksinin %30 'luk ticari solüsyonundan (Sigma Chemical Co) substrata katılmak üzere distile su ile %3 'lük solüsyonu hazırlandı. +4 °C'de saklandı.

Substrat : ELISA'da kullanılan substrat, sitrat buffer solüsyonuna, 2.2 azinobis (3-ethyl benzthiazoline sulphonic acid) (Sigma Chemical Co) ve H₂O₂ solüsyonununun karıştırılması ile elde edildi, +4 °C'de saklandı.

Stop Solüsyonu : 1M Sülfirik asit (H₂SO₄) solüsyonu kullanıldı.

2.6. ELISA

2.6.1. ELISA Antijeni

M.bovis AN5 suşundan Weybridge yöntemi ile antijen hazırlandı (Svenkerud, 1955; Magnusson ve ark.,1963). M. bovis AN5 suşu LJ besi yerine ekildi. 2 hafta 37 °C de inkube edildi. Süre sonunda kültürden, erlenmayerlere hazırlanan BAI besi yerine steril şartlarda ekim yapıldı. 37°C de 20- 30 gün sonra yeterli yoğunlukta üremesi görülen bakterinin peliküllerinden alınarak Fleming's şişelerine ekildi. 37°C de 8 hafta inkube edildi. Bu sürenin sonunda Fleming's şişeleri 100 °C de 3 saat tutularak mikroorganizmaların ölmesi sağlandı. Şişeler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Şişe içeriği bakır telden yapılmış elekten (85 Mesh Wire stainers) süzüldü. Süzülen içerik yeniden Whatman No 14 kağıtlarından hazırlanan süzgeç hamurundan geçirildi. Elde edilen filtratlar steril kaplarda toplandı. Tüberkülo- proteinleri elde etmek için %40'lık triklorasetik asit süzölmüş filtratın içerisine son konsantrasyonu %4 olacak şekilde ilave edilerek çöktürüldü. Üstteki sıvı kısım sifon edilerek atıldı. Dipteki kalan kısım PPD tüberkülin hazırlanması için kullanıldı. PPD proteini %1'lik ve % 0.6'lık triklorasetik asitle ve %10 sodyum klorürle birer kez yıkandı. Yıkanan protein konsantrasyonu 0.1 N NaOH solvent ile eritildi. Elde edilen konsantre sıvıdaki protein miktarı semimikro -kjeldahl metodu kullanılarak tespit edildi. Protein miktarı belirlenen PPD tüberkülin 0.2 µm'lik filtre kağıdından geçirilerek sterilize edildi.

2.6.1.1. Antijen Titresinin Belirlenmesi

Test için 96'lık düz tabanlı pleytler kullanıldı. Hazırlanan antijen, total proteini (1.85 mg/ml) baz alınarak karbonat buffer içerisinde 10 µg/ml protein miktarı olmak üzere 2 katlı olarak 320 µg/ml' ye kadar 1 ml' lik pH nötr şişelerde ayrı ayrı sulandırıldı. Pleytlerin ilk dikey sırasına 10 µg/ml antijen sulandırılmasından 50 µl konuldu. Diğer sıralara sırasıyla 320 µg/ml ye kadar sulandırılan antijenlerden 50' şer µl konuldu. Pleytler, pleyt sallayıcısında 1-2 dakika tutularak antijenin pleyt gözünde homojen dağılması sağlandı. Pleytler 37 °C'de 1 saat tutuldu ; sonra +4 °C'de 1gece inkubasyona bırakıldı .

Ertesi gün pleytlerin gözlerinde kalan antijenler vakumla çekildi. Hazırlanan ELISA yıkama solüsyonu ile pleytler 3 kez yıkandı son yıkamada yıkama solüsyonu pleytde 3 dakika bekletildi. Diğer taraftan negatif ve pozitif serumlar 1 ml lik nötr şişelerde 1/25'den başlayarak 1/1600'a kadar 2 katlı olarak serum sulandırma solüsyonu ile sulandırıldı. Sulandırılan serumlar, yıkanan pleytlerin 1. sırasından başlamak üzere dikey olarak 50 µl konuldu. Pleytler 1-2 dakika sallayıcıda tutuldu ve nemli ortamda 37 °C 'de 1 saat inkube edildi. Süre sonunda pleytler 3 kez yukarıda anlatıldığı gibi yeniden yıkandı. Daha sonra bütün gözlerle 1/1500 oranında sulandırılan konjugattan 50 µl eklenerek yeniden nemli ortamda 37 °C 'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Pleytler yeniden 3 kez yıkandı son yıkamada 3 dakika bekletildi. Pleytlere hazırlanan substrattan 100 µl konuldu ve oda ısısında, karanlık ortamda 30 dakika bekletildi . Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 0.1 M H₂SO₄ solüsyonundan 100 µl ilave edildi . Pleytler 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okunarak sonuçlar optik olarak değerlendirildi.

2.6.2. Konjugatın titresinin belirlenmesi

ELISA'da konjugatın titresinin belirlenmesinde önceden saptanan uygun antijen miktarı ile pleytler kaplandı yukarıda antijen titrasyonunun belirlenmesinde anlatıldığı gibi testin aşamalarına geçildi. Serum konulduktan sonra inkube edilen ve yıkanan pleytlere 1/500 den başlamak üzere 1/4000'e

kadar sulandırılan konjugattan konuldu. İnkubasyondan sonra yıkanan ve substrat konulan pleytlerdeki reaksiyon durdurularak negatiflik ve pozitiflik değerleri optik okuyucuda değerlendirildi. Bulunan değerlerin ara değerlerini saptamak için, test konjugatın bu ara değerlerde sulandırılmasıyla yeniden tekrarlandı ve uygun konjugat titresi belirlendi.

2.6.3. ELISA'nın yapılışı

ELISA , Ritacco ve ark. (1987), bildirdikleri yöntemine göre yapıldı. Öncelikle, testte serum, antijen ve konjugat titrasyonları yapılarak uygun değerler tespit edildi.

Mikropleytlerin bütün gözlerine karbonat buffer'la sulandırılmış PPD antijeninden 50 µl konuldu. Pleytler, pleyt sallayıcısında 1 dakika karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 1 saat tutuldu. Pleytler +4 °C'de 1 gece inkube edildi. Pleytler yıkama solüsyonu ile yıkandı son yıkamada 3 dakika beklendi. Her bir göze ikişerli olmak üzere % 1 sığır albumini ve %0.5 Tween 20 içeren PBS ile 1/200 oranında sulandırılmış şüpheli serumlardan konuldu. Dikey son 4 gözün ikisine pozitif, ikisine negatif referans serumlarından 50 µl konuldu. Rutubetli ortamda 37 °C'de 1 saat inkube edildi. Süre sonunda pleytler yukarıda anlatıldığı gibi yeniden 3 kez yıkandı. Pleytlere 50 µl konjugat konulup 1 saat 37 °C'de inkube edildi. Pleytler tekrar 3 kez yıkanarak 100 µl substrat solüsyonu konularak 30 dakika oda ısısında bırakıldı. Reaksiyonu durdurmak için 0.1 M H₂SO₄ konuldu. Pleytler 405 nm dalga boyunda okunarak sonuçlar fotometrik olarak değerlendirildi.

2.7. GIFT (γ-IFN testi)

γ-IFN testinde kullanılan 150 örneklilik kit materyali CSL şirketinden (CSL limited, 45 Poplar Road , Parkville 3052, Victoria, Avustralya) temin edildi. Test Rothel ve ark.'nın (1990), bildirdiği yöntemine göre yapıldı.

2.7.1. Sığır γ -IFN Testi Kit Materyali

Pleytler : γ -IFN ye karşı antikorla kaplı 15 örneklilik 10 mikropleyt kullanıldı. Mikropleytlere test yapılmadan önce plastik kapları içerisinde en az 30 dakika önce oda ısısında tutuldu.

Negatif ve Pozitif Kontrol Serumları : 1'er ml'lik negatif ve pozitif serumlar ayrı ayrı 1 ml deiyonize suyla eritildikten sonra +4 °C de saklandı. Testte kullanılmadan önce iyice karıştırıldı ve oda ısısına gelmesi beklendi.

