

49309

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİĞİR TÜBERKÜLOZİS'İNİN TEŞHİSİNDE ELISA'NIN KULLANILMASI
VE ALLERJİK YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Oktay Keskin

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr.Müjgan İZGÜR

1996-ANKARA

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANİTASYON MERKEZİ

Bu Proje, 93-30-00-07 No ile A.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | <u>sayfa no</u> |
|--------------------------------|-----------------|
| Önsöz | 1 |
| Giriş. | 2 |
| Materyal ve Metot | 28 |
| Bulgular | 33 |
| Tartışma ve Sonuç | 38 |
| Türkçe Özet | 44 |
| İngilizce Özet (Summary) | 45 |
| Fotoğraflar | 46 |
| Kaynaklar | 48 |
| Teşekkür | 58 |
| Özgeçmiş | 59 |

ÖNSÖZ

Tüberkülozis, hayvanlarda organ ve dokularda kazeöz ve kazekalseröz özellikte tüberküllerin oluşması ile karakterize kronik bir enfeksiyondur. Sığır tüberkülozisine neden olan *M. bovis*, hem sığırlarda, hem de insanlarda enfeksiyon oluşturmakta ve bir zoonoz olarak da önem taşımaktadır. Sığır tüberkülozu bugün hala bir sağlık problemi olup, dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye'de de ekonomik öneme sahip olan bir enfeksiyondur. İnsanlık tarihi kadar eski bir geçmişi olan tüberkülozis, teknolojik gelişmelere rağmen günümüzde insanlarda 30 milyon olguluk prevalans ve yıllık 10 milyon yeni olguyla bütün dünyada, özellikle az gelişmiş ülkelerde önemli bir enfeksiyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu olgulardan bir kısmına ise *M.bovis* neden olmaktadır. Öte yandan tüberkülozlu hayvanlara ait karkas ve sütler, büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Ayrıca Sağlık Zabıtası Kanunu'na göre ihbarı ve mücadelesi zorunlu olup, tazminatlı bir enfeksiyon olması nedeni ile de kesin ve erken tanının önemi artmaktadır. Bugün için canlı hayvanlarda tüberküloz hastalığının teşhisinde yaygın olarak kullanılan yöntem intradermal olarak uygulanan tüberkülin testidir. Testte, farklı yorum kriterleri ve subjektif faktörler sonuçlarda anlaşmazlıklara yol açabilmektedir. Ayrıca tüberkülin testinin değerlendirilmesinde ortaya çıkan yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik durumları hastalığın teşhisinde önemli sayılabilecek yanılgılara sebebiyet vermektedir.

İnsan ve hayvanlarda tanı için, mikobakteriyel antijenlere karşı oluşan antikorların saptanması amacıyla da çeşitli serolojik testler denenmektedir. Bugüne kadar komplement fiksasyon, bentonite flokulasyon, kaolin aglutinasyon, indirekt immunofluoresans tekniği ve jel presipitasyon gibi testler bu amaç için denenmiş, ancak bu testlerden hiç birisi istenilen spesifite ve sensitivitede bulunamamış ve yaygın uygulamalar için gerekli avantajlara sahip olmadıkları saptanmıştır. Son zamanlarda *M.bovis* ile infekte sığırların serumlarındaki antimikobakteriyel antikorları göstermek için ELISA kullanılmakta ve başarılı olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada, sığır tüberkülozunun çabuk ve kesin tanısı için ELISA'nın kullanılabilirliğinin saptanması ve sonuçlarının tüberkülin test sonuçları ile karşılaştırılarak ELISA'nın tüberküloz teşhisindeki öneminin ortaya konması amaçlanmıştır.

GİRİŞ

Tüberkülozis, hayvanlarda akciğerlerle diğer organ ve dokularda kazeöz ve kazeökalserez karakterde tüberküllerin oluşması ile ortaya çıkan kronik ve infeksiyöz bir hastalıktır.

Tüberkülozis 1888 yılında, insan başta olmak üzere sığırlarda, diğer evcil ve vahşi hayvanlarda "sıraca illeti" ve veremden görülen ölümlerin en büyük nedeni olarak tanımlanmıştır(73). Yine 1888 yılında Paris'te ilk Tüberküloz kongresi toplanmıştır. Bu kongrede klinik ve patolojik bulgulara göre yapılan tanının 1882'de *Koch* tarafından bulunan tüberküloz basilinin izolasyonu veya gösterilmesi ile desteklenmesi gerektiği bildirilmiştir. 1865-1868 tarihleri arasında yapılan çalışmalarda tüberkülozun insan ve hayvanlar arasında karşılıklı olarak taşınabileceği ve aynı zamanda tavşanların insan tüberküloz etkenlerine daha dirençli oldukları bildirilmiştir(91).

Literatür verilerine göre, 1868 yılında *Chauveau* sığırlardan aldığı hastalıklı materyali tavşanlara yedirerek hastalığı oluşturmuş, 1872 yılında ise *Paulicki* insan, sığır ve kanatlılarda tüberkül oluşumu ile seyreden hastalıkların benzer hastalıklar olduğunu açıklamıştır. 1879 yılında *Conheim* hastalığın özel bir etken tarafından oluşturulabileceğini ve 1882'de *Robert Koch* da etkeni, lezyonlar içinde boyayarak göstermiştir. Aynı yıllarda *Ehrlich*, etkenin asit ve alkollere dirençli olduğunu açıklamıştır. *Koch* 1890 yılında, tüberküloz etkenini gliserinli buyyonda üreterek tüberkülin hazırlamış ve bunu tüberküloza karşı korumada kullanmak istemiş, ancak yaptığı çalışmalarda tüberkülinin korunmada değil, teşhiste kullanılabileceğini görmüştür. Ayrıca etkenin üretilmesi üzerine yapılan çalışmalarda *Nocard* ve *Roux* (1887) % 5-7 gliserinli ortamlarda kanatlı tipinin daha iyi ürediğini ve insan tipinin zayıf ürediğini, ayrıca, *Pawlowski* (1888) etkenlerin gliserinli patatesli besi yerinde ürediklerini saptamışlardır(6).

Tüberküloz basili 1882'de *Koch* tarafından gösterildikten sonra 1896'da *Lehmann* ve *Neumann* tarafından *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir(66). Tüberküloz basilinin, ilk kez ABD'de morfolojik, kültürel ve patolojik özelliklerine göre, insan, sığır ve kuş tipi olarak tanımlandığı bildirilmiştir. İngiltere'de Kraliyet Komisyonu 1911'de sığır suşlarını *M. bovis* olarak ima etmişse de bu isim 1970 yılında yayınlanıncaya kadar geçerlilik kazanmamıştır. Ancak bu

klasifikasyonda *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microti*'nin *M. tuberculosis*'in alt türleri olduğunu savunan araştırmacılar tarafından eleştirildiği belirtilmiştir(91). İlk araştırmacılar bakteriyi "tüberküloza neden olan türler" *M. tuberculosis*, *M. avium* ve *M. bovis* ve bunların dışındaki mikobakterileri ise "saprofitik" olarak sınıflandırmışlardır. İkinci grupta yer alan mikobakteriler genel olarak "Tüberküloz Basilinden Farklı Diğer Mikroorganizmalar" (*Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli*, MOTT), "atipik", "anonim", "intermediate", "çevresel" veya "oportunist mikobakteriler" olarak tanımlanmıştır. Fakat bu isimler tutarlı olmamış; *Runyon*, tüberküloz basili kompleksinin *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microti*'yi kapsadığını bildirmiştir(102). *Jubb ve Kennedy*(63), 4 klasik tüberküloz basilinin daha çok insanlarda *M. tuberculosis*, sığırlarda *M. bovis*, kanatlılarda *M. avium* ve tarla farelerinde *M. microti*'den ibaret olduğunu kabul etmişlerdir. Ayrıca balıklarda ve soğuk kanlı hayvanlarda hastalık yapan tipleri de bunlara eklemiştirler. Bunlar, günümüzde balıklarda *M. marinum*, kurbağalarda *M. fortuitum*, kaplumbağalarda *M. chelonae* olarak adlandırılmıştır(91).

Runyon (102), tüberküloz basili MOTT'den ayırt etmiş ve MOTT'yi üreme hızı ve pigment formasyonuna göre 4 sınıfa ayırmıştır. *Marks*(72), insan klinik örneklerinden tüberküloz basili ve oportunist mikobakterilerin izolasyonu esasına dayanan bir klasifikasyon sistemi bildirmiştir. Bu sistem üreme sıcaklığı ve önemli bazı antitüberkülozik ilaçlara duyarlılık testlerini içermektedir. Araştırmacı, epidemiyolojik çalışmalarda çok önemli olmasa bile hastaya doğru bir tanı konmasının, izole edilen suşun tür düzeyine kadar mümkün olduğunca doğru olarak tanımlanmasına bağlı olduğunu bildirmiştir. *Runyon* (102), tüberküloz basiliyi tanımlamaya yarayan ve *M. tuberculosis*'i *M. bovis*'ten ayırt eden testleri açıklamıştır. *Collins ve Grange* (23), çeşitli ülkelerde sadece insanlardaki tüberküloz basilinin tiplendirilmesine ilişkin çalışmalardan dolayı, *M. bovis* insidansının yeterince anlaşılmadığını savunmuşlardır.

Veteriner Hekimliği alanında çalışan araştırmacılar hayvanlardan izole edilen mikobakterilerin tanımlanması için çeşitli metodlar kullanmışlardır. Ancak *M. bovis* ve *M. tuberculosis*'in birbirinden ayrılmasında tek bir test kesinlikle yeterli değildir.

Türkiye'de sığır tüberkülozunun varlığı yıllar önce saptanmış, çeşitli araştırmacılar tarafından hastalıkla ilgili çalışmalara 1900'lü yılların başında başlanmıştır. Ancak hastalığın Türkiye'deki insidansı hakkında sağlıklı bir bilgi bulunmamaktadır. Eldeki bilgiler, mezbahe kesim sonuçlarına dayanan istatistikî sonuçlardan çıkarılmıştır. *Rıza*

İsmail (60) 1929 yılında, 7336 ineğe tüberkülin uygulayarak ilk enjeksiyonda 141 hayvanı pozitif bulup kesime sevk etmiştir. Kesime sevk edilen hayvanlardan 43 hayvanda meme ve 1 hayvanda da uterus tüberkülozuna rastlandığı bildirilmiştir. Yine 1929 yılında *Raif Sedat* tarafından aşılama çalışmaları yapılmıştır(106). *Özcebe* (83), teşhis amacıyla kendi hazırlamış olduğu tablet tüberkülinleri denemiş ve başarılı olduğunu bildirmiştir. *Golem*(45), 1941 yılında, Türkiye'de sütlerde ve mezbahalarda saptanan tüberküloz vakalarını bildirmiştir. *Aygün ve Hepar* (13), teşhis için hazırlamış oldukları tablet tüberkülinleri denemişler ve kullanışlı olduğunu belirtmişlerdir. *Attila* (10), etkenlerin boyanmasında osol metodunun diğer boyama metotlarına göre daha üstün olduğunu göstermiştir. 1946 yılında *Başaran*(15), Karacabey, Çifteler, Konya, Kazova ve Çukurova'da cinsiyet ve ırka göre tüberküloz oranlarını bildirmiştir. *Onuk* (81), yaptığı çalışmada, oftalmo tüberküline karşı alınan cevap ile otopsi sonuçlarını karşılaştırmıştır. *Ertürk* (37), sütle yapılan serolojik testlerin meme tüberkülozunun tanısı için çabuk bir yol olabileceğini savunmuştur. *Artun* (7), bir beygirde rastladığı tüberküloz olayını bildirmiştir. *Oral* (82), Ankara Mezbahasında kesilen hayvanlarda tüberküloz oranının %3-4, Kars kökenli olan hayvanlarda ise %7-10 oranında olduğunu rapor etmiştir. *Uçar* (117), tüberküloza karşı izoniazid kullanımı ve tüberküloz etkenin identifikasyonu ile ilgili çalışmalarda bulunmuştur. *Atun* (11), Kıbrıs'ta 1965 yılında tüberkülin testi kullanarak yaptığı çalışmada reaktör sayısının oldukça az olduğunu bildirmiştir. *Ertürk ve Finci* (38), çeşitli mikobakterilerin identifikasyonu üzerinde çalışmışlardır. *Özgencil* (84), *M.tuberculosis*'le infekte edilmiş danalarda avian ve mammalian tüberkülinlerin lokal reaksiyonlar üzerine etkisini araştırmış ve reaksiyona katılan kan hücrelerinin durumunun kandaki düzeyleri ile ilgili olmadığını bulmuştur. *Akay ve ark.*(1), bir minkte rastlanan ve *M. bovis*'ten ileri gelen bir tüberküloz olgusunu bildirmişlerdir.

M.bovis, Bergey's Manuel'in 1986 baskısında *Mycobacteriaceae* familyası içerisinde *Mycobacterium* genusunda yer almaktadır(121). Etken, uzun, düz çomaklar tarzındadır. Kokoid, filamentöz ve branşlı formlara da rastlanabilir. 0.2-0.6 x 1.5-4.0 µm boyutlarında, Gram pozitif, sporsuz, hareketsiz ve asido-rezistans özelliğe sahip bu etkenler kapsüllü olmamalarına karşın, hücre duvarlarında bulunan bol miktardaki lipoidal maddelerden dolayı normal boyalarla boyanmazlar.Etkenin boyanması amacıyla Ziehl-Neelsen boyama metodu kullanılır.Etken auramin-O boyası ile boyandığında fluoresans mikroskopta görülebilir(6,76,121,120,124).

M.bovis aerobik bir mikroorganizma olup, üremesi için özel besi yerlerine ihtiyaç duyar. İlk izolasyon için zenginleştirilmiş besi yerleri gerekir ve bunlar genellikle yumurta, bazen de kontaminantların üremesini engelleyen boyalar içerirler. Üreme süreleri çok uzun olup 37°C'de 3-4 haftada koloni oluştururlar. Etkeni üretmek için gliserin içermeyen Löwenstein-Jensen, Dorset, Stonebrink gibi katı besi yerleri ve Dubos, Proskauer-Beck gibi sıvı besi yerleri kullanılabilir. *M.bovis*, katı besi yerlerinde 4-5 haftada kuru kabark veya kenarları düzensiz oval koloniler oluşturur. Gliserinsiz sıvı ortamlarda ise üstte buruşuk bir zar oluşturarak ürer. Tüberküloz etkenlerinin doku kültüründe üremeleri, benzer infeksiyonların patojeniteleri üzerindeki ilk çalışmalarından itibaren ilgi çekmeye başlamıştır. Dalak, karaciğer, monosit ve HeLa hücre kültürlerinde, hücrelerin infeksiyonu ilk günlerden itibaren hızla ilerler. Virulent suşların çok hızlı ürediği, üremenin 3-5 gün içinde görüldüğü ve konakçı hücrelerin yıkımlandığı bildirilmesine rağmen bu metodun primer izolasyon için konvansiyonel kültür metotlarından daha az duyarlı olduğu açıklanmıştır(6,18,36,65,76).