Green Diluent : 60 ml sulandırma sıvısı testte kullanılmadan önce iyice karıştırılarak, oda ısısına getirildi ve plazmaların sulandırılmasında kullanıldı.

Blue Diluent : 25 ml konjugat sulandırma sıvısı olarak 1/5 oranında distile suyla sulandırılarak kullanıldı. +4 °C de saklandı.

Yıkama solüsyonu: 125 ml olan yıkama solüsyonu 1/20 oranında distile suyla sulandırıldı.

Konjugat : Anti-bovine γ -IFN ile işaretlenmiş horseradish-peroksidaz kullanıldı. Konjugat 1.5 ml deiyonize suda eritildi . + 4 ° C'de saklandı. Testte blue diluent ile karıştırılarak 5 dakika içerisinde kullanıldı.

Kromojen Solüsyonu : 1.5 ml kromojen solüsyonu enzim substrat solüsyonu içerisine katıldı.

Enzim Substrat Buffer Solüsyonu : H₂O₂ içeren 125 ml'lik hazır solüsyon kullanıldı. Kromojen solüsyonu ile karıştırılarak 10 dakika içerisinde testte kullanıldı.

Enzim Stop Solüsyonu :0.5 M H₂SO₄ reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

2.7.2. Kan kültürünün duyarlılaştırılması

Testte kullanılacak sığırların venöz damarlarından 15 IU/ml lityum heparin içeren tüplere 10 ml miktarında alınan kan örnekleri numaralandırıldı ve 8 saat içerisinde her bir kan örneği, 24'lük doku kültürü pleytlerine 1.5 'er ml

dağıtılarak, örneklerin konulduğu pleytlere sırasıyla 1. göze 100µl PBS, 2. göze 100µl PPD-B (20µg/ml) ve 3. göze 100µl PPD-A (20µg/ml) konuldu. Kan örneklerinin PBS, PPD-B ve PPD-A ile iyice karışması pipetle karıştırılarak sağlandı. Örnekler 37°C de 18 saat tutulduktan sonra üst kısımdan plazmaları 96'lık pleytlere alındı. Örnekler -20 °C de saklandı.

2.7.3. γ - IFN testinin yapılışı

γ - IFN testi, Rothel ve ark.'nın (1990), bildirdikleri yöntemine göre yapıldı. Teste başlamadan önce konjugat dışında bütün reagent'lar oda ısısında yarım saat tutuldu .

Teste önce mikropleytin bütün gözlerine 50 µl green dilüent konuldu. Test edilecek örnekler şu şekilde pleytda sıralandı, PBS konulan plazma örnekleri, mikropleytin 1. ve 4. gözlerine, avian antijeni ile duyarlılaştırılan örnekler pleytin 2. ve 5. gözlerine, bovine antijeni ile duyarlılaştırılan örnekler ise 3. ve 6. gözlerine bir plazma örneği iki göze ikiye bölünmüş üzere dikey olarak 50 µl konuldu. Pozitif - negatif kontroller ikiye bölünmüş olarak mikropleytin son altı gözüne 1 pozitif ve 2 negatif olarak konuldu. Mikropleytler, pleyt sallayıcı ile 1 dakika karıştırıldı. Pleytler oda ısısında 1 saat bekletildi. Süre sonunda mikropleyt içeriği vakumla atılarak hazırlanan yıkama solüsyonu ile 6 defa yıkandı. Konjugat ,Blue diluent ile sulandırıldı ve bütün gözlere 100 µl konuldu. Pleytler oda ısısında 1 saat bekletildi ve yeniden 6 kez yıkandı. Son yıkama işleminden sonra, hazırlanan enzim substrat solüsyonundan bütün gözlere 100 µl konuldu. Pleytlerin üstü kapatılarak ışık almaması sağlandı. 30 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda bütün gözlere 50 µl stop solüsyonu konuldu. Pleytler 450 nm'lik filtrede okundu. Sonuçlar optik olarak değerlendirildi. Negatiflik ve pozitiflik kit açıklamalarına göre şu şekilde değerlendirildi. Antijensiz (PBS) pleyt gözlerine konulan örneklerin 450 nm'de OD'si belirlendi aynı örneğin PPD 'li OD'si de belirlendi. PPD 'li örneğin OD değeri ile PBS 'li örneğin OD değeri arasındaki farkın 0.100 ve/veya daha yukarı olması durumunda örnek tüberküloz pozitif kabul

edildi. Farkın 0.100'den daha az olması durumunda örnek negatif kabul edildi.

2.8. İstatistiksel Analizler

ELISA ile γ -IFN testlerinden elde edilen sonuçların karşılaştırılmasında χ^2 yöntemi kullanıldı (Martin ve ark.,1987).



3.BULGULAR

3.1. ELISA

3.1.1. Antijenin total protein miktarı

ELISA antijeni olarak kullanılacak PPD 'in total protein miktarı 1.85 mg/ml bulundu.

3.1.2. Antijen titrasyonu sonucu

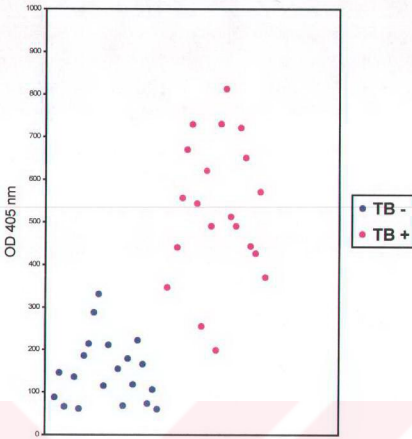
Antijen titrasyon çalışmaları sonucunda, ELISA'da 40 µg/ml miktarında antijenle kaplı pleytlerin testte kullanılması uygun bulundu.

3.1.3. Konjugat titrasyonu sonucu

ELISA'da konjugatın değişik değerlerde sulandırılarak kullanılmasından elde edilen sonuçlara göre en uygun sulandırmanın 1/1500 olduğu saptandı ve bu değer testte kullanılması uygun bulundu.

3.1.4. Negatiflik kriterlerinin belirlenmesi

20 pozitif ve 20 negatif kontrol serumunun farklı değerlerde sulandırılarak ELISA'da kullanılmasından elde edilen sonuçlara göre negatif ve pozitif ayrımının yapılabildiği en uygun serum sulandırma değerinin 1/200 olduğu saptandı (Şekil 3.1.). Bu sulandırma oranı testte kullanıldı. Testte tüberküloz negatif serumların OD değerleri ortalaması 0.148 ± 0.017 olarak hesaplandı Bu ortalama değere 2SD değeri eklenerek (0.148 ± 0.153) ayırım değeri (cut-off) saptandı. Cut-off = 301 bulundu. Bu değer üstünde OD değerine sahip örnekler ELISA'da pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. ELISA'da negatif ve pozitif serumların OD'leri

3.1.5. ELISA sonuçları

Toplanan 746 serum örneği ELISA'da değerlendirildi (Şekil 3.3.). Cut-off değerlerine göre serumların negatif veya pozitif olarak ayrılması her pleyt için ayrı yapıldı. ELISA'da örneklerin 164' ü (%22) pozitif , 582 'si (%78) negatif bulundu . Kontrollü hayvanlarda (A,B,C) 57 (%11) pozitif, 479 (%89) negatif , kontrolsüz hayvanlarda 107 (%51) pozitif , 103 (%49) negatif sonuç bulundu.

Sonuçların işletme ve köylere dağılımları çizelge 3.1.'de verilmiştir .