M.bovis, karbonhidratları fermente etmez, katalaz, nötral red pozitif, aril sülfataz (3 gün içinde), niasin ve tween 80 hidrolizasyonu negatiftir. Yeni izole edilen insan ve sığır tipi etkenler sıvı kültürlerde filamentler veya kordlar şeklinde üreme eğilimindedirler. 1947'de, bu özelliğin insan ve sığır tiplerinin virulansı ile ilgili olduğu bulunmuştur. Bu filamentler petrol eter ile parçalandığında in vitro olarak lenfositlerin mobilizasyonunu engelleyen toksik bir substans saptanmıştır. Bu substans attenuue edilmiş BCG suşlarından ve *M.smegmatis* gibi nonpatojen türlerden de ayrılabilirdiği için virulans ile ilgisi tam olarak açıklanamamıştır(18,76).

Son yıllarda bazı suşların *M. bovis* ile *M. tuberculosis* arasında yer aldığı görülmüştür ki bunlar da *M. microti* haricindeki suşlardır ve bunların *M. africanum* ve *M. asiaticum* oldukları gösterilmiştir(23), fakat bu etkenlerin sığırlarda hastalık yaptığı, *Berggren* (16) hariç diğer hiçbir araştırmacı tarafından bildirilmemiştir.

Sığırlarda lokalize olan ve makroskopik ve histolojik olarak *M. bovis*'in neden olduğu lezyonlara benzeyen lezyonlardan atipik mikobakteriler üretilebilirler. Bu mikobakterilerle infeksiyon, muhtemelen çevresel ve lateral ya da vertikal bulaşmayla ilgili olabilir. Bu gibi infeksiyonlar bovine tüberküline karşı bir hassasiyet gösterebilir(27) ve bu infeksiyonlar tüberküloz kontrol programlarına bir engel oluşturabilirler(91). Histopatoloji, sığır tüberkülozunu bu infeksiyonlardan ayırt etmede güvenilir bir yol değildir. Bu yüzden sığırlardaki kontrol programlarının uygulanabilmesi

açısından ve sığır tüberkülozisinin doğru tanısı için varolan lezyonlardan *M. bovis*'in izolasyonu ve identifikasyonu gereklidir.

Sığır tüberküloz etkeni *M. bovis* tipik bakteri hücre yapısına sahiptir. Fakat tüm mikobakteriler gibi diğer bakterilerden önemli olan farkları çok kalın bir hücre duvarına sahip olmalarıdır(18,76,91,124). Mikobakterilerin yüzey tabakaları diffuz bir lipoidal tabakadan ibaret olup iki katmanlı duvar ve plazma membranı, büyük bir olasılıkla hem konakçı hücresinde hem de dış ortamda yaşama yeteneği vermektedir. Hücre duvarı komponentleri, özellikle mikolik asit, bazik fuksin gibi boyaların tutulmasını sağlarken, sulandırılmış asitlerle dekolorizasyona engel olur. Bu asitlere dirençlilik, klinik örnekler ve patolojik materyallerde mikobakterilerin çabuk identifikasyonu açısından pratik önem taşır. Bununla birlikte aside dirençlilik sadece mikobakterilere ait bir özellik olmayıp bazı cinsler de kısmen (*Nocardia*, *Corynebacterium* ve *Rhodococcus*) aside dirençli türleri içerirler(91).

Hücre duvarının kimyasal yapısı komplekstir ve peptidoglikanları, arabinogalaktanları, mikolik asitleri, yüzeysel olarak mycoside'leri kapsayan lipidleri, cord faktörlerini ve organizmanın genel faaliyetlerinden sorumlu sulfolipidleri içerir. Bu komponentler, güçlü adjuvant etkileri, granulomlar oluşturmaları ve membranları parçalamaları gibi sahip oldukları biyolojik aktiviteleri yüzünden biyokimyasal olarak tek bir noktada karakterize edilmişlerdir. Bu hücre duvarı komponentlerinin tüberküloz basilinin patojenitesi ve immun yanıtındaki rolü araştırma ve tartışma konusu olarak kalmıştır. Bununla birlikte *M. tuberculosis*'in patojenitesi çeşitli lipid faktörlerine bağlanmışsa da, etkenin fagositlerin litik etkisinden kurtulmasının tam mekanizması kesin olarak aydınlatılamamıştır(91).

Tüberküloz etkeninin kuru ağırlığının % 40 kadarını oluşturan yüksek lipoidal substans yanında kuru ağırlığın yaklaşık yarısını, önemli bir kısmı nükleoprotein olan proteinler oluşturur. Polisakkaritler nispeten az miktarda bulunurlar. Mikobakteriyel lipidler detaylı olarak araştırılmış ve nötral yağlara ilaveten lipidlerin 2 genel tipi ayırtedilmiştir(76). Birincisi palmitik, linoleik ve linolenik asitlerden başka tüberküloz basiline ait serotik asitle izomerlik gösteren fitoik asit ve stearik asitle izomerlik gösteren tüberkülostearik asit gibi 2 asidi kapsayan doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluşmuş fosfolipidlerdir. İkincisi ise, mannoz, arabinoz ve galaktoza hidrolize olmuş polisakkaridleri içeren bir aside dirençli bal mumu tabakasıdır. Bu tabaka kompleks bir gliserid olan yumuşak balmumu ve mikolik asit olarak adlandırılan yüksek molekül ağırlıklı doymuş hidroksimetoksi asit, phthiocerol olarak

bilinen yüksek alkol ve levorotator yağ asidi olan mikoserosik asitten oluşmuş sabunlaşmayan bir yapıdır. Bu substanslardan bazıları fizyolojik olarak aktiftir. Sabunlaşmayan aside dirençli balmumu, diferensiyel olamamış bağ doku hücrelerinin üremelerini uyarır ve fitoik asit epiteloid hücrelerin proliferasyonunu indükler. İmmunolojik olarak aktif ve inaktif substansları içeren polisakkarit karışımları, memeli tüberküloz etkenlerinden izole edilmiştir, fakat bunların önemi henüz anlaşılammıştır. En fazla immunolojik özelliği, hücrenin protein bileşenlerinin gösterdiği açıktır ve değişik tüberkülinlerin hazırlanması ve aktiviteleri üzerinde çalışılmıştır(124).

Mikobakterilerin lipid içerikleri oldukça yüksektir ve infeksiyona karşı oluşan immun yanıtta ve virulans üzerinde direkt rol oynar, fakat bu lipidlerin yapısının kompleks oluşu onların yapılarının ve rollerinin tam olarak anlaşılmasına engel olmaktadır(77). Hücre duvarında bulunan bu lipidlerin hidrofobisitesi dehidrasyona dirençli olmada ve olumsuz şartlarda organizmanın hayatta kalmasında önemli bir role sahip olabilir. Mikobakteriyel lipidler mikolik asitler, glikolipidler ve diğer çeşitli lipidlerden oluşmuştur. Mikolik asitler *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Corynebacterium* genuslarında bulunan branşlı yağ asitleridir, fakat bu lipidlerin örneklerinde görülen büyük farklılıklar sayesinde çok sayıdaki mikobakteriyel türlerin identifikasyonu için, ince tabaka kromatografi ile lipidlerin analizi esasına dayanan bir sistem oluşturulabilir(91). Minnikin(77) tarafından sadece *M. bovis* ve *M. tuberculosis*'e ait spesifik mikolik asitlerin bulunduğu bildirilmiştir.

Mikobakteriyel glikolipidler, özellikle sulfolipidler virulensi arttırabilirler(47), fakat bu basit bir ilişki değildir. Glikolipidler lizozom-fagozom füzyonunu ve bakterinin fagositler içerisinde lizisini önleyebilirler. 'Cord faktörü' olarak adlandırılan bir sulfolipid (6, 6-O dimycoltrehalose), önemli bir virulens faktörü olabilir. Bu madde belki de, toksik olaylara neden olarak mikobakteriyel hücrelerin virulensini arttırmakta veya hastalığın oluşmasında önemli bir rol oynamamaktadır. Peptidoglikan içeren heterojen wax D gibi diğer lipidler, *M. tuberculosis*'ten ayrılabilir. *M. bovis*'ten ayrılan wax D nedense daha az peptidoglikan ve daha çok lipopolisakkaridten ibarettir. Bu maddenin sahip olduğu güçlü adjuvant etkisi muramil dipeptit varlığına bağlıdır (MDP) , fakat granulomlar da oluşturabilmektedir(91).

Hücre duvarının temel yapısını oluşturan peptidoglikan, aminoasitlerle bağlanmış olan N-glikolil muramik asit ve N-asetil glukozamin'den ibarettir. Bu yapı, birçok konakçının sekresyonlarında bulunan lizozim enzimi ile ayrıştırılabilir ki bu

reaksiyon da immunolojik olarak güçlü bir adjuvant etkiye sahip olan muramil dipeptit (MDP) oluşmasını sağlar(91).

M. bovis'in dış ortamda canlı kalabilmesi pH, nem ve ultraviyole ışığı ile ilgilidir. Bununla birlikte, bu süre aylarla ifade edilebilirken, fazla sayıda *M. bovis* ile infekte edilen meralarda etkenlerin sadece 14 gün süreyle canlı kalabileceği de bildirilmiştir(91). İngiltere'deki eradikasyon programlarının ilk dönemlerinde reaktörler kullanılarak otlatmaya kapatılan arazilerin 1 ay süreyle otlatılmamalarının yeterli olduğu bildirilmiştir (91). Mikobakterilerin deterjanlara karşı dirençli olması önem taşır ve etkenin izolasyonu amacıyla deterjanların kullanılmasına olanak sağlar. Tüberküloz basilleri, ısıya karşı diğer vegetatif formdaki bakterilerle hemen hemen aynı derecede dayanıklı olmasına rağmen, kurumaya, kimyasal dezenfektanlara ve diğer imha edici çevresel etkilere karşı nispeten daha dirençlidir. Bunun, etkenlerin sahip olduğu balmumu tabakasının bir sonucu olması çok muhtemeldir. Etken, putrifiye olmuş balgamda aylarca canlı kalabilir, ayrıca kurumuş balgamda da soğuk ve karanlık yerlerde 6-8 ay kadar canlı kaldığı bilinmektedir. Kurumuş balgamda 100°C'de 1 saat canlı kalabilen etken, nemli ısı ile ölür. Balgam içindeki etken, %5'lik fenol uygulaması ile ancak 24 saatte öldürülebilmektedir. Diğer dezenfektanlar da aynı şekilde çok geç etki ederler, hipokloritler ve gerçek sentetik deterjanların etkileri hemen hemen hiç yok gibidir. Etkenler direkt güneş ışığında ise hemen ölmektedirler(18,76).

Streptomisin, p-aminosalisilik asit (PAS), sülfonlar, tiyosemikarbozanlar ve izoniyazid gibi gerçek primidin derivatlarını kapsayan substanslar tüberküloz etkenleri için bakteriyostatiktir. Bu substanslar kemoterapötik amaçlar için oldukça uygundur. Tüberküloz etkeni de diğer bakteriler gibi, kemoterapötiklere karşı in vivo ve in vitro olarak dirençli hale gelebilir(18,76).

M. tuberculosis, faj duyarlılıklarına göre, A, B ve C olarak 3 gruba ayrılmaktadır. Ayrıca A ve B arasında intermediyer olarak duyarlılık gösteren suşlar da yine 3 ana bölüme ayrılmaktadırlar(6).

Çok fazla sayıda mikobakteriyel fraksiyon, selluler ve humoral immun yanıtı uyarabilir. Bu antijenlerden bir kısmı ile konakçı immun yanıtı ile ilişkileri üzerinde, bir kısmı ile de mikobakterilerin identifikasyonu üzerinde çalışılmıştır. Hazırlanan antijenler genellikle ya sitoplazmik antijenlerden oluşan eriyebilir karakterde antijenler ya da partiküler antijenler olmuştur. *Stanford ve Grange* (109) tarafından

immunodiffuzyon yöntemi kullanılarak eriyebilir antijenlerle yapılan çalışmalarda bu antijenler 4 büyük gruba ayrılmışlardır. Bunlar;

Grup1; bu antijenler tüm mikobakteri türlerindeki ortak antijenlerdir ve bakteriyel genus ile ilgilidir.

Grup 2; bu antijenler sadece yavaş gelişen mikobakterilerde bulunur.

Grup 3; bu antijenler çabuk gelişen mikobakteriler ve nokardialarda bulunur.

Grup 4; bu antijenler sadece bireysel türlere spesifiktir.

Bu antijenik yapının önemli sonucu, patojenik mikobakterilere karşı oluşan immun yanıt spesifik değildir. Bununla birlikte hızlı gelişen mikobakteriler ve ilişkili cinsler de patojen mikobakterilerdeki antijenlere karşı bir immun yanıt oluşturabilirler(91).

Arabinogalaktanın tüberküloz basilinde, diğer mikobakterilerde, korinebakterilerde ve nokardialarda bulunduğu gösterilmiş ve ortak antijenlerinden birisi olarak bulunmuştur(91). C mikosid'ler olarak da adlandırılan peptidoglikolipidlerin sadece S tipli koloni oluşturan mikobakterilerde var olduğu gösterilmiştir. Bunlar *Schaefer'in* (105) serotiplendirme sisteminde ve *Jenkins'in* (62) lipid analiz metodunda kullanılan tip spesifik antijenleri oluştururlar. Bu tiplendirme metodları *M. tuberculosis* veya *M. bovis* için kullanışlı değildir, çünkü tip spesifik aglutine edici antijenler ve spesifik lipid örnekleri bu türlerde henüz bulunamamıştır.

Tüberküloz basilindeki varyasyonlar yoğun olarak incelenmesine rağmen yeterli sonuçlar alınamamıştır. Koloni morfolojisindeki varyasyonlar, çevre şartlarına karşı geçici bir adaptasyon ve farklı bir besi yerine transfer sonucu görülen değişikliklerdir. Bunun yanında *Calmette* ve *Guerin* tarafından, bir sığır tüberküloz suşu, 13 yıl boyunca safralı, gliserinli patatesli besi yerinde 230 kez pasaj yapılarak insanlar için virulensi azaltılmış bir suş haline getirilmiştir(18). Bu suş, *BCG (Bacille Calmette Guérin)* olarak isimlendirilmiş ve tüberküloza karşı aktif bağışıklamada önem kazanmıştır. Görülen bu virulens kaybı kalıcı olup, suşun normal besi yerlerine pasajı ile tekrar ortaya çıkmamaktadır.

Koch'un Old tüberkülin'i, *M. tuberculosis'in* otoklavda ısı ile öldürülen sıvı kültürlerinin steril filtratlarının konsantre edilmesi ile hazırlanmıştır. Aktif antijenlerin yapısı tam olarak saptanamamıştır. Bu allerjenin içinde mikobakterilerin çeşitli metabolitleri, yapısal komponentleri ve gliserin bulunduğundan spesifitesi düşük

olarak bulunmuştur. Bu problemler, tüberkülin purifiye protein derivatı üretilerek çözümlenmiştir (PPD). Tüberkülinlerdeki, özellikle PPD'deki, aktif antijenlerin doğal yapısı tam olarak bilinmemektedir. Ancak aktivitelerinin tripsinizasyon ile ortadan kaldırılması muhtemelen protein yapısında olduklarını göstermektedir(86). PPD'ler içerdikleri çok farklı proteinler, polipeptitler ve polisakkaridlerden dolayı saf maddeler değildirler. *M. tuberculosis*'e spesifik antijenler konusunda araştırmalar yapılmış, bu amaçla fiziksel ve kimyasal tekniklerin farklı varyasyonları kullanılmış, ancak bu tekniklerle amaca ulaşamayacağı, spesifik antijenik determinantları tanımlayabilecek başka tekniklere gerek duyulduğu bildirilmiştir. Monoklonal antikolar konusundaki gelişmeler de bu konuda yapılan araştırmalara çok büyük katkıda bulunmuştur(91).