Çizelge 3.1. ELISA'da negatif ve pozitif serumların işletme ve köylere göre dağılımı

Kaynak		Pozitif (%)	Negatif (%)
İşletme	A (n=140)	17 (%12)	123 (%88)
	B (n=223)	21 (%9)	202 (%91)
	C (n=173)	19 (%11)	154 (%89)
Toplam (n=536)		57 (%11)	479 (%89)
Köy	D (n=142)	63 (%44)	79 (%56)
	E (n=68)	44 (%65)	24 (%35)
Toplam (n=210)		107 (%51)	103 (%49)
GenelToplam (n=746)		164 (%22)	582 (%78)

*Hayvan sayısı

3.2. γ -IFN Testi

3.2.1. γ -IFN testinde kullanılan örnekler

ELISA'da kontrollü hayvanlarda negatif çıkan örneklerden 75 adedi (%15) ve kontrolsüz hayvanlardan pozitif çıkan örneklerden 75 adedi (%70). γ -IFN testinde kullanıldı.

γ -IFN testinde kullanılan örneklerin işletme ve köylere göre dağılımları çizelge 3.2.' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. γ -IFN testinde kullanılan örneklerin işletme ve köylere göre dağılımı

Kaynak		ELISA Pozitif	ELISA Negatif
İşletme	A	-	19
	B	-	32
	C	-	24
Köy	D	44	-
	E	31	-
Toplam		75	75

3.2.2. γ -IFN testi sonuçları

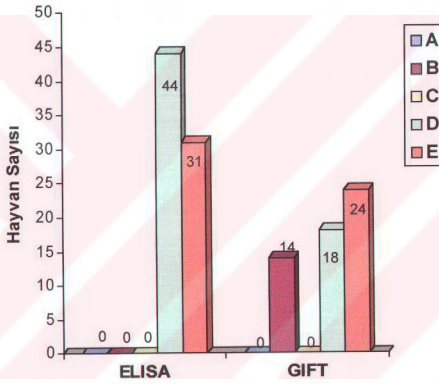
ELISA 'da 75 pozitif ve 75 negatif sonuç veren örneklerden, γ -IFN testinde D ve E'den seçilen örneklerde 42 (%56) pozitif, 33 (%44) negatif, A,B ve C'den seçilen örneklerde 61 (%81.4) negatif, 14 (%18.6) pozitif sonuç bulundu (Şekil 3.4.). Örneklerin, testte toplam olarak 56'sının (%37.3) pozitif, 94'ünün (%62.7) negatif sonuç verdiği saptandı (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. γ -IFN testi sonuçlarının kaynaklara göre dağılımları

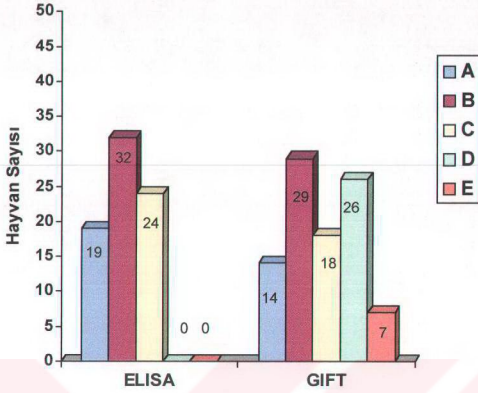
Kaynak		Pozitif	Negatif
İşletme	A	-	14 (%19)
	B	14 (%18)	29 (%39)
	C	-	18 (%24)
Köy	D	18 (%24)	26 (%35)
	E	24 (%32)	7 (%9)
Toplam		56 (%37.3)	94 (%62.7)

3.3. ELISA ve γ -IFN testlerinin sonuçlarının karşılaştırılması

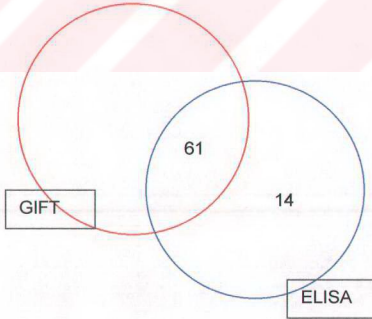
ELISA 'da pozitif bulunan 75 örnek, γ -IFN testinde 42'si (%56) pozitif, 33'ü (%44) negatif bulundu (Şekil 3.5.). ELISA'da negatif bulunan 75 örnek , γ -IFN testinde 61'i (%88) negatif, 14'ü (%18) pozitif bulundu (Şekil 3.4.). Her iki teste kaynaklara göre pozitif sonuçların karşılaştırılmaları Şekil 3.2.'de, negatif sonuçların karşılaştırılmaları Şekil 3.3.'de verilmiştir .



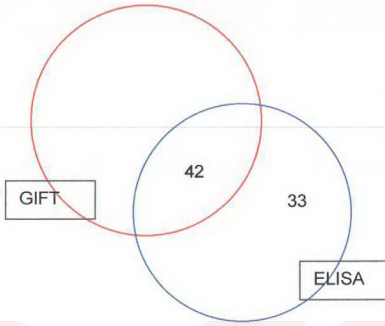
Şekil 3.2. ELISA ve GIFT'te pozitif örneklerin kaynaklara göre karşılaştırılmaları.



Şekil 3.3. ELISA ve GIFT'te negatif örneklerin kaynaklara göre karşılaştırılmaları.



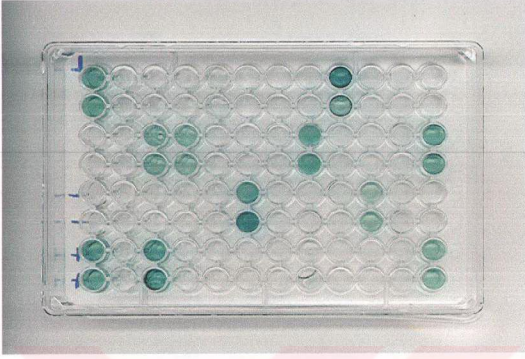
Şekil 3.4. ELISA'da negatif bulunan örneklerin GIFT ile karşılaştırılmaları



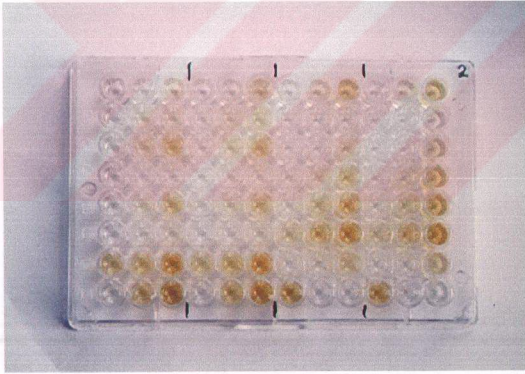
Şekil 3.5. ELISA'da pozitif bulunan örneklerin GIFT ile karşılaştırmaları

3.4. İstatistiksel Analizlerin Sonuçları

Her iki testten elde edilen sonuçlar χ^2 metodu ile karşılaştırılmıştır. Pozitif örneklerde $\chi^2 = 11.38$, negatif örneklerde $\chi^2 = 2.88$ ve testlerin genel sonuçlarının değerlendirilmesinde $\chi^2 = 4.9$ olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel yöneme göre pozitif sonuçlar arasındaki fark ($p < 0.001$) önemli, negatif sonuçlar arasındaki fark ($p > 0.05$) önemsiz ve test sonuçlarının ortak değerlendirilmesinde testler arasında fark ($p < 0.01$) önemli bulunmuştur.



Şekil 3.6. ELISA



Şekil 3.7. γ -IFN testi.

4. TARTIŞMA

Günümüzde sığır tüberkülozunun tanısı ve kontrolü en önemli problemlerden biridir. Organizmanın canlıda oluşturduğu immün yanıtın karmaşıklığı hastalığın tanısını ve dolayısıyla eradikasyonunu da zorlaştırmaktadır (Thorns ve ark.,1983).

Tüberkülin testinin uygulanması ile *M. bovis* infeksiyonlarının tanısında önemli mesafeler alınması sağlanmıştır (Whipple ve ark.,1995). Ancak test uygulamasının pratik olmaması, tartışılabilir duyarlılık düzeyleri (Francis ve ark.,1978; Wood ve ark.,1992) nedeniyle özellikle son 10 yıl içerisinde yapılan araştırmalar bu testten daha duyarlı ve pratik bir tanı yönteminin ortaya çıkartılmasına yönelik olmuştur (Rothel ve ark.,1990; Wood ve ark.,1992 ; Whipple ve ark.,1995).