Mikobakteriye karşı oluşan immun yanıt açısından türler arasında önemli farklar olduğu gibi insanlar arasında da immun, yanıtta bir yelpaze olduğu görülmüş ve bunun diğer türler arasında da olabileceği düşünülmüştür. Son araştırmacılar tarafından hücrel yanıtın antikor yanıtından daha önemli olduğu bildirilmiştir (26,97,110,116). Fakat, immun regulasyonun mekanizması tartışma konusudur. Tüberküloz basiline karşı oluşan immun yanıtın başlıca özellikleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Kobaylarda ilk dermal infeksiyon, sistemik yayılma ile yavaş, progresif lokalize granulomatöz lezyonlarla sonuçlanırken, ikinci infeksiyon ise inokulasyondan 72 saat sonra maksimum şişlik ve lokalize nekrotik lezyonlarla sonuçlanır. "Koch fenomeni" olarak bilinen bu nekrotik dermal yanıt, lokal olarak organizmaları elimine eder, fakat ilk sistemik infeksiyonda böyle bir etki göstermez. *Koch*, ölü tüberküloz basili, ekstraktları veya bütün olarak verilen organizmalar tarafından, benzer şekilde geçmiş bir aşırı duyarlılığın oluştuğunu göstermiş; bu reaksiyonun tanı açısından önemli olduğunu bildirmiş ve bu tüberkülin deri testi olarak adlandırılmıştır(91).

2. Tüberkülozda hiper immun serumun koruyucu etkisinin olmadığı bildirilmiştir(91).

3. Vericilerden alınan lenfoid hücrelerin alıcılara aktarılması tüberkülin duyarlılığının ve tüberküloza karşı bağışıklığın aktarılması ile sonuçlanır. Bu lenfoid hücreler, fare modelinde timusa bağımlı (T) lenfositler olarak tanımlanmıştır(91). Koruyucu bağışıklık, hücrelere bağımlı bağışıklık (CMI) olup, doku hasarına yol açan T hücrelerine bağımlı hipersensitivite ise gecikmiş tip aşırı duyarlılıktır (DH).

4. *Lurie* (69), reinfeksiyon oluşturulmuş tavşanlarda mononukleer fagositlerin tüberküloz basilini normal fagositlere göre daha yüksek oranda öldürdüğünü ve yuttuğunu göstermiştir. İkincil immun yanıtın, T-lenfositler tarafından oluşturulan lenfokinlere bağımlı olduğu gösterilmiştir(91). Bu hücreye bağımlı bağışıklık aslında infeksiyon bölgesinde T lenfositlerce salgılanan lenfokinler aracılığı ile aktive olan makrofajlar tarafından oluşturulan lokal bir olaydır. İlginç olan taraf lenfokinlerin salınımı spesifik olmasına karşın, aktive olan makrofajların etkisi nonspesifiktir.

5. Bir lezyonun ilerlemesi veya gerilemesi makrofajın sitoplazması içinde tüberküloz basilinin üremesini inhibe etme yeteneğine bağlıdır. Bir basil makrofaj içine alındığında fagosom denen bir vakuol içine alınır. Bu fagosomların erimesi için yıkımlama etkisine sahip lizozomları taşıyan litik enzimlere ihtiyaç vardır. Tüberküloz basili makrofajlarca yıkımlanmaktan üç yolla kaçabilir: mikobakteriler ya bu fagosom-lizozom birleşmesini engelleyebilirler; ya sitoplazma içinde fagozomdan kaçabilirler; ya da fagozom-lizozom birleşmesi sırasında litik enzimlere direnç göstererek yıkımlanmadan kurtulabilirler. *M. bovis*'in fagosom-lizozom birleşmesini engellediği gösterilmiştir(91).

6. Gecikmiş aşırı duyarlılık (DH) ve hücreye bağımlı bağışıklık (CMI) arasındaki ilişki tartışma konusudur. Bu iki olayın, birbirlerinden ayrı oldukları bildirilmişse de, her ikisi de immun kompotent T hücrelerine bağlı olduğu için nedenlerinin ilişkili olduğu da savunulmuştur. Bununla birlikte bu iki yanıt deneysel olarak ayrılabilirdiği halde, doğal olan infeksiyonlarda infeksiyondan yedi ile on gün sonra başlayıp birlikte ilerler. Aşırı duyarlılık, konakçı için zararlı olduğundan, konakçı için yararlı olan normal immunolojik reaksiyonlardan farklı olduğu savunulmuştur. Hayvan modellerinde ve insanda aşırı duyarlılığın önemsiz ya da çok az oranda koruyucu etkisi görülürken, yüksek derecede aşırı duyarlılık veya allerji koruyucu değildir(91). *Dannenberg* (29), aşırı duyarlılığın makrofajlar ve lenfositlerin toplanması ile sonuçlandığını, böylece hızlı bir şekilde oluşan tuberkelin hücresel bağışıklığın harekete geçmesi için sınırlı bir alan sağladığını bildirmiştir. Eğer antijen çok küçük miktarlarda ise tüberküloz basili yok edildiği için bu olay faydalı olarak görülür. Antijen miktarı çok fazla olursa aşırı duyarlılık, hücre ölümü ve kazeifikasyona kadar ilerleyen doku yıkımı ile sonuçlanır. Bu doku yıkımına, konakçının kendi lenfositleri tarafından salgılanan toksik lenfokinler ve makrofajlarla granülositlerin salgıları neden olur. Oysa bu görüşün aksine deri testinde yüksek hipersensitivite gösteren bireyler veya türler tüberküloz infeksiyonlarına aşırı duyarlıdırlar ve yoğun lezyonlar görülebilir(41).

Bu bulguların sığırlarda *M. bovis*'e karşı oluşan immün yanıtı uygulanması, lenfositleri ve fagositik hücreleri kapsayan hücrelerin fonksiyonlarını ve tiplerini göz önünde bulundurarak tartışılmalıdır. Sığırlarda periferal kandaki lenfositler, oluşan yanıt özel bir lenfoid organ veya dokuda sınırlı olabileceğinden, oluşan immün yanıtın ortaya çıkarılması için gerekli değildir. Ayrıca timus, bursa, dalak, lenf nodülleri gibi farklı lenfoid organlar lenfositlerinin alt populasyonlarında farklılık gösterirler ve antijen, lenfositlerin hareket tarzını değiştirir. Bununla birlikte insan ve farelerde T hücreleri ve alt populasyonları spesifik markerlar kullanılarak identifiye edilebilir, sığır T hücreleri için bugün kullanılan metodlar sınırlıdır (59).

B lenfositlerin önemli bir görevi vardır; antikor üretmek, oysa T lenfositleri son derece karışık görünen geniş bir fonksiyon yelpazesine sahiptir. Genel olarak T hücreleri efektör ve düzenleyici fonksiyonlara sahiptirler. Efektör hücreler olarak sitotoksik T hücreleri antijen taşıyan hücreleri öldürebilirler, fakat bu mekanizmanın bakteriyel infeksiyonlarda rolü görülmez(91). T hücreleri bakteriyel infeksiyonlarda lenfokinler aracılığı ile diğer hücreleri düzenleyerek etki gösterir, bunu da makrofajların aktivasyonu, diğer yangısal hücreler için kemotaktik faktörlerin oluşturulması ve interleukinler ve γ -interferon üretimi ile lenfosit proliferasyonunu düzenleyerek yapar. Buna ek olarak T hücreleri hem B, hem de T lenfositler için yardımcı ve baskılayıcı aktivitelerde de görev alır. Bu her iki hücrenin de spesifik antijenleri tanıma ve yanıt oluşturma yetenekleri vardır ve bu hücreler blast hücrelerden olgunlaşarak etki gösterirler, T hücrelerinin ürettiği lenfokinler sonucu B hücreleri de antikor üretirler. Böylece tüberkülozlu sığırdan alınan periferal kandaki lenfositler *M. bovis* PDD ile kültüre edildiğinde şekil değiştirir ve çoğalır, bu aktivite, lenfosit transformasyon testinin(LTT) temelini oluşturur (91).

Sığırlardaki fagositik hücrelerin iki önemli türü polimorfnükleer fagositler (PMN) ve mononükleer fagositlerdir. Periferal kanda PMN predominant durumdadır, mononükleer fagositler dolaşımdaki monositleri ve doku fagositlerini kapsar ki bu hücreler karaciğer, dalak, lenf nodülleri ve akciğer gibi organlarda çok fazla sayıda bulunur. *M. bovis* akciğer alveolleri veya derideki bir lezyona yerleştiği zaman PMN ve makrofajların gelişen lezyona gelmesini sağlayan güçlü bir kemotaktik stimülasyon oluşturur. PMN'lerin büyük bir kısmı birkaç saat içerisinde infeksiyon odağına girer ve bakterileri sindirirler. Bu yutma olayı bakteriyi kaplayan opsonin ve antikorların bulunması halinde daha da çabuk şekillenir. PMN 'ler *M. bovis*'i tam olarak öldüremezler, fakat bakterinin PMN 'ler içine alınması onların ölmesine ve enzimlerle

mikobakteriyel antijenlerin serbest bırakılmasına neden olur, bu da *M. bovis* infeksiyonlarının erken dönemlerinde histolojik olarak karakteristik olan abse formu ile sonuçlanır. PMN'lerin hücresel bağışıklığa bir katkısı yoktur, bunların fonksiyonları, başlayan lezyonlardaki ölü bakterilerin ortadan kaldırılması ve belki de yardımcı T hücrelerinin uyarılması ve B hücrelerinin antikor üretmesi için mikobakteriyel antijenlerin işlenmesidir. Bunun aksine doku monositleri, canlı ve ölü bakterileri ortadan kaldırır, antijeni işler ve T lenfositlere sunar. Bu işlemin sonucunda T lenfositleri lenfokin üretmek için aktive olur, sonuçta da *M. bovis*'i öldüren monositik fagositler aktive olur. Sığırlarda monositik fagositler, antikorlar için Fc-reseptörleri ve komplement için C3 reseptörleri gibi yüzey markerlarına sahiptir(116). Bu hücrelerin eşsiz fonksiyonlarından biri de yüzey reseptörleri veya diğer yüzey molekülleri ile antijenleri bağlamaları ve antijenleri uygun şekilde lenfositlere sunmalarıdır. *Muscoplat ve ark.(79)*, sığırlarda *M. bovis* PDD'ye karşı lenfosit uyarımının, makrofajların varlığına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Böylece monositik fagositler infeksiyonu sınırlandırır ve özel olarak hazırlanmış antijenleri sunarak spesifik T lenfositlerini aktive ederler(116). Buna ek olarak rodent modellerinde makrofajların T lenfosit proliferasyonuna neden olan eriyebilir faktörler ve aynı zamanda lenfosit proliferasyonunu inhibe eden prostaglandinler ürettiğine dair bulgular elde edilmiştir(91). Eğer makrofajların tüberküloz basilini öldürme güçleri yeterli değilse basiller çoğalır ve hastalık ilerler. İnfeksiyonun erken dönemlerinde, bu infekte makrofajlar basilleri daha uzak bölgelere yayarlar. Makrofajlarda tüberküloz basilinin olması antikor üretimi için bir antijen kaynağı gibi etki gösterebilir ve dolaşımdaki yüksek antikor titresinin nedeni olabilirler. Bu olayda antijen-antikor kompleksinin bir çeşit immuno-patolojik olayı başlatması ile sonuçlanabilir. Makrofajlarda mikobakteriyel antijenlerle sindirilebilir balmumlarının bulunması ve lezyonlardaki makrofajların yüksek oranda yıkımlanması tüberkülozun karakteristik özelliği olan kronik yangı ve granulom formu ile sonuçlanır. Epiteloid hücreler muhtemelen aktive olan monositik makrofajların farklılaşması ile oluşmaktadır. Çok çekirdekli Langhans dev hücrelerinin kaynağı muhtemelen epiteloid hücrelerdir. Fare modellerinde T hücrelerinden yoksun fareler *M. bovis* BCG ile solunum yolu ile infekte edildiklerinde akciğerde basillerle dolu büyük köpüklü makrofajlar bulunan yaygın granulomlar gelişmiş ve hastalık ilerlemiştir(91). *Snider ve ark. (107)*, neonatal olarak timektomi yapılan buzağuları intradermal olarak *M. bovis* BCG ile infekte etmişler, lezyonlarda Langhans tipi dev hücrelerinin sayısının arttığını ve lenfositlerin az olduğunu

saptamışlardır. Bununla birlikte PPD'ye karşı ne deri testi ne de in vitro LTT testinin yanıtı etkilenmemiştir. Araştırmacılar dev hücre sayısındaki artışın hücrenel bağışıklıktaki bir bozukluktan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. *Collins(26)*, tüberkülozdaki immunolojik reaksiyonları yorumlamanın çok zor olduğunu belirtmiştir. Düşük yanıt teknik hatalardan, şiddetli protein eksikliğinden ve deneysel olarak T hücrelerinin baskılanmasından dolayı oluşabilir. Reaktif olmayan hastalarda bildirilen anergi problemi (deri testleri ve hücrenel bağışıklık için kullanılan in vitro testlerde pozitifliğin olmaması) sığırlarda da görülmekte ve kontrol programları için önemli bir problem oluşturmaktadır(91).

Sığır tüberkülozisinin patolojisi değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (41,63,108) tarafından bildirilmiştir. Tüberkülozun patogenezi hakkındaki bugünkü bilgilerimiz, büyük ölçüde insanlar ve laboratuvar hayvanları üzerindeki çalışmalardan elde edilmiştir (91,92). Tüberkülozis her türde farklı bir görünüşe sahiptir ve hayvan türleri arasındaki yayılışı bir kurala bağlı değildir (116). Hayvanlarda, tüberküloz etkenleri genellikle, vücuda solunum ve sindirim yolu ile girerek hastalık oluşturmaktadırlar. Etken vücuda girdiği yerde ürer ve primer efekt denen lezyonu oluşturur. Daha sonra fagositik hücrelerle en yakın lenf yumrusuna gelen etken, burada da patolojik bozukluklara yol açar ve primer kompleksi oluşturur. Eğer konakçı hastalığa dirençli ise bu primer efektler ya rezorbsiyon ve organizasyon ile iyileşir, veya hiç belirti göstermeden uzun süre kalabilirler. Bu olay tam olmayan primer kompleks olarak bilinir. Konakçı direncinin zayıfladığı dönemlerde bu lezyonlarda bulunan canlı mikobakteriler tekrar üreyip kana karışarak erken generalizasyon denen olaya neden olurlar. Sonuçta, başka organ ve dokularda yeni lezyonlar gelişir. Bu lezyonlar akciğerlerde iseler, kazeifiye ve kalsifiye olarak gelişmelerine devam ederlerken, bronş ve bronşiolere açılarak içlerinde bulunan canlı mikobakterilerin öksürükle dışarı çıkmasına neden olabilirler. Böyle olgular açık tüberkülozis olarak bilinir. Bunun sonucunda, canlı etkenleri içeren eksudat, üst solunum yolu infeksiyonlarına ve yutulması ile de sindirim kanalı infeksiyonlarına yol açabileceği gibi, etkenin gaita ile çıkarak etrafı kontamine etmesine de neden olur. Akciğerlerde gelişen bu lezyonlar bronş ve bronşiolerin yanı sıra kan damarlarını da hasara uğrattırır kanamalara neden olabilir. Primer kompleks ve erken generalizasyon ilk infeksiyon periyodu olarak adlandırılır. Etkenler lenfojen, hematojen, temas ve kanallar yolu ile yayılarak generalizasyona yol açarlar. Genellikle hematojen yayılma görülmektedir ve oluşan lezyonların çoğu milier tuberkeller tarzındadır, ancak bunlar

yer yer birleşerek konglomerat tüberkelleri oluştururlar. Tüberkülozu geçiren birey yeniden tüberküloza yakalanırsa buna reinfeksiyon, inaktif tüberkülozlu bir birey yeni bir tüberküloz enfeksiyonuna maruz kalırsa buna da süperinfeksiyon denir. İnfeksiyonun endojen olarak yeniden şiddetlenmesi veya eksojen olarak süperinfeksiyona uğramasına postprimer enfeksiyon periyodu denir. Bu sırada bölgesel lenf düğümleri hastalığa iştirak etmezler ve organ tüberkülozu görülür. Hastalık kanallar sistemi boyunca yavaş yavaş ilerleyerek kronik organ tüberkülozunu oluşturur. Kronik organ tüberkülozu kısmen iyileşebilir veya tüberküloz etkenleri kan yolu ile yeniden vücuda yayılabilirler. Buna geç generalizasyon denir. Bu safhada lenf düğümlerinin tekrar hastalığa iştirak ettiği görülür.