Bu çalışmada tüberküloz kontrolleri tüberkülin testi ile periyodik olarak yapılan 3 işletme (A,B,C) ile tüberküloz kontrolleri yapılmayan hayvanların bulunduğu iki köyden (D,E) toplanan örnekler önce ELISA ile değerlendirilmiştir. ELISA sonucuna göre pozitif ve negatif çıkan örnekler γ -IFN testi ile test edilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

ELISA, Ritacco ve ark.'nın (1987) bildirdiği yöntemle yapılmıştır. ELISA'da kullanılan antijenlerin daha spesifik sonuç vermesine yönelik bazı araştırmacılar tarafından farklı antijen hazırlama teknikleri ve miktarları konusunda çalışmalar yapılmıştır (Fifis ve ark.,1989). Bu çalışmada antijen olarak kullanılan PPD, Weydbridge yöntemine göre (Magnusson ve ark.,1963) *M. bovis* AN/5 kültürlerinin ısı ile öldürülmesi ile hazırlanmıştır. ELISA'da kullanılan PPD antijen miktarının 5-1000 $\mu\text{g/ml}$ arasında olabileceği bildirilmiştir (Daniel ve Debanne ,1987). Ayrıca PPD-B kullanılarak yapılan çalışmalarda antijen miktarı ile sonuçlar arasında bir ilişkinin olmadığı da belirtilmektedir (Daniel ve Debanne ,1987). Antijen titrasyon çalışmaları sonucunda, ELISA'da 40 $\mu\text{g/ml}$ ve daha yukarı miktarlarla antijenle kaplı pleytlerin kullanılmasında testte elde edilen sonuçlar arasında bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte 40 $\mu\text{g/ml}$ 'den az antijen miktarlarıyla yapılan

çalışmalarda istenilen sonuç elde edilememiştir. Antijen tasarrufu için 40 µg/ml miktarında antijen kullanılmıştır. Daniel ve Debanne'nin (1987), bildirdiklerinden farklı olarak 40 µg/ml'den daha az miktarda antijenlerle pleytlerin duyarlılaştırılmamasının nedeni diğer araştırmacıların (Ritacco ve ark.,1991) ELISA'da kullandıkları serum, konjugat titasyonlarının bu çalışmada kullanılan oranlardan farklı olmasına bağlanabilir.

Bu çalışmada kontrollü ve kontrolsüz hayvanlardan toplanan 746 örneğin bütünü ELISA ile test edilebilmiş, ancak γ -IFN test kitinin 150 örneklilik olması nedeniyle bütün örnekler γ -IFN testi ile test edilememiştir . ELISA'da test edilen örneklerin 582'sinin (%78) negatif ,164'ünün (%22) pozitif olduğu görülmüştür. ELISA'da kontrollü hayvanlardan seçilen örneklerden (A,B,C) 57'si (%11) pozitif, kontrolsüz hayvanlarda ise 107'si (%51) pozitif sonuç vermiştir. Kontrolsüz hayvanlarda 103 (%49) negatif sonuç bulunurken, kontrollü hayvanlarda 479 (%89) negatif sonuç saptanmıştır. Kontrollü hayvanlarda saptanan negatif sonuçlar (%89) seçilen yöntemle uygulanan ELISA'nın spesifitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar tüberkülinle kontrolleri yapılan sürülerde, ELISA'nın tüberküloz negatif hayvanların belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Kontrolsüz hayvanlarda örneklerin ELISA ile değerlendirilmesinden elde edilen sonuçlar göre (%51pozitif, %49 negatif) bu tip sürülerde ELISA'nın sonuçlarını doğrulayacak ek bir teste gerek duyulduğu görülmektedir.

Bu çalışmada γ -IFN testi Rothel ve ark.,'nın (1990), bildirdiği yöntemle göre yapılmıştır. Testin uygulanabilmesi için 16 saat içerisinde kan kültürlerinin duyarlılaştırılması gerekmektedir (Rothel ve ark., 1990). Ancak diğer bir araştırmada (Rothel ve ark., 1992) kanda γ -IFN düzeyinin 8 saat içerisinde düşüş gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışmada araştırmalar dikkate alınarak kan örneklerinin belirtilen sürelerde işlenebilmesi için yakın merkezler seçilmiştir. Kan kültürlerinin duyarlılaştırılması 8 saat içerisinde gerçekleştirilebilmiştir. Bununla birlikte uzak merkezlerden alınacak örneklerin test edilmesinde mobil tanı istasyonlarının kurulmasının gerektiği görülmüştür. Ayrıca büyük hayvan sürülerinde ve ülkemizde olduğu gibi

bireysel hayvan yetiştirilen yerlerde belirtilen süreler içerisinde testin yapılmasında zorluklar görülmektedir .

Rothel ve ark. (1992), infekte olmayan hayvanlarda tüberkülin uygulamasının γ -IFN düzeylerine etki etmediğini bildirmiştir. Ancak bu çalışmada diğer araştırmacıların (Radunz ve Lepper, 1985) çalışmaları göz önüne alınarak γ -IFN testinde kan alınan hayvanların, en az 2 ay ve daha önce tüberkülin uygulamasının yapılmış olması şartı aranmıştır. γ -IFN testinde antikoagülan olarak testte iyi sonuç verdiği bildirilen lityum heparinli tüpler kullanılmıştır. Testte Rothel ve ark.'nın (1990), bildirdiği gibi doku kültürü pleytlerine konularak duyarlılaştırılan kan plazması santrifüjle ayrılmamış, pipetle üst kısımdan plazmalar alınmıştır. Bu örneklerle yapılan γ -IFN testinde herhangi olumsuz sonuç tespit edilmemiştir.

Bu çalışmada ELISA'da kontrolsüz hayvanlarda (D,E) pozitif olarak saptanan 75 adet örnekten, γ -IFN testinde 42'si (%56) pozitif, 33'ü (%44) negatif sonuç vermiştir. Her iki testin χ^2 yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmesinde fark ($p < 0.001$) önemli bulunmuştur. Auer ve Schleeauf (1988), spesifik olmayan immün yanıtın tüberkülozun teşhisinde yanıltıcı sonuçlar doğurabileceğini bildirmiştir. Morrison ve ark. (2000), M.bovis antijenlerinin, M. avium ve M. paratuberculosis antijenlerine karşı oluşan antikolarla çapraz reaksiyon gösterebildiğini söylemektedir. Uygulanan ELISA'da pozitif sonuç veren, ancak γ -IFN testinde negatif bulunan 33 örneğin farklı araştırmacıların (Auer ve Schleeauf,1988; Morrison ve ark., 2000) belirttiği gibi ELISA'da kullanılan antijeninin spesifik olmayan antikolarla çapraz reaksiyona girerek yanlış pozitif sonuç verdiği sanılmaktadır.

Bu çalışmada ELISA'da kontrollü hayvanlarda negatif olarak saptanan 75 adet örnekten , γ -IFN testinde 61'i (%81.3) negatif, 14'ü (%18.7) pozitif bulunmuştur. Her iki testin χ^2 yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmesinde fark ($p > 0.05$) önemsiz bulunmuştur. Wood ve ark. (1992), sığır tüberkülozunun tanısında γ -IFN testinin sensitivitesini %81.8 ve

spesifitesini % 99.1 saptamış olup γ -IFN testinin, tüberkülin testi ve ELISA'ya göre daha duyarlı bulmuşlardır. Elde edilen bu sonuçlar, tüberküline göre γ -IFN testinin duyarlılığının yüksek olduğunu bildiren araştırmacılarla (Morrison ve ark.,2000) paralellik göstermektedir. ELISA'da negatif bulunan 14 örneğin, γ -IFN testinde pozitif bulunması, infekte hayvanlarda antikor yanıtının düşük olduğu durumlarda hücresel yanıtın saptanabilmesi olarak açıklanabilir. Elde edilen bu sonuçlar, M. bovis infeksiyonlarında hücresel yanıtın önem kazandığını bildiren araştırmacılarla (Plackert ve ark., 1989; Harboe ve ark., 1990 ; Ritacco ve ark., 1990) paralellik göstermektedir. Ritacco ve ark.'ları (1990), aktif tüberküloz olgularında mikobakteriyel antikorların yüksek düzeyde bulunabildiğini, subklinik olgularda ise antikorların ölçülemeyecek düzeylerde olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada ELISA'da saptanamayan pozitifliklerin nedenlerinin hayvanlarda humoral antikorların henüz oluşmadığı, hastalığın ilk evreleri veya subklinik dönemi olduğu sanılmaktadır. Lilenbaum ve ark. (1999), γ -IFN testinin, tüberkülin testinden 60-120 gün daha önce pozitiflikleri saptayabildiğini ve bu testlerin beraberce hastalığın teşhisinde kullanılmasının daha doğru olacağı bildirmektedirler. Tüberkülin testinde negatif bulunan B işletmesinden seçilen hayvanlardan (32 adet) 14'ünün γ -IFN'de pozitif bulunması tüberkülin testinin de diğer ek bir tanı metodları ile desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu çalışmada sığır tüberkülozunun teşhisinde, humoral antikor yanıtının ELISA ile ölçülmesi, hücresel immün yanıtın γ -IFN testi ile belirlenmesi esas alınmıştır. Mikobakteriyel infeksiyonlarda hücresel yanıtın çabuk gelişimi ,humoral antikorların saptanabilmesi için daha uzun sürelerle gerek duyulması nedeniyle ELISA'da bulunamayan pozitiflikler γ -IFN testinde saptanabilmektedir (Rothel ve ark.,1992). Çalışmada γ -IFN testinde bulunan pozitiflerin hepsinin gerçek pozitif olup olmadıkları pozitif sonuç veren hayvanlardan M. bovis kültürü yapılamadığı için bilinmemektedir. Neil ve ark. (1994a), enfekte 98 hayvanın hepsinde (%100) γ -IFN testi ile tüberkülozu tespit edebildiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada sonuçların değerlendirmeleri γ -IFN testinin duyarlılığının yüksek olduğunu bildiren

araştırmacılara (Wood ve ark.,1992; Neil ve ark.,1994a) göre yapılmıştır. Bu çalışmada γ -IFN testinde elde edilen pozitif sonuçların doğru pozitif olduğu sanılmaktadır.

Bu çalışmada her iki test genel olarak karşılaştırıldığında ELISA'da 75 pozitif ve 75 negatife karşılık γ -IFN testinde sırasıyla 56 ve 94 olarak bulunmuştur. X^2 testi yapılarak iki testin karşılaştırılmasından elde edilen fark ($p<0.01$) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ELISA sonuçlarının γ -IFN testi sonuçları ile karşılaştırıldığında pozitiflikleri saptamada %56 (42/75), negatifleri saptamada %81.3 (61/75) başarılı olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, γ -IFN testine göre pozitifleri saptamada düşük yüzdesi (%56) nedeniyle ELISA'nın tek başına sığır tüberkülozunun tanı ve kontrolünde kullanılamayacağını göstermektedir. Wood ve ark., (1992), ELISA'da *M. bovis*'e spesifik monoklonal antikorların kullanılması ile spesifitede önemli bir yükseliş görülmesine karşın sensitivitede artış gözlemlenmemişlerdir. PPD-B antijeni kullanılarak yapılan bu çalışmada negatifleri saptamada uygun duyarlılık (%81.3) bulunmasına karşın pozitifleri saptamada istenilen sonuç (%56) bulunamamıştır. Kuchinka ve ark., (1990), ELISA'da düşük bulunan duyarlılığın monoklonal antikorların kullanılması ile giderilebileceğini bildirmektedir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda spesifik antijenlerin kullanılması testin duyarlılığını artıracaktır. Ayrıca yalnızca IgG 'leri değil, diğer immunoglobulin tiplerinin de ELISA'da saptanabilmesini sağlayabilecek konjugatların geliştirilmesi gerektiği de bu çalışmada görülmüştür.

Bu çalışmada testlerin uygulanabilirliği maliyet hesabı yapılarak da karşılaştırılmıştır . Buna göre giderler hesaplandığında ; γ -IFN testinde 150 örneklik kit 1000 Alman Markıdır (DM). Örnek başına 6.70 DM 'dir. 24 örneklik doku kültürü pleytleri 9 DM 'dir. Her bir örnek maliyetine 1.10 DM düşmektedir. 0.50 DM mikrotitrasyon ekipmanı gideri eklendiğinde, herbir örneğin maliyeti 8.30 DM olmuştur. Bu hesaplamalara göre ELISA'da 46 örneğin test edilebildiği pleyt 4 DM'dir. Herbir örneğe 0.09 DM düşmektedir. Test reagent maliyeti bir örnek için 0.07 DM' dir . Mikrotitrasyon ekipmanı gideri 0.05 DM eklendiğinde her bir örneğin maliyeti 1.29 DM olmuştur. Her

iki testin maliyetleri hesaplandığında γ -IFN testinin ELISA'ya göre pahalı olduğu bu çalışmada görölmüştür .

Yapılan bu çalışmada uygulanan ELISA ve γ -IFN testlerinin tüberkölün gibi rutin diagnostik testlere göre, tüberkölözden şüpheli hayvanların yeniden test edilebilmesi (Rothel ve ark., 1992), 24-48 saat içerisinde test sonuçlarının okunabilmesi (Rothel ve ark., 1992) ve örneklerin sahadan bir defada toplanması gibi avantajlarının olduğu da görölmüştür. Bunun yanında gerek ELISA, gerekse γ -IFN testinden elde edilen değerlerin sayısal nitelikte olması (Wood ve ark.,1992) immun yanıtın belirlenmesinde pozitif veya negatif olarak nitelendirilen testlere (Francis ve ark.,1978) göre daha uygun ve pratiktir.



5. SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen bulgular, periyodik tüberkülin testi uygulanan ve tüberküloz negatif hayvanlardan alınan örneklerle yapılan ELISA'dan elde edilen sonuçlarla γ -IFN sonuçlarının paralellik gösterdiği; kontrolsüz hayvanlardan seçilen örneklerde ise her iki test sonuçlarının farklı olduğu görülmüştür. γ -IFN testinin sensitivitesinin yüksek olduğunu bildiren araştırmalar göz önüne alındığında bu çalışmadan çıkan sonuçlar ELISA'nın pozitifleri saptamada yetersiz olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte γ -IFN testinin ELISA'ya göre pozitif hayvanları saptamada daha uygun, ancak maliyetinin yüksek olduğu sonucuna da varılmıştır. Her iki testin gerek maliyet gerekse duyarlılıkları gözönüne alındığında bugün için sığır tüberkülozunun tanısında tek başlarına kullanılamıyacakları anlaşılmıştır. Özellikle tüberküloz eradikasyonunun sınırlı yapıldığı ülkelerde ELISA'nın pozitifleri saptamadaki düşük duyarlılığı nedeniyle, tüberküloz olgularının belirlenmesinde yalnız başına kullanılmasının uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. ELISA'nın düşük maliyeti, sığır tüberkülozu ile ilgili yapılacak epidemiyolojik çalışmalara uygun olduğunu, yüksek sensitiviteye sahip γ -IFN testinin maliyetinin yüksekliği bugün sığır tüberkülozunun tanısında yaygın olarak kullanımını azaltsa bile, test maliyetlerinde düşmeler ve test performansı / maliyet oranını düşürmeyecek üreticiler tarafından kullanılabileceğini göstermektedir.

ÖZET

Sığır tüberkülozunun teşhisinde kullanılan gamma interfeeron testi ile ELISA'nın karşılaştırmalı değerlendirilmesi

Bu çalışmada tüberkülin testi ile her yıl periyodik kontrolleri yapılan 536 adet hayvandan ve kontrolsüz 210 adet hayvandan alınan kan örnekleri önce ELISA'da değerlendirildi. ELISA'da bu örneklerin 582'si (%78) negatif, 164'ü (%22) pozitif bulundu. Kontrollü hayvanlarda 57 (%11) pozitif , 479 (%89) negatif, kontrolsüz hayvanlarda 107 (%51) pozitif , 103 (%49) negatif sonuç saptandı.