Primer odaklar, olgun sığırlarda %90, genç hayvanlarda ise %40 oranında akciğerlerde görülmektedir. Bu lezyonlar prodüktif veya eksudatif karakterde olmaktadır. Produktif olgularda PNL'in infiltrasyonunu, makrofajlar ve epitelooid tipi dev hücrelerin görülmesi izler. Ayrıca Langhans tipi dev hücreleri de oluşur. Daha sonra tüberkellerin orta kısımları kazeifiye olur ve çevreyi fibröz bir kapsül kaplar. Koagülasyon nekrozuna uğrayan orta kısımda daha sonraları kalsifikasyon görülür. Eksudatif olgular ise etkenin çabuk ürediği akut olaylarda ortaya çıkar. PNL ve eosinofil hücrelerden sonra monositlerin gelmesi ile süren olaylar ya prodüktif hale geçerler, ya da iyileşebilirler. İnsanlardan farklı olarak sığırlarda primer lezyonlar nadiren görülür, eğer bu lezyonlardan direkt kontakt yolla, bronş gibi doğal kanallarla, lenf ya da kan yolu ile yayılma olursa masif milier tüberküloz görülür(91,113). Tüberkülozis, sığır yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede yaygın olarak görülmesine karşın, birçok ülkede de yoğun eradikasyon programları ile kontrol altına alınarak oldukça düşük seviyelere çekilmiştir. Kötü besleme, kalabalık, kötü hijyen gibi stres faktörleri, sürüye kontrolsüz hayvan girişi, infekte hayvanların sütlerinin buzağı beslenmesinde kullanılması gibi faktörler bireyleri hastalığa duyarlı hale getirmektedir.

Sığırlarda enfeksiyonun ortak giriş yolu sindirim ve solunum, daha az olarak da kutan, konjenital ve genital yoldur. Ara sıra da meme sondası, kateter ve hipodermik iğneler gibi araçların kullanılması nedeni ile de iatrojenik bulaşma görülebilir(7,91). Bir yüzyıl boyunca süren tartışmalar akciğer tüberkülozunun doğal bulaşma yolunu ortaya koymuştur. Literatür verilerine göre, *Vallée, Calmette ve Guerin* tarafından savunulan, akciğer tüberkülozunun intestinal orijinli olduğu konusundaki teorinin *Von Behring* tarafından desteklendiği görülmüştür. *McFadyean*'ın, Kraliyet Komisyonunun sindirim kanalıyla enfeksiyonun oluşması için

gerekli dozun, inhalasyon yoluyla infeksiyon oluşması için gerekli dozdan 100 kat daha fazla olması gerektiği yolundaki sonuçlarını açıklayarak karşı çıktığı bildirilmiştir(91). Bu araştırmacı, her iki yolla da infeksiyonun mümkün olabileceğini fakat, inhalasyonun daha muhtemel yol olduğunu bildirmiştir. Bu konu Avustralya'da da tartışma konusudur(42,67) ve İngiltere'de porsuklarla sığırlar arasında bulaşma yönünden bir ilişki görüldüğü açıklanmıştır(74).

En önemli giriş yolunun sindirim kanalı infeksiyonu olduğu, yapılan deneysel çalışmalarla akciğer ve sindirim kanalı infeksiyonlarının kısmen de olsa ayrı olduğu bulunmuştur. Tüberkülozun hava yolu ile bulaşması fikri ortaya çıkmış, *Weels ve ark.*(122), esas olarak sadece bakteri hücrelerinden ibaret nukleus damlalarını içeren küçük partiküllerin inhalasyon yoluyla infeksiyon oluşturabileceğini göstermişler, canlı hücreler içeren büyük partiküllerin inhalasyon yolu ile alındığında infeksiyon oluşturmadıklarını bulmuşlardır. *Lurie ve ark.*(70), inhalasyonla alınan her bir infeksiyöz partikülün ayrı bir tuberkel oluşturduğunu göstermişlerdir. *Francis* (42), sığırlarda görülen infeksiyonların % 80-90'ının solunum yolu ile girdiğine dair bulgular olduğunu bildirmiştir. Ayrıca geğirme sırasında rumen bakterilerinin gazlarla akciğerlere gelerek sindirilmiş basillerin akciğerlere girmesi için bir mekanizma oluşturduğu savunulmuştur(78). *Francis* (41) ve *Stamp* (108)'in her ikisi de patolojik bulgulara göre infeksiyondan oral veya solunum yolunun tek başına sorumlu tutulmasının zor olduğunu savunmuşlardır. İnfeksiyonun ortak giriş yolu konusunda yapılan çalışmalarda primer kompleksin ortak lokalizasyonla sonuçlandığı görülmüştür. Yüzyıllık nekropsi çalışmaları analiz edildiğinde, sığırlarda tüberkülozun bulaşmasında en önemli giriş yolunun aerojen yol olduğu açıkça görülmüştür(91). Sığırlarda aerojen infeksiyonu takiben genellikle primer kompleks akciğerin diaframatik lobunun dorsal-kaudal kısmında ve ilgili lenf nodülünde subpleural olarak bulunur. Eğer hematojen yayılma görülürse akciğerler, dalak, kemik iliği, karaciğer, böbrekler, adrenal bezler, testisler, uterus, meme, beyin zarı veya seröz boşluklarda da lezyonlar görülebilir(63). Çok sayıdaki tüberküloz basilinın sindirilmesiyle sonra sindirim kanalında bir primer kompleks oluşabilir. Sindirim kanalında görülen primer kompleksin daha çok akciğerde bulunan primer kompleksin yayılması sonucunda görüldüğü de savunulmuştur(91). Primer odak dışında ki bu infeksiyonun giriş yolunu gösterir lezyonların dağılımı farklı organların tüberküloza karşı olan duyarlılığına bağlıdır. *Griffin*, bir sürüye giren tüberkülozlu bir sığırdan, sürüye bulaşmanın nispeten az olduğunu bildirmiştir(49).

Doğal ve deneysel infeksiyonun her ikisinde de tüberkülozlu sığırlarda lezyonların dağılımı hakkındaki çalışmalar Francis (41) tarafından incelenmiştir. Bu lezyonların dağılımı sadece infeksiyonun giriş yolunu saptamak için değil, aynı zamanda et muayenesi ve bu etlerin insan gıdası olarak kullanılmasına karar vermek için kullanılmıştır. Lezyonların dağılımı aynı zamanda etlerin gözle muayenesinde kontrol kriteri olarak yarar sağlamıştır. 1888 yılında Walley (118), sığırlardan insanlara tüberkülozun süt, süt ürünleri, et ve direkt olarak ahırlardan bulaştığını savunmuştur. Aynı zamanda etkili bir kontrol için et muayenesinin, veteriner hekimlerin kontrolü altında olması gerektiğini bildirmiştir. Aynı yıllarda, klinik olarak saptanamayan lezyonlardan tüberküloz basili yayıldığı için bu görüş desteklenmiş ve tüberküloz kontrolünde ahırlarda hijyenik şartları düzelterek ve tüberkülozlu hayvanları imha ederek az da olsa bir ilerleme sağlanabileceği bildirilmiştir(91). 1888 yılında İngiltere'de et muayenesi kısmen veteriner hekimlerin kontrolü altındaydı ve sütlerin % 97'si pastörize ediliyordu. Bununla birlikte sığır tüberkülozunun insan sağlığı için kesin olarak bir risk oluşturduğu ortaya konuncaya kadar eradikasyon programları görülmemiştir.

İngiltere'de 1980'li yıllarda *M. bovis*'in izolasyon oranı vakaların % 1.0-1.9'u olarak tahmin edilmiştir(30), bununla birlikte Wilkins ve ark. (123) kuzey batı İngiltere'de eskiden sığırlarda yüksek bir prevalans gösteren bir sahada bu oranı % 2.6 olarak bulmuşlardır. İngiltere'nin yerli popülasyonu için tahmin edilen tüberküloz insidensi 1978'te, 100.000'de 10.7 iken, Hindistan/Asya'dan gelen göçmenlerde bu oran 100.000'de 382 olarak bulunmuştur(75). Bu göçmen vakalarının genellikle, *M. tuberculosis* ve *M. africanum* tarafından oluşturulduğu ortaya konmuştur(24). Ayrıca, İngiltere'nin güney bölgesinde insanlardan izole edilen tüberküloz basillerinin % 1.5'inin *M. bovis* olduğu bulunmuştur(91).

Eradikasyon programlarının tamamlanmasından sonra insanlarda sığır tipi tüberküloz insidensinde büyük oranda bir düşme görülmüştür(41). Bu kez de insanlar sığırlar için önemli bir *M. bovis* rezervuarı olmuşlar ve bu yolla bulaşmalar İngiltere, ABD, Hollanda, İsveç, Yeni Zelanda, Almanya, Kanada ve Çekoslovakya'da bildirilmiştir(91).

M. bovis'in insanlardan sığırlara geçişi sürülerde yaygın olarak hastalığa neden olmuş ancak, *M. tuberculosis* bulaşması klinik olarak bir hastalıkla sonuçlanmamıştır. Ama yine de infeksiyon tüberküline karşı geçici bir duyarlılık oluşturmuş ve belki de organizma sütle dışarı atılmıştır.

İnsanlarda *M. bovis* ve *M. tuberculosis*'ten ileri gelen infeksiyonların klinik prognoz ve tedavisindeki benzerliklerden dolayı dünyanın çeşitli yerlerindeki laboratuvarlar tarafından bu iki bakterinin ayrımı için yapılan girişimler başarısızlıkla sonuçlanmıştır(23,50,101). Bu ayırım iki nedenden dolayı önemlidir. Birincisi sığırların yaygın olarak kullanılan isoniazide karşı dirençlidir. Bu nedenle tedavi şemasındaki düzeltmeler için tür tayini gerekli olabilir. İkincisi, insanlarda *M. bovis* bulunması hastanın insan ve hayvan temasının her ikisini de kapsayan bir uygulamaya kadar uzanabilir. Bu bilgi sığırlardaki tüberkülozun erken tanısını sağlayabilir ve bu da önemli bir korunma sağlar.

Tüberkülozis, sığırlarda genellikle kronik olarak görülür ve inkubasyon süresi 3-5 hafta arasında değişmektedir. Daha çok akciğer tüberkülozu görülmekte olup, hayvanlarda kuru öksürük, aşırı zayıflama, yorgunluk, ileri dönemlerde solunumda zorluk ve ağrı, mukopurulent bazen de kanlı bir akıntı tarzında kendini göstermektedir. Sonraki dönemlerde submaksiller lenf yumruları şişer. Sindirim sistemi infeksiyonlarında ise, gıda alımında zorluk, karında ağrı, gaitada kan veya mukus görülebilir. Boğalarda epididimitis ve penis infeksiyonlarına, dişilerde de uterus ve meme infeksiyonlarına rastlanmaktadır. Nadiren de deri tüberkülozu görülebilmektedir(6,114,120).

Otopside, eğer infeksiyon solunum sisteminde yerleşmişse üst solunum yollarında nodül ve ülserler, akciğer ve mediastinal lenf yumrularında tuberkel lezyonları bulunur. Torasik lenf yumrularında kazeifiye lezyonlar ve pleurada nodüller görülebilir. Pleurada görülen çok sayıdaki nodül görüntüsünden dolayı "incili tüberküloz" olarak isimlendirilir. Sindirim sisteminde ise daha çok barsak ve mezenteriyal lenf yumrularında lezyonlara rastlanır. Ayrıca hematojen yayılmaya bağlı olarak vücuttaki bütün organ ve dokularda tüberküloz lezyonlarına rastlanabilir(6,114,120).

Teşhis için klinik semptomlar yeterli değildir. Özellikle akciğer tüberkülozu akciğerlere yerleşen diğer bakteriyel, paraziter, mikotik hastalıklarla ve yabancı cisim pnemonileri ile karışabilir. Otopside infeksiyonun yerleştiği organ ve dokularda klasik tuberkeller görülür. Laboratuvar yoklamaları için canlı hayvanlardan idrar, süt, kraşe, uterus akıntıları, deri kazıntıları, sperma, ölü hayvanlardan da lezyonlu doku ve organlardan yararlanılır. Bu amaçla marazi maddelerden hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanarak mikroskopta asidorezistans özellik gösteren etkenler aranır. Ancak bu etkenler görülse bile bunlar tüberküloid etkenler de olabileceğinden

diğer incelemeler de yapılmalıdır. Ayrıca, marazi maddelerde Floresans antikor tekniği ile de etkenler aranabilir. Bu amaçla, preparat auramin-O veya rodamin-B içeren floresans boyalar ile boyanır, daha sonra UV mikroskopunda incelenir(5,35,61). Gutiérrez, avdin-biotin kompleks peroksidaz (ABC-P) metodunun Ziehl-Neelsen boyama metoduna göre daha başarılı olduğunu bildirmiştir(19).