ELISA'da kontrollü hayvanlarda negatif bulunan 75 adet örnek ile kontrolsüz hayvanlarda pozitif bulunan 75 adet örneğe γ -IFN testi uygulandı. γ -IFN testinde kontrolsüz hayvanlardan seçilen örneklerin 42'si (%56) pozitif, 33'ü (%44) negatif , kontrollü hayvanlardan seçilen örneklerin 61'i (%81.3) negatif ,14'ü (%18.7) pozitif bulundu.

Her iki testte elde edilen sonuçların χ^2 yöntemi kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirilmelerinde, pozitif sonuçlar arasındaki fark ($p<0.001$) önemli, negatif sonuçlar arasındaki fark ($p>0.05$) önemsiz ve testlerin sonuçlarının ortak değerlendirilmesinde fark ise ($p<0.01$) önemli bulundu.

Anahtar kelimeler: Sığır, Tüberküloz, ELISA, γ -IFN testi.

SUMMARY

The Comparison of the ELISA and the gamma-interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis

In the present study, the blood samples from 536 animals, checked with tuberculin each year and the samples from 210 animals which have never been checked with tuberculin, have been tested with ELISA. As a result 582 of them (78%) have resulted in negative and 164 of them (22%) have resulted in positive. In the group of checked animals there were 57 (11%) positive and 479 (89%) negative samples and in the group of unchecked animals there were 107 (51%) positive and 103 (49%) negative samples.

75 samples from checked animals, resulted in negative in ELISA and 75 samples, chosen from the unchecked animals, resulted in positive have been tested with γ -IFN assay. 42 of the unchecked samples (56%) have given positive and 33 (44%) of them negative, 61 of the checked samples (81.3%) have given negative and 14 of them (18.7%) have given positive results.

The difference between the positive results ($p < 0.001$) is important, between the negative results ($p > 0.05$) is unimportant and the difference between the evaluation of the results of the tests ($p < 0.01$) is important.

Key Words: Cattle, Tuberculosis, ELISA and γ -IFN assay.

KAYNAKLAR

- AKAY, Ö., AYDIN, N., ARDA, M., HAZIROĞLU, R. (1984). Bir mink'te saptanan tüberkülozis üzerinde araştırma. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, **3**, 463-470.
- ARDA, M., MİNBAŞ, A., LELOĞLU, N., AYDIN, N., AKAY, Ö. (1992). Özel Mikrobiyoloji. Atatürk Üniv. Yay., **741**, 279-3 311.
- AUER, L.A. (1987). Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Aust. Vet. J.*, **64**, 172-176.
- AUER, L.A., SCHLEEHAUF, S.M. (1988). Antibodies to *Mycobacteria* in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.*, **18**, 51-61.
- AYGÜN, S., HEPER, B. (1941). Sığırlarda tüberkülozun alerji usulile teşhisi. *Vet. Hek. Dem. Derg.*, **11**, 3-25.
- BARLOW, A. M., MITCHELL, K. A. , VISRAM, K.H. (1999). Bovine tuberculosis in llama (*Lama glama*) in the UK. *Vet. Rec.*, **145**, 639-640
- BARUTÇU, İ., GÜRSEL, A., TEZOK, F., (1955). Tüberkülozda haemagglütinasyon reaksiyonu. *Türk. Hij. Tec. Biy. Derg.*, **1**, 79-95.
- BERKER, M., ENGEZ, H. (1955). Tüberküloz teşhisinde hemolitik test. İç.: İkinci Türk Tüberküloz Kongresi, Yeni desen Matbaası, Ankara, s.:354-358.
- BISPING, W., AMTSBERG, G., (1988). *Mycobacteria*. In: Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg, p.:108-120.
- BOIREAU, E., FONTAINE, G. A., BLANCHARD, D., LARRAT, M., GANIERE, P. (1994). Serological analysis by A60 antigen ELISA and BCG immunoblotting in domestic carnivores experimentally vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG, *Zbl Bakt.* **281**, 85-94.
- BOURNE, J., DONNELLY, C. A., COX, D. R., GETINNBY, G. MCINERNEY, J. P., MORRISON, I., WOODROFFE, R. (2000). Bovine tuberculosis: towards a future control strategy. *Vet. Rec.*, **146**, 207-210.
- CASSIDY, J. P., BRYSON, D.G., NEILL, S.D. (1999). Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*, *Vet. Rec.*, **144**, 139-142.
- CHATTERJEE, D., BOZIC, C. M., KNISLEY, C., CHO, S., BRENNAN, P. J. (1989). Phenolic glycolipids of *Mycobacterium bovis*: New structures and synthesis of a corresponding seroreactive neoglycoprotein, *Infect. Immun.*, **57**, 322,330.
- COLLINS, D. M., ERASMUSON, S. K., STEPHENS, D. M., YATES, F. G., DE LISLE, G. W. (1993). DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110, *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1143-1147.
- CORBEIL, L. B. (1991). Immunity to infectious diseases. In: World animal science A , Basic information, Elsevier Science Pub., B. V. , Amsterdam, p.: 115-137.
- CORNER, L. A., MELVILLE, L., McCUBBIN, K., SMALL, K. J. , McCORMICK, B. S., WOOD, P. R., ROTHEL, J. S. (1990). Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculosis lesion in cattle. *Aust. Vet. J.*, **67**, 389-392.

- CROFTON, J. (1994). Tuberculosis: Proper Koch, Post Koch: A Global Review, IUATLD News. **12**, 2-7.
- DANIEL, T.M., DEBANNE, S.M. (1987). The serodiagnosis of Tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 1137-1151.
- DEL PORTILLO, P., MURILLO, L. A., PATARROYO, M. E. (1991). Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2163-2168.
- DOHERTY, M. L., MONAGHAN, M. L., BASSETT, H. F., QINN, P. J. (1995). Effect of recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 217-221.
- DOWLING, L. A. , SCHLEEHAUF, S.M. (1991). Specific antibody responses to *Mycobacterium bovis* in infected cattle analysed with six Mycobacterial Antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *Res. Vet. Sci.*, **50**, 157-161.
- DUNGWORTH, D. L. (1993). The respiratory system. In: *Pathology of domestic animals*, Ed.: Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C., Palmer, N., 4th , Academic press, Inc., San Diego, California, p.: 641-652.
- FELDMAN, W. H. (1955). Tuberculosis. In: *Diseases Transmitted from Animals to man*, 4th , Charles C. Thomas, Pub., Springfield, Illinois, p.:5-64.
- FIFIS, T., ROTHEL, J.S. , WOOD, P.R. (1994). Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.*, **40**, 65-81.
- FIFIS, T., COSTOPOULOS, CORNER L.A., WOOD, P.R. (1992). Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet. Microbiol.*, **30**, 343-354.
- FIFIS, T., PLACKETT, P., CORNER L.A., WOOD, P.R. (1989). Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand. J. Immunol.*, **29**, 91-101.
- FINEGOLD, S. M., MARTIN, W. J. (1982). *Mycobacteria*. In: *Diagnostic Microbiology*, 6th , The C. V. Mosby Comp., USA, p.:338-368.
- FOURNIE, J.J., MULLINS, R. J., BASTEN, B. (1990). Isolation and structural characteristic of a monoclonal antibody- defined cross-reactive phospholipid antigen from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *J. Biol. Chem.*, **266** , 1211-1219.
- FRANCIS, J. S., SEITER, R. J., WILKIE, I. W., O'DOYLE, D., LUMSDEN, M. J. , FROST, A. J. (1978). The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculin. *Vet. Rec.*, **103**, 420-425.
- GABORICK, C. M., SALMAN, M. D., ELLIS, R. P., TRIANTIS, J. (1996). Evaluation of a five-antigen ELISA for diagnosis of tuberculosis in cattle and Cervidae. *JAVMA*, **209** , 962-966.
- GALLAGHER, J., MONIES, R., WIDEN, M. G., RULE, B. (1998). Role of infected, non-diseased badgers in the pathogenesis of tuberculosis of in the badger. *Vet. Rec.*, **142**, 710-714.
- GOLEM, B. (1941). Memleketimizde sığır tüberkülozunun vaziyeti ve sığır tüberkülozunun insan için olan tehlikesi. *Vet. Hek. Dem. Derg.*, **11**, 28-38.