Kültür amacıyla, marazi maddelerden ekim için özel yöntemlerle inokulum hazırlanır. Bu amaçla, organ materyali mekanik olarak ezilir ve FTS ilave edildikten sonra homojenize edilir. Sıvı materyal, 3000 devirde 15-20 dakika santrifüj edilir. Diğer kontaminantları engellemek için marazi maddeler NaOH, oksalik asit, trisodyum fosfat gibi bazı maddelerle prosedürlerine uygun olarak muamele edilirler. Bu amaçla homojenize edilmiş materyal veya sediment, kendi hacminin 4-6 katı kadar asit (örneğin % 3-6 H₂SO₄) ile karıştırılır ve 10-15 dakika bekletilir, sonra tekrar 10-15 dakika santrifüj edilir. Daha sonra Hohn'un yumurta besi yeri, Petraghani veya Löwenstein-Jensen besi yeri gibi gliserinsiz tüberküloz besi yerlerine ekimler, öze veya Pasteur pipeti ile besi yerinin dibinden başlayarak tüm besi yerinin yüzeyini kaplayacak şekilde yapılır. Her test örneği için en az 2-3 besi yeri kullanılmalıdır. Ekim yapılan besi yerleri aerobik olarak 37°C' de maksimum 8-12 hafta inkubasyona bırakılır. Kültürler, haftada bir kez değerlendirilerek şüpheli kolonilerden hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen ile boyanarak incelenir. Üremenin hızı, mikobakterilerin sınıflandırılmalarında önemlidir. Patojen mikobakterilerin bulunduğu gruptaki etkenler 5 günden daha uzun bir sürede üreme gösterirler. Üreme süreleri yanında üreme ısıları, pigment oluşumu, gliserolden asit üretimi, niasin testi ve bazı diğer biyokimyasal testler de identifikasyonda önemlidir. Özellikle pyromusin hidrazide (PMH) ve thiophon-2-carbonik asid hyarazide (TCH) ile üremenin inhibisyonu ve nitrat reduksiyon testi *M. bovis* ile *M. tuberculosis*'in ayırtedilmesinde kullanılır(6,36,65,120,124).

Deneme hayvanı olarak kobaylar kullanılabilir. Bu amaçla marazi maddelerden hazırlanan inokulumdan kobayların inguinal lenf yum ruları yakınına subkutan olarak enjeksiyonlar yapılır ve 6-8 hafta süre ile gözlem altında tutulurlar. Süre sonunda hayvanlar otopsi yapılarak incelenirler. İliakal ve subiliakal lenf yumrularından bakteriyoskopi ve kültür yapılır(6,36,65,124) .

Serolojik olarak, insan tüberkülozunun tanısında komplement fikzasyon testi, hemaglutinasyon testi, aglutinasyon gibi testler kullanılmışsa da bu testler özellikle

sığır tüberkülozunda teşhis için pek uygun değildirler. Ancak son zamanlarda Floresan Antikor tekniği, Radio-İmmuno assay, ELISA, γ -interferon, PCR, kromatografi ve DNA Fingerprinting gibi testler de teşhis için araştırılmaya başlanmıştır(8,14,31,61,68,89,119).

Thoen ve ark., 1978 yılında *M. avium* ile infekte domuzlardaki antikorları göstermek için ELISA denemeleri yapmışlardır(112). Deneysel olarak infekte ettikleri ve kontrol grubundaki sağlıklı domuzların serumları ile yaptıkları çalışmalarda *M. avium* PPD ve *M. avium*'un 4/8 ve de 8 serotiplerinden hazırlanan ölü hücrelerin *M. avium* ile infekte domuzlarda ELISA reaksiyonu için antijen olarak kullanılabilceğini bildirmişleridir. Yine *Thoen ve ark.*(115), ELISA'da antijen olarak *M. bovis*'in KCl ekstraktını, *M. bovis* PPD ve *M. avium* PPD ile karşılaştırmışlar ve *M. avium* serotip 1 izole edilen bir sürüde *M. avium* PPD'nin ELISA'da daha iyi sonuç verdiğini açıklamışlardır. *Cousins* (28), foklarda ELISA denemeleri yapmıştır. Bu amaçla antijen olarak bovine ve avian PPD kullanmış, aynı zamanda intradermal tüberkülin testi ile de karşılaştırmıştır. On foktan yedisi tüberküline reaksiyon gösterirken, yine bu yedi fokun serumlarında da bovin PPD ile ELISA'da 1/400-1/6400 titreleri arasında değişen pozitiflik saptamışlardır. *Ritacco ve ark.* (93), sığırlarda IgG sınıfı antikorları saptamak için antijen olarak *M. bovis* PPD kullanarak ELISA uygulamışlardır. İki ayrı *M. bovis* suşunun kültürlerinden ısı ile muamele etmeden hazırlanan PPD ile, otoklavlama ile hazırlanan PPD'yi karşılaştırmışlar ve ısı ile hazırlanan bovin PPD'nin daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Bakteriyolojik olarak konfirme edilen tüberkülozlu sığırların %90'ı (18/20) bu yolla saptanabilirken, tüberküloz bulunmayan bölgelerdeki sağlıklı sığırlarda yapılan denemelerde negatiflerin %89.8'i (44/49) saptanabilmiştir. Araştırmacılar, bir endemik alanda tüberkülin negatif sığırların serum antikor düzeyleri ile tüberküloz bulunmayan bölgelerdeki sığırların serum antikor düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulamadıklarını bildirmişlerdir. *Auer ve Schleeauf* (12), *M. bovis* ile infekte olmayan sığırların serumlarındaki antimikobakteriyel antikorları saptamak için 6 sığırı deneysel olarak *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS) serovar 2, 8, 9, 14, 18 ve *M. flavescens* ile inokule etmişlerdir. Bu hayvanların serumlarında ve nekropside şüpheli görülerek kültür yapılan ve *M. bovis* izole edilen sığırların serumlarında %39.5 yanlış pozitiflik bulmuşlardır. Ayrıca patolojik bozukluk göstermeyen diğer hayvan gruplarında tüberkülin negatif, tüberkülin pozitif, tüberkülin yapılmayan hayvanlarda ELISA sonuçları sırasıyla %15,4, %73,6 ve %42,4 olarak bulunmuştur. *Plackett ve ark.*(88), ELISA'nın tüberkülin testine alternatif olarak

spesifite ve sensitivitesinin düşük olduğunu, fakat bazı anergik hayvanların tesbitinde yararlı olabileceğini bildirmişlerdir. *Hammam ve ark.(53)*, pasif hemaglutinasyon, ELISA ve indirekt fluoresan antikor testlerini, deneysel olarak infekte edilen kobaylar ve tüberkülin pozitif sığırlarda nonspesifik reaksiyonları saptamak için yaptıkları çalışmalarda kullanmışlardır. Kros reaksiyonların hem serumların avian PPD veya bovin PPD antijeni ile, hem de antijenin anti-avian PPD serum ile absorpsiyonundan sonra azaldığını bildirmişlerdir. Absorbe serum ve antijenin her ikisinin birlikte kullanılması ise pasif HA ve ELISA'nın spesifitesini %100'e yükseltmiştir. Absorbe serum kullanılması ile IFA spesifitesi %95'e çıkmıştır. Absorpsiyon işlemi ELISA, IFA ve PHA testlerinin sensitivitelelerini sırasıyla %14, 27 ve 29'a indirmiştir. *Hanna ve ark.(54)*, tüberkülozdan ari bir bölgeden temin ettikleri 5 buzağıdan herbirine intranasal olarak sahadan izole *M. bovis* suşunu her bir dozda 10^6 /5ml cfu canlı organizma olacak şekilde iki kez inokule etmişlerdir. Buzağılardan 4 tanesinde akut tüberkülozis gelişmiştir. Oluşan humoral yanıtı izlemek için *M.bovis*'in fosfatid ekstraktları ve proteinleri antijen olarak kullanılarak ELISA denemeleri yapılmış, infeksiyondan 14 gün sonra fosfatid antijeni ile antikor düzeyinin anlamlı bir şekilde yükseldiği gösterilmiştir. Bu yükseliş hastalığın ilk belirtilerinin görülme zamanı ile paralellik göstermiştir. Araştırmacılar, bu sonuçlara göre, sığırlarda eğer *M.bovis* infeksiyonu varsa humoral yanıtı saptamada fosfatid antijeninin belki de önemli bir değere sahip olabileceğini savunmuşlardır. Protein antijenle ise, sadece 1 buzağıda humoral yanıt saptayabilmişler, bu nedenle de tüberkülozlu hayvanlarda antikorların saptanması için antijen seçiminin çok önemli olduğunu bildirmişlerdir. *Harboe ve ark.(56)*, *M.bovis*'in üremesi esnasında salgılanan ve oldukça yüksek düzeyde tür spesifik bir protein olan MPB70'i antijen olarak kullanarak *M.bovis* infeksiyonlarında MPB70'e karşı oluşan antikorları bir indikatör olarak saptayabilmek için bir ELISA geliştirmişlerdir. Sığırların *M.bovis* ile deneysel olarak infeksiyonu sırasında antiMPB70 antikorlarının üretilmesi infeksiyondan 18-20 hafta sonra görülmüştür. MPB70 içeren bovine tüberkülin PPD ile yapılan deri testi infekte hayvanlarda antikor üretimi için uyarıcı bir etki göstermiştir. Araştırmacılar, deneysel olarak infekte ettikleri sığırlarda antikor aktivitesiyle geçikmiş tip aşırı duyarlılık deri testi reaksiyonları arasında ters bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Doğal *M.bovis* infeksiyonlarında PPD ile yapılan deri testinin antiMPB70 antikorlarının oluşumu için bir uyarıcı olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca kros reaksiyonlar açısından ELISA ile MPB70'e karşı oluşan antikorların, *M.bovis* BCG antijeni, *M.avium*, *M. paratuberculosis* ve

C.pseudotuberculosis infeksiyonları ile karşılaştırıldığı zaman *M.bovis* infeksiyonları için oldukça yüksek derecede spesifik olduğunu bildirmişlerdir. MPB70 içeren PPD preparasyonlarının deri testlerinde kullanılmasından sonra, bu anti MPB70 testi *M.bovis* infeksiyonları için oldukça spesifiktir. Buna göre yazarlar, doğal *M.bovis* infeksiyonlarının tanısı için bu yöntemin yüksek spesifiteye sahip bir prosedür olacağını bildirmişlerdir. Griffin (48), evcil geyiklerde antijen olarak, PPD ile spesifik protein MPB70'i in vitro teşhis açısından karşılaştırmıştır. *M.bovis* spesifik proteininin kullanılmasını (mycobacterial protein bovis 71), kompleks *M. bovis* PPD 'nin, tüberkülozun in vitro teşhisinde antijen olarak kullanılabilirliği açısından karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, *M.avium* gibi saprofitik mikobakterilerle sensitizasyondan oluşan kros reaksiyonlarla, *M.bovis*'e karşı oluşan reaksiyonları ortaya çıkarmak için lenfosit transformasyon testi ve ELISA'nın bir kombinasyonunu kullanmışlar, lenfosit transformasyon testinde kırmızı geyiklerden alınan mononükleer hücrelerin MPB70'e karşı yanıtı oldukça spesifik bulunmuş, fakat bovin PPD kompleks antijeni kullanılması ile karşılaştırıldığında *M.bovis* infeksiyonlarında bir indikatör olarak sensitivitesi oldukça düşük olarak bildirilmiştir. Antijen olarak MPB70 tek başına kullanıldığında, hasta hayvanların tanısında ELISA'nın spesifitesinin yükseldiği bulunmuştur. Fifts ve ark.(39), ELISA ile 12 purifiye *M.bovis* antijenini ELISA'da serolojik yanıtı saptamak amacıyla denemişlerdir. Bu purifiye antijenler, *M.bovis*'le infekte sığırların, infekte sürülerde kültür negatif olan sığırların ve diğer mikobakterilerle infekte sığırların serumları ile test edilmiştir. Bütün antijenler *M.bovis* ile infekte gruptaki serumlarla kuvvetli reaksiyonlar vermiş ve diğer iki gruptaki serumlarla kros reaksiyonlar göstermiştir. En yüksek spesifite gösteren antijen *M.bovis*'le infekte gruptaki serumların sadece %60'ı ile kuvvetli reaksiyon vermiştir. Ayrıca antijenler, bu gruptaki birçok serumda olduğu gibi diğer iki gruptaki serumlarla da oldukça yüksek kros reaksiyonlar vermişlerdir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, bu antijenlerin birinin tek başına veya kombine edilerek serolojik olarak kullanılmasının kros reaksiyona neden olan epitoplara giderilmedikçe güvenli olamayacağını bildirmişlerdir. Hanna ve ark.(55), deneysel olarak sığır tüberkülozunda antikorları saptamak için ELISA'yı kullanmışlardır. Bu amaçla sahadan izole edilen *M.bovis* suşunu 5 adet buzağıya, bir dozda 10^4 cfu miktarında vererek hastalık oluşturmuşlardır, bunlardan 1 tanesi ölmüştür. Bu hayvanlarda antikor yanıtı PPD ve fosfatid antijenlerin kullanıldığı ELISA ile gösterilmiştir. Tüberkülin testinde kullanılan antijenin inokulasyonu hayvanlarda PPD'ye karşı oluşan antikor seviyesini

yükseltirken infekte olmayan hayvanlarda herhangi bir yükselme görülmemiştir. *Wood ve ark.*(125), sığır tüberkülozunun tanısında yeni bir in vitro hücresel test ile serolojik olarak ELISA'nın uygulamada değerlendirmesini yapmıştır. Tüberküloz enfeksiyonunda serolojik yanıtı saptamada *M.bovis* spesifik antijen MPB70 kullanarak yaptıkları ELISA'nın % 96.4 spesifite ve % 18.1 sensitivitede olduğunu bildirmişlerdir. İnterferon gamma testinde (IFN- γ) bu değerler % 81.8 sensitivite ve % 99.1 spesifite olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar deri içi tüberkülin testinde ise % 68.1 ve % 96.7 olarak bulunmuştur. IFN- γ testinde MPB70'in antijen olarak kullanılması sensitiviteyi yükseltirken, spesifitede herhangi bir yükselmeye neden olmamıştır. Araştırmacılar IFN- γ testinin büyük sığır gruplarında teşhis amacıyla kullanılabilecek pratik bir test olduğunu bildirmişlerdir. *Rothel ve ark.*(100), IFN- γ testinin çabuk, duyarlı ve ucuz bir test olduğunu bildirmişlerdir. *Goodger ve ark.*(46), porsuklarda *M.bovis* enfeksiyonlarının serolojik olarak tanısı amacıyla 25 kDa antijen kullanarak bir indirekt ELISA geliştirmişlerdir. Bu testi %37 sensitivite ve %98 spesifitede bulmuşlar ve canlı porsuklarda saha taramalarında kullanılabileceğini ve bu amaçla daha da geliştirilebileceğini bildirmişlerdir. *Ritacco ve ark.*(94), bakteriyolojik olarak teyit edilen 53 tüberkülozlu sığır ve tüberkülozdan ari bölgelerden temin edilen 101 sağlıklı sığırdan yaptıkları bir çalışmada ELISA'nın anti-*M.bovis* bovine IgG'nin saptanması için sensitivite ve spesifitesini sırasıyla %73.6 ve %94.1 olarak bulmuşlardır. Aynı zamanda 149 sığırdan ELISA ve tüberkülin testi sonuçlarını nekropsi sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Her iki testle, tüberküloz lezyonları bulunan ve kültür sonucu pozitif olan 2 hayvandan 2'si de, lezyon bulunmayıp da izolasyon yapılan 13 hayvanın 2'si, tüberküline reaksiyon veren, fakat antikora sahip olmayan atipik mikobakteriyel enfeksiyonlu 7 hayvandan 2'si, hem lezyon bulunmayan hem de mikobakteriyel izolasyon yapılmayan, fakat tüberküline reaksiyon veren 6'sı, diğerlerinden de 7 hayvan antikora sahip olarak bulunmuşlardır. *Cisse ve ark.* (22), 1990 yılında, insanlarda *M.bovis* BCG suşu A60 antijenini kullanarak yaptıkları ELISA sonuçlarına göre, bu testin tedavinin kontrol edilmesinde kullanılabileceğini savunmuşlardır. *Dowling ve Schleeauf* (34), ELISA testinde 6 değişik antijeni kullanarak infekte sığırlarda spesifik *M.bovis* antikorlarını saptamışlardır. Hiç tüberkülin testi yapılmamış *M.bovis* ile infekte 150 sığırdan 23 tanesinde *M.bovis*'e karşı spesifik antikor yanıtı saptanmıştır. Bu serumlar spesifik serodiagnoz için kullanılacak *M. bovis* antijenlerinin saptanmasında bir anahtar olabilir. Araştırmacılar, *M. bovis* ve 5 farklı *M.avium-intracellulare-scrofloceum* kompleksinin sonike edilmiş hücrelerinin kullanıldığı 6 ayrı

antijen ile spesifik ve nonspesifik yanıtını ölçmüşlerdir. Aynı zamanda tüberkülin testi pozitif sonuç veren 16 tüberkülozlu sığır serumu ve tüberkülin uygulanmamış 9 sığır serumu spesifik ve nonspesifik yanıtı saptamak için kullanılmıştır. Bulguları 3 grup altında toplamışlardır. Birinci gruptakiler, 150 infekte hayvandan 43 tanesi kullanılan mikobakteriyel antijenlerden hiçbirisine karşı herhangi bir antikor yanıtı göstermemiştir. İkinci gruptakiler, daha çok kros reaksiyonlarla ilgili olan yüksek düzeyde antikor seviyesine sahip bulunmuş, son olarak ise, tüberkülin enjeksiyonu, infekte sığırlarda *M.bovis* antijenlerine karşı spesifik antikorlardan çok ortak antikorları yükselmiştir.

Öztürk(85), insanlarda akciğer tüberkülozunun tanısında ELISA'yı kullanmıştır. Bu amaçla, PPD ve sonike edilmiş adsorbe antijeni kullanmıştır. PPD ile testin spesifite ve sensitivitesi %87.3 ve %94.7 olarak bulunurken, bu oranlar sonike edilmiş antijenle %89.9 ve %98.7 olarak saptanmıştır. *Durupınar ve ark.(35)*, 40 pulmoner tüberkülozlu ve 15 sağlıklı kişiden aldıkları serumlarla yaptıkları ELISA sonuçlarına göre, testin tanıda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. *Rota ve Toksöz(98)*, 74 pulmoner tüberkülozlu hasta ve sağlıklı 100 kişinin serumları ile, *M. tuberculosis*'ten hazırlanan Antijen-6 ile uyguladıkları ELISA ile, hastaların %73'ünü, sağlıklı kişilerin %5'ini pozitif olarak bulmuşlardır. *Saniç ve ark.(104)*, Antijen-60 kullanarak, oluşmuş IgG ve IgM antikorlarını saptamışlardır. *Şahin ve ark.(111)*, akciğer tüberkülozunun tanısında mikroskopi, kültür ve ELISA yöntemlerini karşılaştırmışlar, ve aktif akciğer tüberkülozu tanısı için IgG antikor titresinin saptanmasında ELISA'nın uygun bir test olduğunu bildirmişlerdir. *Yücesoy ve ark.(127)*, A-60 antijeni kullanarak aktif tüberkülozun tanısı için ELISA'yı denemişlerdir. *Haznedaroğlu ve ark.(58)*, antijen olarak PPD kullanarak tüberkülozun serolojik tanısında ELISA'nın yararlı olabileceğini bildirmişlerdir. Yine *Haznedaroğlu ve ark.(57)*, antijen olarak BCG kullanılan ELISA'nın da tanıda yararlı olabileceğini bildirmişlerdir. *Ataç ve ark.(9)*, A-60 karşı oluşan spesifik antikorları saptamak için ELISA'yı 4 ayrı grup hastada denemişlerdir. Testin sensitivitesi IgM için %30.6, spesifitesi %93.7, IgG için sensitivitesi %63.2, spesifitesi ise %81.5 olarak bulunmuştur.

Tüberkülozun teşhisi amacıyla kullanılan en önemli yollardan birisi de allerjik testlerdir. Bu amaçla tüberküloz basilinin ekstraktları sulandırılarak deri içi olarak uygulanır ve 72 saat sonra uygulama yerinde, birkaç gün sonra ortadan kalkan ağrı, sıcaklık, kızarıklık ve şişme gibi lokal reaksiyonlar görülür, bu reaksiyon tüberkülin reaksiyonu olarak bilinir. Tüberkülin ilk olarak aşılama çalışmaları yapan *Koch*

tarafından bulunmuş, bu maddenin korunmada olmasa da teşhiste kullanılabileceği saptanmıştır. Kullanılan bu ilk tüberkülin "Old tüberkülin" olarak adlandırılırken günümüzde tüberküloz basilinin saflaştırılmış protein derivatları (PPD Tüberkülin) kullanılmaktadır. Bu proteine duyarlı bir bireyin vücuduna çok fazla miktarda tüberkülin verilirse, sadece deride lokal bir reaksiyon yerine çok şiddetli, generalize ve hatta öldürücü allerjik bir reaksiyon gelişebilir. Bugün Türkiye'de intradermal olarak uygulanan PPD tüberkülin kullanılmaktadır. Bu amaçla 6x12 cm ebatlarında bir bölge, boynun orta 1/3'lük bir kısmında traş edilip dezenfekte edilir ve deri kalınlığı ölçülür. Avian ve mammalian PPD tüberkülin 0.1 ml miktarında deri içi olarak enjekte edilir ve 72 saat sonra deri kalınlığı tekrar ölçülerek değerlendirilir. Pozitif bulunanlar kesime tabi tutulur, şüpheli sonuç verenler 2 ay izole edilerek tekrar PPD testi yapılır. Negatif bulunanlar ise, serbest bırakılır(3). Fakat çapraz reaksiyonlar ve bazı anergi durumlarında (ileri yaş, doğum, hastalığın başlangıç evresinde olma vs.) tüberkülin yanlışı reaksiyon vermektedir. Tüberkülin, *M.bovis*'in kültür filtratlarından hazırlanan kompleks bir maddedir ve yanlışı pozitif reaksiyonlara yol açan kros etkili proteinleri içermektedir.

Neill ve ark.(80), tüberkülin deri testi negatif olup da interferon gama yanıtı gösteren 15 hayvanın lenf nodülleri ve solunum yolu sekresyonlarından *M. bovis* izole etmişlerdir. Bu hayvanlar post mortem olarak incelendiğinde, 7 hayvanda tipik tüberküloz lezyonlarına rastlanmıştır. Ayrıca histopatolojik olarak da tüberküloz tanısı konmuştur. Araştırmacılar, infeksiyonun erken dönemlerinde tüberküline karşı yanıt alınamadığını bildirmişlerdir. *Francis ve ark.*(43), yaptıkları çalışmada tüberkülin testinin sensitivitesini %76, spesifitesini ise %86.6 olarak bildirmişlerdir.

Kontrol amacıyla klasik olarak iki yol ortaya konmuştur. Bunlar *Ostertag* ve *Bang* metotları olarak bilinirler. *Ostertag* metodunda, sadece açık tüberkülozlu hayvanların imha edilmesi öngörülürken, *Bang* metodunda ise yavruların analarından ayrılarak yeni ve sağlıklı bir nesil elde edilmesi, diğer taraftan hastaların da imha edilerek azaltılması önerilmiştir(91). Korunma için infeksiyonun giriş yollarının yok edilmesi ve hijyen şartlarına uyulması gerekmektedir(6,76,124).

On dokuzuncu yüzyılın sonlarında Avrupa'da sığır tüberkülozunun prevalansının yüksek olması, aşılama konusunda araştırmalara yol açmıştır. Doğumda aşılana buzağuların hastalıktan birkaç ay korunduğu, aşılama dolayısıyla oluşan duyarlılaşmanın diagnostik testleri etkilediği ve aşılamanın kontrol açısından bir engel oluşturduğu da savunulmuştur(91).

Bugün insan tipi basilleri taşıyan aşilar üretilmiş ve satışa sunulmuş olmasına karşın daha yaygın olarak *Von Behring*'ın "bovovaccine"i kullanılmıştır. Son yıllarda BCG kapsayan attenüe bovine tip basil aşilar geliştirilmiştir. Sığırlarda deneysel çalışmalarda BCG aşısı başarı ile kullanılmış ve 1924'ten 1930'a kadar insan ve sığırlarda Fransa ile diğer bazı ülkelerde oral BCG aşısı yaygın olarak kullanılmıştır(91). Fransa'da 1930 yılında virulent *M.tuberculosis* suşu ile hazırlanan aşidan, laboratuvardaki bir karışıklık sonucu 251 çocuktan 72'sinin ölmesinden sonra aşılama durdurulmuştur. Aşidaki bu kontaminasyon aşı üretimi için ayrı ünitelerin kurulmasında gelişmelere önyak olmuştur. Norveç ve İsveç'teki BCG'nin subkutan ve perkutan enjeksiyonları üzerindeki kontrollü çalışmalar insan tüberkülozunun kontrolünde kesin olarak etkili olduğunu göstermiştir.

Francis(41), sığırlarda BCG ile yaptığı kontrollü saha çalışmalarında BCG'nin kısa süreli bir korunma sağladığını, bunun da sığır tüberkülozunun kontrolünde önemli bir katkı olmadığını bildirmiştir. Daha sonra yapılan benzer çalışmalarda da BCG'nin koruyucu etkisinin olmadığı Amerika'da, Almanya'da ve İngiltere'de bildirilmiştir (2,8,91). Daha sonra WHO FAO sığırlarda BCG aşısını durdurduğunu açıklamıştır. Afrika, Asya ve Güney Amerika'da birçok gelişmiş ülkede tüberküloz prevalansının yüksek düzeylere ulaşması, testler ve kesim metotları ile kontrolün sağlanamaması üzerine tekrar BCG'ye dönülmesi önerilmiştir. Tüberküloz basilinin tripsinle ekstraksiyonundan elde edilen bir aşının saha çalışmalarında canlı BCG'den daha koruyucu olduğu bildirilmiştir(91). Son yıllarda *M.bovis* BCG ile evcil karnivorlarda da aşılama denemeleri yapılmıştır(17).

Sığır tüberkülozunun etkili kontrolü, periyodik muayeneler, infekte hayvanların ortadan kaldırılması, hastalığın yayılmasının önlenmesi ve hastalıktan korunma yollarının kombinasyonuna bağlı olan hükümet kontrol şemalarının tamamlanması ile mümkündür. Her ülke kendi bölgesel şartlarına göre yöntemler kullanmaktadır; örneğin İngiltere'de, Türkiye'de ve diğer bazı ülkelerde sığırların boyun bölgesinde yapılan karşılaştırmalı intradermal tüberkülin testi kullanılırken, Avustralya ve Yeni Zelanda'da ise kaudal deri kıvrımına uygulanan tüberkülin testi kullanılmaktadır.

Hastalıktan korunmak için, testler ve kesimin birlikte uygulanmasının ideal bir metot olduğu bildirilmiştir. Kolombiya'da, 1909 yılında 1700 hayvan bulunan bir sahada tüberküline reaksiyon veren hayvanların oranı %18.87 iken 1911'de %1.37'ye düşürülmüştür. Amerikan Eradikasyon Bölümü, 1917 yılında bir eradikasyon programı başlatmıştır. Bu dönemde tüberkülozdan ileri gelen büyük ekonomik kayıplar da dikkat

çekmiştir. Sütlerde %10'luk bir kayıp yanında yine direkt bir kayıp olan et kaybı ile birlikte insan sağlığı ve tarımsal konulardaki indirekt kayıplarında dikkate alınması gerektiği bildirilmiştir. Tüberküloz eradikasyon programları yarar-zarar oranı açısından oldukça faydalıdır. *Roberts* (96), bu kontrol şemasının ABD'de yıllık yararının 30-300 milyon dolar arasında olduğunu bildirmiştir.



MATERYAL VE METOD

Serumlar

Test serumları: Çalışmada kullanılan toplam 850 adet sığır serum örneği Devlet işletmelerinden (A,B,C,D) ve 20 adet sığır serumu da EBK Ankara ve Çubuk Mezbahalarından temin edilmiştir. Samsun, Tokat, Adapazarı ve Eskişehir yöresindeki işletmelerde bulunan 1 yaşın üzerindeki sığırlara tüberkülin testi uygulanmadan önce kan örnekleri alınarak serumlar çıkarılmış ve bu serumlar derin dondurucuda saklanmıştır(Tablo-1).

Tablo-1.Çalışmada kullanılan serum sayıları ve orijinleri

| İşletme adı | Serum sayısı |
|---------------|--------------|
| A | 163 |
| B | 261 |
| C | 172 |
| D | 254 |
| Mezbahalar | 20 |
| Toplam | 870 |

Standart serumlar : Kullanılan pozitif (5) ve negatif (4) kontrol serumları Dr.C.O.Thoen'den (Iowa State University, ABD) temin edilmiştir. Ayrıca mezbahalardan kan alınarak, otopsi sonucunda makroskopik olarak tüberkülozlu olduğu saptanan hayvanlara ait serumlar pozitif kontrol (14) ve tüberküloz saptanmayan hayvanlardan alınan kan serumları da negatif kontrol (15) olarak kullanılmıştır.

Purifiye Protein Derivatı (PPD)

Tüberkulin testinde, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen ve protein içerikleri 1 mg/ml olan avian ve mammalian PPD kullanılmıştır.

Konjugat

ELISA'da konjugat olarak tavşanda hazırlanmış ve peroksidazla işaretlenmiş antibovine IgG (H+L) kullanılmıştır (SIGMA).

Substrat

ELISA'da kullanılan substrat, 50µl 2,2 Azinobis (3-ethyl benzthiazoline sulphonic acid, SIGMA) stok solusyonu (21.6mg/ml), 50 µl 8 M H₂O₂ ve 12 ml sitrat buffer (pH 4)' in karıştırılması ile hazırlanmıştır.

Solusyon ve Tampon Sıvılar

Fosfat buffer solusyonu (PBS): Bu solusyon, 8 g NaCl, 1.21 g K₂HPO₄, 0.34 g KH₂PO₄ 1000 ml deiyonize su içinde eritilerek otoklavda sterilize edilmiştir.

PBS+Tween 20: PBS'ye %0.05 oranında Tween 20 katılarak hazırlanmıştır.

Karbonat buffer: Antijenin sulandırılması için pH 9.6 olan karbonat buffer kullanılmıştır. Karbonat buffer, 1 M NaHCO₃ solusyonundan (84 g/L) ve 1 M Na₂CO₃ solusyonundan (106 g/L) karıştırılarak hazırlanmıştır.

Sitrat buffer: Testte, substratın hazırlanmasında, 0.2 M Na₂HPO₄ ve 0.1 M Sitrik asit solusyonlarının, pH 4 olacak şekilde karıştırılması ile elde edilen sitrat buffer kullanılmıştır.

Hydrofluoric acid: Reaksiyonu durdurmak için pH 3.3 olan 0.1 M Hydrofluoric acid solusyonu kullanılmıştır.

Bovine Serum Albumini (BSA): Sığır serum albumini (SERVA), yıkama işleminde kullanılan PBS'e % 0.1 oranında, serum sulandırılmalarında kullanılan PBS'e de % 1 oranında ilave edilerek kullanılmıştır.