- GOODMAN, J. W. (1994). The immune response. In: Basic & Clinical Immunology 8th Ed.:, Prentice-Hall Int. Inc., USA, p.: 40-50.
- GRIFFIN, J. F. T., CROSS, J. P., CHINN, D. N., RODGERS, C. R., BUCHAN, G. S. (1994). Diagnosis of tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in New Zealand red deer (*Cervus elaphus*) using a composite blood test and antibody assays. *N. Zealand Vet. J.*, **42**, 173-179.
- GRIFFITH, A. S., TYTLER, W. H., CUMMIS, S. L., MCINTOS, J., WHITBY, L. E. H., BILLOCH, W., FLEMING, A., OKELL, C. C., GLOYNE, S. R. (1930). *Bacillus Tuberculosis*. In: A System of Bacteriology in Relation to Medicine. Majesty's Stationery Office, London, p.:151-325.
- GÜRSEL, A. (1954). Tüberkülozda bakteriyolojik teşhis. *Türk. Hij. Tec. Biy. Derg.*, **2**, 320-359.
- HALL, M.R., THOEN, C. O. (1985). In vitro and in vivo evaluation of lysozyme extracts of virulent *Mycobacterium bovis* in guinea pigs and calves, *Am. J. Vet. Res.* **46**, 2249-2252.
- HALL, M.R., THOEN, C. O. (1983). Preparation of biologically active components of *Mycobacterium bovis*, using Triton-X-100 or potassium chloride, *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1602-1604.
- HAMMAM, H., REFAI, M., BISBING, W., KIRPAL, G. (1989). studies on the efficiency of absorbed bovine PPD in tuberculin and serological tests. *J. Vet. Med. B.*, **36**, 175-179.
- HANNA, J., NEILL, S.D., O'BRIEN, J.J. (1992). ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*, **31**, 243-249.
- HARBOE, M., WIKER, H.G., DUNCAN, J. R., GARCIA, M.M., DUKES, T.W., BROOKS, B.W., TURCOTTE, C., NAGAI, S. (1990). Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 913-921.
- HARLOW, E., LANE, D. (1988). Antibody response . In: *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press. Plainview, NY, p.: 37-53.
- HAZNEDAROĞLU, T., GÜN, H., BAŞUSTAOĞLU, A., ALBAY, A. (1992). Akciğer tüberkülozlu hasta serumlarında PPD'ye karşı IgG antikorlarının ELISA yöntemi ile saptanması. XXV. *Türk Mikrobiol. Kongre kitabı 1*, Bursa, s.:17-18.
- HENLEY, R. R. (1935). A glycerol-free medium for the tubercle bacillus. *Am. Rev. Tuber.*, **32**, 724-726.
- HERBERT, W. J., WILKINSON, P. C., STOTT, D. I. (1995). *The dictionary of immunology*. Academic Press. Inc., London, p.: 81.
- HOLT, J.G., KRIEG, N. R., SNEAT, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T.(1994). *The Mycobacteria*. In: *Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology 9th Ed.*., Williams&Wilkins, Baltimore, p.: 597-603.
- HUGHES, K.L. (1991). Animal production and human health. In: *Microbiology of animal products*. Ed.: J. B. Woolcock, Elsevier Science. Pub., Netherlands, p.: 195-206.
- JARNAGIN, J. L., BRENNAN, P. J., HARRIS, S. K. (1982). Rapid identification of *Mycobacterium bovis* by a thin – layer chromatographic technique. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1920-1922.

- JAWETZ, E., MELNICK, J. L., ADELBERG, E. A. (1987). *Mycobacteria*. In: Review of medical microbiology, 17th Ed., Appleton&Lange , Norwalk, Connecticut / Los Altos, California, p.:285-292.
- JONES, S. L., COX, J. C., SHEPHERD, J.M., ROTHEL, J. S., WOOD, P.R., RADFORD, A.J. (1992). Removal of false-positive reaction from plasma in an enzyme immunoassay for bovine interferon- γ . *J. Immunol. Methods*, **155**, 233-240.
- KAUFMANN, S. H. E. (1988). CD8+ T lymphocyte in intracellular microbial infection. *Immun. Today*, **9**, 168-173.
- KEET, D.F., KRIEK, N. P. J., PENRITH, M. L., MICHEL, A., HUCHZERMEYER, H. (1996). Tuberculosis in buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park: spread of the disease to other species. *Onderst, J. Vet. Res.*, **63** , 239-244.
- KESKİN, O., İZGÜR, M. (1996). Sığır tüberkülozunun teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve allerjik yöntemle karşılaştırılması. I. Uluslararası Veteriner Mikrobiol. Kong. Kong. özet kitabı , s.: 92.
- KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., WINN, W. C. (1992). *Mycobacteria*. In: Diagnostic Microbiology, 4th Ed.: J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, p.: 703-755.
- KUCHINKA, G.D., THOEN, C.O. MOENNIG, V. (1990). Production and partial characterisation of monoclonal antibodies to the neotype strain of *Mycobacterium bovis*, *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1608-1614.
- LANDOLFO, S., COFONO, F., FASSIO, A., FAVA, L., CAVALLO, G. (1987). Production of antibodies against the murine IFN- γ receptor. In: The Biology of the Interferon System 1986, Martinus Nijhoff Pub., Dodrecht, p.: 117-120.
- LEIFSSON, P. S., OLSEN, S. N., LARSEN, S. (1997). Ocular tuberculosis in a horse. *Vet. Rec.*, **141**, 651-654.
- LIGHTBODY, K., SKUCE, R.A., NEILL, S.D., POLLOCK, J.M. (1998). Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis : an ELISA with potential to confirm disease status. *Vet. Rec.*, **142**, 295-300.
- LILENBAUM, W, SCHETTINI, J. C., SOUZA, G. N., RIBEIRO, E. R., MOREIRA, E. C., FONSECA, L. S. (1999). Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Zentr. Vet.*, **46**, 353-358.
- MAGNUSSON, M., KIM, H. K., BENTZON, M. W. (1963). Tuberculin Production. *Acta. Patth. Et Microbiol. Scandi.*, **59** , 357-368.
- MARTIN, S. W., MEEK, A. H., WILLEBERG, P. (1987). Measurement of disease frequency and production Chapt.3. In: Veterinary Epidemiology Principles and Methods first Ed., Iowa State Univ. Press., Ames, Iowa, p.:
- MONIES, R. J., CRANWELL, M. P., PALMER, N., INWALD, J., HEWINSON, R. G., RULE, B. (2000). Bovine tuberculosis in domestic cattle. *Vet. Rec.*, **146**, 407-408.
- MORRISON , W.I., BOURNE, F.J., COX, D. R., DONNELLY, C.A., GETINBY, G. MCINERNEY, J.P., WOODROFFE, R. (2000). Pathogenesis and diagnosis of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Vet. Rec.* **146**, 236-242.

- NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (1985). Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria, Ames , Iowa, 1-92.
- NEILL, S.D, HANNA, J., POLLOCK, J., MACKIE, D. P., CASSIDY, J., CLEMENTS, A., BRYSON, D.G. (1994a). The diagnosis of bovine tuberculosis by blood testing. *Vet. Microbiol.*, **40**, 1-7.
- NEILL, S.D, CASSIDY, J., HANNA, J., MACKIE, D. P., POLLOCK, J., CLEMENTS, A., WALTON, E., BRYSON, D.G. (1994b). Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet. Rec.*, **135**, 134-135.
- NEWELL, D. G., HEWINSON , R.G. (1995). Control of bovine tuberculosis by vaccination. *Vet. Rec.*, **136**, 459-463.
- NOLTE, F. S., METCHOCK, B. (1994). *Mycobacterium*. In: Manual of clinical Microbiology. 6th Ed.; Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, N. A., Tenover, F. C., Tenover, R. H., ASM press, Washington D. C., p.:400-433.
- OIE (1996). World Organisation for Animal Health, Manuel of standards for diagnostic tests and vaccines, 267-275.
- OPPENHEIM, J. J., RUSCETI, F. W., FALTYNEK, C. (1994). Cytokines. In: Basic & Clinical Immunology 8th Ed.; Prentice-Hall Int. Inc., USA, p.:105-123.
- ÖKTEM, Z. (1967). *Mycobacterium*. İç: Tıbbi Bakteriyoloji. II. Cild, Menteş Kitabevi, İstanbul, p.: 604-673.
- ÖZTÜRK,R. (1993). Mikobakterilerin sonike edilmiş adsorebe antijeni ve purifiye protein derivesi kullanılarak yapılan ELISA ile akciğer tüberkülozunun serolojik tanısı., *Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg.*, **23**, 84-90.
- PATERSON, A. B., STAMP, J. T., RITCHIE, J. N. (1959). Tuberculosis. In: Diseases due to bacteria. Ed.: Stableforth, a. W., Galloway, L. A., Vol. 2, Butterworths Scientific Pub., London, p.:671-745.
- PEPYS, J., AUGUSTIN, R., PATERSON, A. B. (1959). Common antigenic components of mycobacterial extracts. *J. Brith. Tub. Assoc.*, **3**, 163-172.
- PLACKETT, P., RIPPER, J. , CORNER, L.A., SMALL, K., de WITTE, K., MELVILLE, L. HIDES, S. , WOOD, P.R. (1989). An ELISA for the detection of anergic tuberculosis cattle. *Aust. Vet. J.* ,**66**, 15-16.
- PLIKAYTIS , B. B., EISENACH, K. D., CRAWFORD, J. T., SHINICK, T. M. (1991). Differentiation of *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction assay. *Mol. Cell. Prob.*, **5**, 215-219.
- POLLOCK, J.M., DOUGLAS, A.J., MACKIE, D. P., NEILL, S.D. (1994). Identification of bovine T-cell epitopes for three *Mycobacterium bovis* antigens : MPB70, 19,000 MW and MPB57. *Immun.*, **82**, 9-15.
- PRITCHARD, D. G. (1988). A Century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. *J. Comp. Path.*, **99**, 357-399.
- RADUNZ, B. L., LEPPER, A. W. D. (1985). Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in repeat tests. *Aust. Vet. J.*, **62**, 191-194.
- RITACCO,V., LOPES, B., DE KANTOR,I. N., BARRERA, L., ERRICO, F., NADER, A. (1991). Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*, **50** , 365-367.

- RITACCO,V., LOPES, B., BARRERA, L. , NADER, A., FLIES, E., DE KANTOR,I. N. (1990). Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis, *J. Vet. Med.*, **37**, 19-27.
- RITACCO,V., DE KANTOR,I. N., BARRERA, L. , NADER, A., BERNARDELLI, A., TORREA, G., ERRICO, F., FLIES, E. (1987). Assessment of the sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. *J. Vet. Med.B.*, **34** , 119-125.
- ROBERTS, T. (1986). A retrospective assessment of human health protection benefits from removal of tuberculous beef. *J. Food Protect.*, **49**, 293-298.
- ROTHEL, J.S., JONES, S. L., CORNER, L.A., COX, J.C., WOOD, P.R. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust. Vet. J.*, **69**, 1-4.
- ROTHEL, J.S., JONES, S. L., CORNER, L.A., COX, J.C., WOOD, P.R. (1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.*, **67**, 134-137.
- SAÇILIK, S.C. (1991). Aktif akciğer tüberkülozunun tanısında ELISA'nın önemi. *İnfek. Derg.*, **5**, 1, 27-29.
- SAVAGE, C., VINCENT, P., LECLERC, H. (1993). Serodiagnosis of tuberculosis. Evaluation of a sulpholipid antigen. *Zbl. Bakt.*, **278**, 49-57.
- SEVCIKOVA,Z., LEDECKY, V., CAPIK, I., LEVKUT, M. (1999). Unusual manifestation of tuberculosis in an ostrich (*Struthio camelus*). *Vet. Rec.*, **145**, 708.
- STREETON, J. A., DESEM, N., JONES, S. L. (1998). Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, **2**, 443-450.
- STUDDERT, V.P., HUGHES, K. L. (1992). Treatment of opportunistic mycobacterial infection with enrofloxacin in cats. *JAVMA*, **201**, 1388-1390.
- SVENKERUD, R. (1955). A Study of heat concentrated synthetic medium tuberculin, preparation, standardisation and biological activity. *Nordlundes Bogtrykkeri, Copenhagen*, p.:17-161.
- TEKİN, N., RAFYİ, A. (1971). Hayvan tüberkülozu. Gelişmekte olan ülkelerde tüberküloz sorunlarının özellikle ortaya konması ve tetkiki. *Bornova Vet. Araşt. Enst. Derg.* **22**, 36-87.
- TEZOK, F., (1966). Tüberkülozda rezistans problemleri. *Tuberk. Toraks.* **5**, 527-563.
- THOEN, C. O., HIMES, E. M. (1986). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.*, **2**, 198-214.
- THOEN, C. O.,KARLSON , A., G., HIMES, E.M. (1981). Mycobacterial infections in animals. *Rev. Infec. Dis.*, **3**, 960-971.
- THOEN, C. O., ARMBRUST, A. L., HOPKINS, M. P. (1978). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detecting antibodies in swine infected with *Mycobacterium avium*. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 1096-1099.
- THORNS, C.J., BIOL, M. I., MORRIS, J.A. (1983). The immune spectrum of *Mycobacterium bovis* infections in some mammalian species: a review, *Vet. Bult.*, **53**, 543-550.

- ULUSAN, N. (1994). Aktif tüberkülozlu olgularda PPD, MSO ve MSOA antijenlerini kullanarak ELISA yöntemiyle spesifik IgG antikorlarının araştırılması. Doktora Tezi, Uludağ Üniv. Tıp Fak.
- WAYNE, L. G., KUBICA, G. P., (1986). The Mycobacteria. In: Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology . Williams&Wilkins, Baltimore, p.:1435-1457.
- WAYNE, R. (1989). A new test for TB. Rural Res., **144**, 4-8.
- WHIPPLE, D.L., BOLIN, C.A., DAVIS, A.J., JARNAGIN, J. J., JOHNSON, D. C., NABORS, R. S., PAYEUR, J. B., SAARI, D. A., WILSON, A.J.,WOLF, M. M. (1995). Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial γ -interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. Am. J. Res., **56**, 415-419.
- WHO (1998). TB a crossroads, Report on the global tuberculosis epidemic. Geneva, 2- 25.
- WHO (1992). Report of the WHO working group meeting on animal tuberculosis. Cairo, Egypt, 2-24.
- WIGHT, A. E., LASH, E., O'REAR, CRAWFORD, A. B., (1942). Tuberculosis and Its eradication. In.: Yearbook of agriculture, U.S. Gov. Print. Of., p.: 237-249.
- WOOD, P.R., CORNER, L.A., ROTHEL, RIPPER, J.L., FIFIS, T., MC CORMICK, FRANCIS, B., MELVILLE, L., SMALL, K., B.S. De WITTE, K., TOLSON, J., RYAN, T.J., De LISLE, G. W., COX, J.C., JONES, S. L. (1992). A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol., **31**, 71-79.
- WOOD, P.R., CORNER, L. A., PLACKETT, P. (1990). Development of a simple rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ interferon. Res. Vet. Sci., **49**, 46-49.
- YEARSLEY, D., O'ROURKE, J. , O'BRIEN, T., EGAN, J. (1998). Comparison of three methods for the isolation of Mycobacteria from bovine tissue lesions. Vet. Rec., **143**, 480-481.
- YEŞİLADA, Y. (1966). Tüberküloz. Bornova Vet. Araşt. Enst. Derg., **7**, 5-14.