ELISA Antijeni

Antijen olarak , Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tüberküloz Laboratuvarından temin edilen *M. bovis AN5* suşundan hazırlanan tüberkülin kullanılmıştır. Bu amaçla, *M.bovis AN5* suşunun katı besi yerinden, sıvı sentetik besi yerine (Dorset Henley-BAI) pasajı yapılarak 15 gün inkube edilmiş ve sıvı besi yerine adapte edilen etken antijen üretimi için daha fazla miktarlardaki besi yerlerine tekrar pasaj yapılmıştır. Ekim yapılan besi yerleri 10 hafta süre ile inkube edilmiş ve sonra otoklavda 100°C'de 3 saat tutularak bakteriler öldürülmüştür. Besi yeri filtre kağıdından geçirilerek sıvı kısım ayrılmış ve trichloroacetic acid ile çöktürülerek tüberküloprotein elde edilmiştir. Çöktürülen protein 3 kez %1'lik trichloroacetic acid ve 1 kez de %10'luk tuzlu su ile yıkanmıştır. Daha sonra, 0.1 N sodyum hidroksit içinde eritilen protein steril bir kapta toplanmış, pH'sı 7.0'ye ayarlanarak, antijenin protein içeriği biüret metodu ile saptanmıştır(4,64,71).

Mikroplate ve Pipetler

Çalışmada Greiner firmasına ait 96 çukurlu ve U tabanlı mikroplate'ler ve sulandırmalar için 12 kanallı otomatik (SOCOREX) pipet kullanılmıştır.

ELISA Okuyucusu

ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi için DYNATECH MR5000 ELISA okuyucusu 405 nm filtre ile kullanılmıştır.

PPD Uygulaması

Bu amaçla sığırlarda, sol boyun bölgesinde olmak üzere el ayası kadar bir yer traş edilerek deri kalınlıkları kompasla ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Daha sonra alkolle dezenfekte edilen bölge kuruduktan sonra üst kısma avian PPD ve alt kısma da mammalian PPD tüberkülinler 0.1 ml miktarında intradermal olarak enjekte edilmiştir. Sonuçlar 72 saat sonra derideki lokal

reaksiyonlar (ağrı, duyarlılık, sıcaklık, şişkinlik) açısından incelenmiş ve deri kalınlıkları kompasla tekrar ölçülerek kaydedilmiştir. Her iki tüberkülin uygulama yerinde veya bunlardan birisinde meydana gelen deri kalınlaşması 3 mm'ye kadar (3 mm hariç)negatif, 3-4 mm (4mm hariç) arası ise şüpheli ve 4 mm'den daha fazla ise pozitif olarak değerlendirilmiştir(3).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bu test, Ritacco ve ark.nın(93) bildirdikleri yöntemle göre yapılmış ve öncelikle serum, antijen ve konjugat titrasyonları yapılarak en uygun sulandırmalar saptanmıştır.

Antijen titrasyonu: M.bovis AN5 suşundan hazırlanan antijen, karbonat buffer içerisinde 1/10 sulandırmadan başlayarak 2 katlı olmak üzere 1/1280 'e kadar sulandırılmıştır. İlk yatay sıraya 1/10 sulandırmadan başlayarak, her sulandırmadan 1 sıraya olmak üzere herbir çukura 50'şer µl antijen konularak 4 °C'de 1 gece inkube edilmiştir. Daha sonra %0.1 sığır serum albümini(BSA) ve %0.05 Tween 20 içeren PBS ile 3 kez yıkanarak kurutulmuştur. İlk dikey sıradaki çukurlar hariç olmak üzere diğer çukurların hepsine %1BSA ve %0.05 Tween 20 içeren PBS'den 50 µl konulmuştur. Hem pozitif, hem de negatif serumlar, PBS ile bir tüpte 1/12,5 oranında sulandırılarak birer plate'te ilk çukurlara 100'er µl ilave edilerek soldan sağa doğru 50 µl aktarılmak suretiyle 1/25600'e kadar 2 katlı olarak sulandırılmıştır. Daha sonra, nemli bir ortamda 37°C'de 1 saat inkube edilerek yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Bütün çukurlara, titresi bilinen konjugattan 50 µl eklenerek yine 37 °C'de 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda tekrar 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Hazırlanan substrattan herbir çukura 100 µl eklenmiş ve oda ısısında 15 dakika karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Bu süre sonunda bütün çukurlara reaksiyonu durdurmak için 0.1 M Hydrofluoric acid solusyonundan 100 µl ilave edilerek 405 nm filtre ile ELISA okuyucusunda optik olarak değerlendirilmiştir(93).

Konjugat titrasyonu: 1/80 oranında sulandırılan antijenden herbir çukura 50 µl konularak +4 °C'de 1 gece bekletilmiş ve 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra plate'ler soldan sağa doğru her bölümde 2 dikey sıra olacak şekilde 6 bölüme ayrılmıştır. Her bölümdeki ilk çukurlara 1 negatif ve 1 pozitif serumdan

100 µl konarak yukarıdan aşağıya doğru 2 katlı sulandırmaları yapılmıştır, 37 °C'de 1 saat bekletilerek yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Konjugat tüplerde 1/1000'den 1/32000'e kadar sulandırılmış ve her sulandırmadan 6 bölümden herbir bölüme olacak şekilde 50 µl konarak 37 °C'de 30 dakika bekletilmiş ve tekrar yıkama yapılmıştır. Hazırlanan substrattan herbir çukura 100 µl konarak oda ısısında ve karanlık bir ortamda 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyon durdurulmuş ve sonuçlar optik okuyucuda değerlendirilmiştir(93).

Negatiflik kriterinin saptanması: Tüberkülin negatif olan hayvanlardan elde edilen serumlarla, Dr.Thoen'den sağlanan negatif serumlar ELISA ile değerlendirilerek negatiflik eşiği saptanmıştır. Bu amaçla negatif ve pozitif serumlar 1/12,5'tan başlayarak 1/1600'e kadar 2 katlı olarak sulandırılmış ve ELISA uygulanmıştır. Ancak 1/200 ve 1/400 titre arasında kesin bir ayırım yapılabilmesi için denemeler tekrarlanarak sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla cut-off değeri, kontrol grubu optik dansite ortalamasına 2Sd (standart sapma) ilave edilerek hesaplanmıştır. Ayrıca ortalamalar arasındaki farkın öneminin kontrolü için student's t testi kullanılmıştır(103).

ELISA'nın uygulanması: Mikroplate'lerin herbir çukuruna 1/80 oranında sulandırılmış 50 µl antijen konarak 4 °C'de 1 gece inkube edildi. Plate'ler % 0.05 Tween 20 ve %0.1 sığır serum albümini(BSA) içeren PBS ile 3 kez yıkanarak herbir göze, % 1 sığır serum albümini(BSA) ve % 0.05 Tween 20 içeren PBS ile 1/400 oranında sulandırılan şüpheli serumlar 50µl olarak eklenmiş ve rutubetli ortamda 37 °C'de 1 saat inkube edilmiştir. Herbir plate'e ayrıca pozitif ve negatif kontrol serumları da konulmuştur. Bu aşamada tekrar 3 kez yıkanan plate'lerin herbir çukuruna 50 µl konjugat eklenip plate'ler 30 dakika 37 °C'de inkube edilmiştir. Sonra plate'ler tekrar 3 kez yıkanarak herbir çukura 100 µl substrat solusyonu ilave edilmiş ve oda ısısında karanlık bir ortamda 15 dakika inkubasyona bırakılmıştır. Enzimatik reaksiyonu durdurmak için 0.1 M Hydrofluoric acid solusyonundan her çukura 100 µl eklenmiş ve otomatik ELISA okuyucusunda 405 nm'de sonuçlar fotometrik olarak değerlendirilmiştir(93).

BULGULAR

PPD Tüberkulin Sonuçları

Denemede kullanılan 850 adet hayvanın boyun bölgesinin sol 1/3 orta kısmına uygulanan intradermal mammalin ve avian tüberkulin sonuçları uygulamadan 72 saat sonra okunmuş ve kaydedilmiştir. Alınan sonuçlar tablo-2'de gösterilmiştir. A işletmesinde 163 ve D işletmesinde 254 hayvana tüberkulin testi uygulanmış ve hiç bir hayvanda avian ve mammalian PPD'ye karşı herhangi bir sonuç alınmamıştır. Buna karşın B işletmesinde tüberkulin testi yapılan 261 hayvandan, mammalian ve avian PPD'ye verdikleri reaksiyonlara göre 1 hayvan tüberküloz pozitif, 1 hayvan da tüberküloz şüpheli olarak bulunmuştur. C işletmesinde ise 172 hayvandan, mammalian ve avian PPD'ye gösterdikleri reaksiyon sonuçlarına göre 3'ü tüberküloz pozitif, 4'ü tüberküloz şüpheli ve 3'ü de paratüberküloz şüpheli olarak saptanmıştır.

Tablo-2. İşletmelere göre tüberkulin uygulanan hayvan sayısı ve test sonuçları

| İşletme | tüberkulin uygulanan hayvan sayısı | tüberküloz pozitif hayvan sayısı | tüberküloz şüpheli hayvan sayısı | paratüberküloz şüpheli hayvan sayısı |
|---------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| A | 163 | 0 | 0 | 0 |
| B | 261 | 1 | 1 | 0 |
| C | 172 | 3 | 4 | 3 |
| D | 254 | 0 | 0 | 0 |
| toplam | 850 | 4 | 5 | 3 |

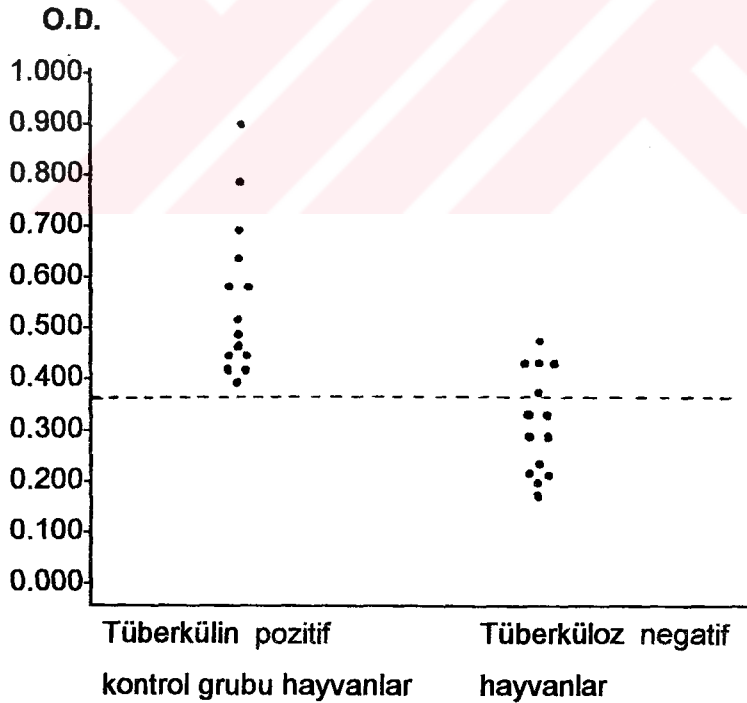
ELISA Sonuçları

Antijenin Protein Miktarı: Hazırlanan ELISA antijeni kullanılmadan önce biüret metodu ile(64) total protein miktarı hesaplanmış ve 47 mg/ml olarak bulunmuştur.

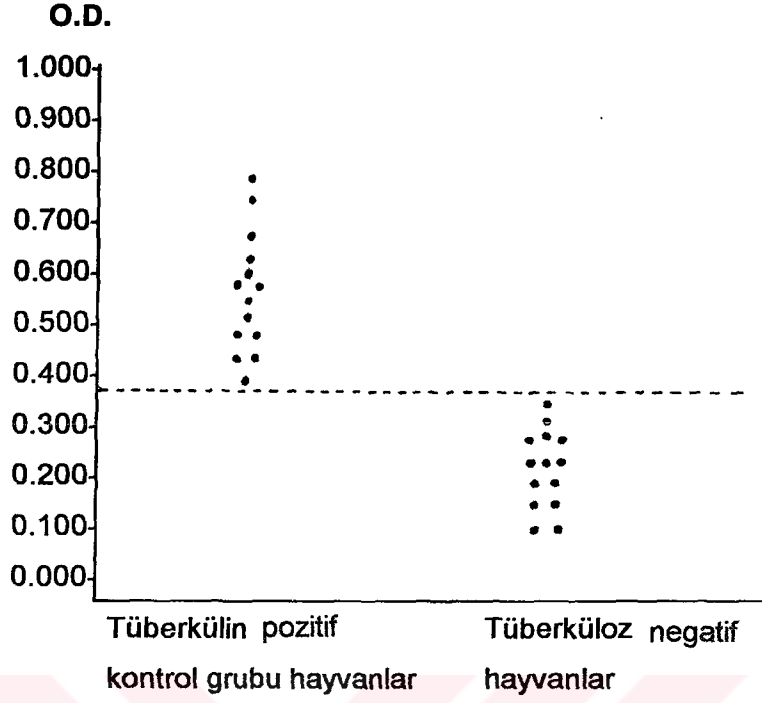
Antijen titrasyonu: Yapılan antijen titrasyonunda antijenin en iyi sonuç verdiği titre 1/80 olarak bulunurken, bu sulandırmadaki protein miktarı 0.58 mg/ml olarak saptanmıştır(Resim1).

Konjugat titrasyonu: 1/80 sulandırmada antijen kullanılarak yapılan ELISA denemelerinde konjugat için en iyi 1/4000 olarak belirlenmiştir(Resim 2)

Negatiflik kriterinin belirlenmesi: Negatiflik kriterinin belirlenmesi için 14 adet pozitif ve 14 adet negatif standart serumun 1/200 ve 1/400 sulandırmaları ile yapılan ELISA'da alınan optik sonuçlar Grafik-1a ve Grafik-1b'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre negatif ve pozitif serumlara ait değerlerin 1/400 sulandırmada net olarak ayrıldığı görülmüş ve çalışmada bu sulandırma tercih edilmiştir. Alınan optik sonuçlarla cut-off değeri hesaplanmıştır. Bu amaçla negatif kontrol grubu serumların ortalamaları hesap edilerek, bu değere 2Sd (Standart sapma) değeri de ilave edilmiş ve cut-off değeri optik dansite (OD) 0.372 olarak saptanmıştır. Çalışma süresince ELISA denemelerinde test edilen serumlar için bu değer kriter olarak alınmıştır(Grafik-1a ve 1b). Pozitif kontrol serumlarının 1/400 sulandırmada OD değerleri 0.385-0.780, negatif kontrol serumlarının ise 0.127-0.365 olarak okunmuştur.



Grafik-1a: 1/200 serum sulandırmada pozitif ve negatif serumların ELISA değerleri



Grafik-1b: 1/400 serum sulandırmasında pozitif ve negatif serumların ELISA değerleri

ELISA sonuçları: ELISA sonucu 870 serumun 51'i (%5.8) pozitif ve 819'u (%94.2) negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo-3). Şüpheli serumla uygulanan ELISA sonuçları resim 3'te gösterilmiştir. ELISA'da pozitif bulunan serum sayısı ile tüberkülin testine göre tüberküloz pozitif, şüpheli ve paratüberküloz şüpheli hayvan sayısı Tablo-4'te gösterilmiştir.

Tablo-3. İşletmelere göre ELISA uygulanan ve pozitif bulunan serum sayıları

| İşletme | A | B | C | D | Mezbahalar | Toplam |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------|--------|
| ELISA uygulanan serum sayısı | 163 | 261 | 172 | 254 | 20 | 870 |
| Pozitif sonuç veren serum sayısı | 5 | 11 | 12 | 9 | 14 | 51 |
| % Oranları | 3,6 | 4,7 | 6,9 | 3,5 | 70,0 | 5,8 |

Tablo-4. İşletmelere göre ELISA ve tüberkülin testi sonuçları

| İşletme | İncelenen serum sayısı | ELISA (+) serum sayısı | Tb (+) hayvan sayısı | Tb (±) hayvan sayısı | Ptb (±) hayvan sayısı |
|---------------|------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| A | 163 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| B | 261 | 11 | 1 | 1 | 0 |
| C | 172 | 12 | 3 | 4 | 3 |
| D | 254 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| toplam | 850 | 37* | 4 | 5 | 3 |

(*): Bu sonuca mezbahalardan sağlanan 14 adet serum dahil değildir.

Intradermal tüberkülin testi sonuçlarına göre tüberküloz pozitif, şüpheli ve paratüberküloz şüpheli sonuçlar ELISA'da alınan değerlerle karşılaştırıldığında, tüberkülin sonuçlarına göre tüberküloz pozitif bulunan toplam 4 hayvanın kan serumlarına ait OD değerleri, saptanan cut-off değerinin üzerinde bulunmuş ve bu 4 serum da ELISA ile pozitif olarak saptanmıştır. Deri testi ile tüberküloz şüpheli olarak değerlendirilen toplam 5 hayvana ait kan serumlarından 3 tanesi OD değerlerine göre

pozitif olarak kabul edilirken, diğ er 2'si negatif olarak değ erlendirilmiştir. Ayrıca tüberköl in testi ile paratüberköl oz şüpheli bulunan toplam 3 adet hayvanın kan serumlarından 1 tanesi OD değ erlerine göre pozitif olarak değ erlendirilirken diğ er 2 tanesi negatif olarak kabul edilmiştir(Tablo-5).

Tablo-5.Tüberköl oz pozitif, şüpheli ve paratüberköl oz şüpheli hayvanların kan serumları ile yapılan ELISA sonuçları

| Hay. no: | PPD Mammalian tüberköl in | | | | PPD Avian tüberköl in | | | | Fark | Karar | ELISA OD |
|----------|---------------------------|-------|-------|--------|-----------------------|-------|-------|--------|------|-------|----------|
| | önce | sonra | reak. | kalın. | önce | sonra | reak. | kalın. | | | |
| B-107 | 5,0 | 8,0 | + | 3,0 | 5,0 | 8,0 | + | 3,0 | 0 | tb± | 0,437 |
| B-277 | 11,5 | 20,5 | + | 9,9 | 13,9 | 16,0 | + | 2,1 | 6,9 | tb | 0,378 |
| C-4 | 5,6 | 10,5 | + | 4,9 | 5,8 | 7,8 | + | 2,0 | 2,9 | tb± | 0,339 |
| C-27 | 6,5 | 11,5 | + | 5,0 | 6,9 | 9,5 | + | 2,6 | 2,4 | tb± | 0,408 |
| C-33 | 5,0 | 9,0 | + | 4,0 | 5,5 | 9,0 | + | 3,5 | 0,5 | tb± | 0,378 |
| C-39 | 6,5 | 12,5 | + | 6,0 | 7,0 | 11,7 | + | 4,7 | 2,3 | tb | 0,417 |
| C-77 | 5,0 | 8,5 | + | 3,5 | 5,0 | 5,5 | + | 0,5 | 3,0 | ptb± | 0,311 |
| C-91 | 4,7 | 10,1 | + | 5,4 | 4,8 | 5,2 | + | 0,4 | 5,0 | tb | 0,448 |
| C-94 | 5,3 | 10,0 | + | 4,7 | 6,3 | 11,5 | + | 5,2 | 0,5 | ptb± | 0,235 |
| C-98 | 6,0 | 11,0 | + | 5,0 | 6,3 | 10,0 | + | 3,7 | 1,3 | tb± | 0,359 |
| C-106 | 5,9 | 13,5 | + | 7,6 | 6,7 | 9,5 | + | 2,8 | 4,8 | tb | 0,421 |
| C-111 | 5,5 | 9,2 | + | 3,7 | 7,0 | 8,0 | + | 2,1 | 1,6 | ptb± | 0,378 |

Önce : Test uygulamadan önceki normal deri kalınlığı (mm).

Sonra : Test uygulandıktan 72 saat sonraki deri kalınlığı (mm).

Reak : Test uygulandıktan sonra oluşan lokal reaksiyonlar

Kalın : Test sonucunda görölen deri kalınlaşması (mm).

Fark : İki reaksiyondaki deri kalınlaşmaları arasındaki fark

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır tüberkülozisi, *M.bovis* tarafından oluşturulan, bütün organ ve dokularda görülen kazeöz ve kazeökalserez tüberkellerle karakterize, kronik ve zoonotik bir enfeksiyondur. Tüm dünyada, özellikle geri kalmış ülkelerde yaygın olarak görülen bu hastalık hem ekonomik kayıplara neden olmakta, hem de insan sağlığını tehdit etmektedir.

İnsanlık tarihi kadar eski bir geçmişi olan tüberkülozis, rutin bakteriyolojik teknikler ve teşhiste kullanılabilecek diğer indirekt tanı yöntemlerindeki büyük ilerlemelere rağmen, insan ve hayvanlarda halen kesin ve çabuk tanı koyulamayan bir hastalık olma özelliğini korumaktadır.

Tüberkülozisin laboratuvar teşhisi için, canlı hayvanlardan alınan süt, idrar, sperma, deri kazıntıları, punksiyon sıvıları ve uterus akıntıları, ölümlerden ise, lezyonlu organlardan alınan marazi maddeler kullanılır. Marazi maddelerden yöntemine uygun olarak hazırlanan preparatlarda, Ziehl-Neelsen boyama metodu ile aside dirençli etkenler aranır. Fakat diğer mikobakteriler ve bir dereceye kadar da nokardialar asitlere direnç gösterdikleri için yapılan preparatlarda aside dirençli etkenler görülmesi sığır tüberkülozu için kesin tanı değildir(6,36,65). Ayrıca marazi maddelerde tüberküloz etkenlerinin gösterilmesi amacıyla, auramin-O veya rodamin-B gibi floresans boyalar kullanılarak yapılan floresans antikor tekniği de kullanılabilir(6,65).

Kültür amacıyla, marazi maddeler homojenize edildikten sonra nötralize edilerek, gliserinli ve gliserinsiz Loewenstein-Jensen ve Stonebrink gibi tüberküloz besi yerlerine ekimler yapılır. Besi yerleri 37 °C'de 8-12 hafta inkube edilir. Bu esnada kontrol edilerek oluşan koloniler mikobakteriler yönünden incelenir(6,36,65).

Deneme hayvanı olarak kullanılan 2 adet sağlıklı kobayın inguinal lenf yumruları yakınına, hazırlanan inokulumdan verilir ve hayvanlar gözetim altına alınır. Kobaylardan biri 3-4 hafta sonra, diğeri de 6-8 hafta sonra öldürülerek otopsi yapılır ve alınan örneklerden boyama ve kültür ile etkenler aranır. Ayrıca injeksiyondan 20 gün sonra kobaylara tüberkülin testi de uygulanabilir(6,36,65).

Hastalığın teşhisi amacıyla, bugün için yaygın olarak kullanılan testlerden birisi, allerjik bir test olan ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu yani intradermal tüberkülin testidir(6,36,65). Bu test, tüberküloza karşı oluşan hücresel duyarlılığı ortaya koymak için yapılmakta ve hücreye bağlı olarak şekillenen aşırı duyarlılık reaksiyonları içerisinde yer almaktadır. Ancak tüberkülin testinde de yanlış pozitiflik

ve negatiflik görülmekte olup, yeterli sensitivite ve spesifiteye sahip değildir(43). Kullanılan tüberkülinin hazırlanması ve saklanmasıdaki, tüberkülin uygulaması sırasında ve sonuçların değerlendirilmesindeki hatalar, hayvanların duyarlılık oluşturan diğer mikobakterilerle ve spesifik reaksiyonlara yol açan mikobakteriler dışındaki diğer bakterilerle teması yanlış pozitiflikle sonuçlanabileceği gibi; ileri yaş, ilerlemiş hastalık tablosu, infeksiyonun erken dönemlerinde tüberkülin yapılması, kullanılan tüberkülinin tüberküloproteini içeriği, otopside gözden kaçacak kadar küçük lezyonların olması, uygulama ve değerlendirmedeki farklar ve bireysel farklılıklar da yanlış reaksiyonlara yol açabilmektedir. Ayrıca, yeni doğum yapmış olan hayvanlarda da bu hatalı değerlendirmelere rastlanabilir(6,18,65). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda aşırı duyarlılık reaksiyonlarını saptamak için PPD tüberkülin yerine allerjen olarak etkenin lizozim ekstraktları, Triton X-100 veya potasyum klorid kullanılarak hazırlanan biyolojik aktif komponentleri de denenmiş ve alternatif olarak kullanılacakları bildirilmiştir(51,52). Bu çalışmada, Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tüberküloz Laboratuvarı'nda hazırlanan mammalian ve avian PPD'ler kullanılarak değişik orijinli toplam 850 adet sığıra intradermal tüberkülin testi uygulanmıştır. Bunlardan 4 tanesi (%0,47) tüberküloz pozitif olarak değerlendirilirken, 5 tanesi (%0,58) tüberküloz şüpheli ve 3 tanesi de (%0,35) paratüberküloz şüpheli olarak kabul edilmiştir.

Serolojik olarak sığır tüberkülozunun rutin tanısı için kullanılan başarılı bir metod bulunmamaktadır. Bugüne kadar komplement fiksasyon ve indirekt-hemaglutinasyon gibi testler denenmişse de yeterli sensitivite ve spesifitede bulunamamışlardır(55). Diğer taraftan immunoenzimatik testlerdeki gelişmeler, nispeten yüksek sensitivite, mikrotekniklerle uygulanabilmeleri ve kısmen ya da tamamen otomasyona uyum sağlamaları gibi avantajları nedeniyle infeksiyon hastalıklarının çoğunun serolojik tanısı için tercih edilmelerini sağlamıştır(34,55,95). Tüberküloz infeksiyonunda, etken izolasyon ve identifikasyonun zor ve zaman alıcı olması, bazen de izolasyonun yapılamaması nedeniyle, araştırmacılar teşhiste yeni bir teknik olarak ELISA'dan yararlanmışlardır (34,39,54,55,88,93,95). Bu amaçla, bu güne kadar farklı yöntemler denenmiştir. Testte antijen olarak bovine PPD(54,55,94), avian PPD(54), fosfatid antijenler(54,55) ısıtılmış ve ısıtılmamış(88,93) kültür filtratları, sonike edilmiş hücreler(34) ve son zamanlarda da bazı tür-spesifik antijenler(48,56) ayrı ayrı kullanılmıştır. Ayrıca, spesifite ve sensitiviteyi yükseltmek için absorbe edilerek doyurulmuş antijenler de denenmiştir(53). Konjugat olarak ise,

tavşan veya keçide hazırlanmış ve peroxidase(46,88,93,94) veya alkaline phosphatase(12) ile işaretlenmiş anti-sığır IgG (H+L)'leri kullanılmıştır. Substrat olarak da alkaline phosphatase için P-nitrophenylphosphate(12), peroxidase için, 2,2 azinobis(40,56,93,94), 3,3',5,5' tetramethylbenzidine(39,46,125) ve 5-aminosalicylic acid(88) kullanılmıştır. Sahada *M.bovis*'ten ileri gelen sığır tüberkülozisinin tanısı amacıyla mikobakteriyel antikorların saptanması için ELISA'yı ilk olarak *Thoen ve ark.*(115) uygulamışlardır. Yaptıkları çalışmada ELISA'nın tüberkülozlu hayvanları % 90, sağlıklı hayvanları da % 89.8 oranında doğru olarak saptadığını bulmuşlar ve bu testin tüberkülin deri testi ile benzer spesifite ve sensitiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. *Ritacco ve ark.*(93), antijen olarak *M.bovis* PPD, ısıtılmadan hazırlanan *M.bovis* PPD ve BCG suşundan hazırladıkları PPD'yi antijen olarak kullanmışlar ve 4°C'de bir gece inkube ederek mikroplate'e kaplamışlar ve normal prosedüre göre otoklavlanarak hazırlanan *M.bovis* PPD'nin 0.55mg/ml yoğunlukta kullanıldığında, kullanılan diğer antijenlere göre daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, konjugat olarak peroksidase ile işaretlenmiş antibovine IgG' leri, substrat olarak da 2,2 azinobis kullanmışlar, sonuçları 405 nm filtre ile değerlendirerek, tüberkülin testine göre daha duyarlı ve özgül olmasa da, ELISA'nın uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle sığır tüberkülozunun tanısında kullanılabileceğini savunmuşlardır. *Auer ve Schleeauf* (12), *M.bovis* ile infekte olmayan sığırlarda mikobakteriyel antikorları araştırmak için, sonike hücreleri antijen olarak kullandıkları bir ELISA yöntemi uygulamışlar, antijeni mikroplate'lere kaplamak için 37°C'de 1saat inkube etmişler, konjugat olarak alkaline phosphatase ile işaretli antibovine IgG'lerini, substrat olarak da p-nitrophenylphosphate'ı kullanmışlar ve sonuçları 405 ve 630 nm filtre ile değerlendirerek % 39.5 oranında bir yanlış pozitiflik bulduklarını açıklamışlardır. Araştırmacılar, infekte olmayan sığırlarda nonspesifik olan immun yanıtın dolayı sığır tüberkülozunun tanısı için ELISA'nın uygulanması sırasında negatif kontrollerin seçilmesinde çok dikkatli olunması gerektiğini bildirmişlerdir. *Plackett ve ark.*(88), anejrik tüberkülozlu sığırları saptamak amacıyla ısıtılmamış *M.bovis* kültür filtratlarını antijen olarak kullanarak ELISA denemeleri yapmışlar ve ELISA'nın tüberkülin testine, bir alternatif olarak düşünülmemeyeceğini, ancak bazı anejrik hayvanları saptayarak yanlış pozitiflik oranını düşürebileceğini savunmuşlardır. Araştırmacılar, antijeni mikroplate'e kaplamak için bir saat 37°C'de veya bir gece 4°C'de inkube etmişler, konjugat olarak peroxidase ile işaretli antibovine IgG, substrat olarak da 5-amino salicylic acid kullanmışlar ve sonuçları da 405 ve 450 nm filtre ile değerlendirmişlerdir.

Hanna ve ark.(54), PPD ve *M.bovis*'in phosphatide antijenlerini 37°C'de bir gece inkube ederek plate'e kaplamışlar peroxidase işaretli konjugat ve orthophenylenediamine'i substrat olarak kullanmışlar, sonuçları 492 nm filtre ile değerlendirerek, yaptıkları ELISA çalışmalarında, phsophatide antijenlerin daha iyi sonuç verdiğini, bu nedenle de tüberkülozlu hayvanlarda antikorların saptanması için antijen seçiminin çok önemli olduğunu bildirmişlerdir. *Fifis ve ark.*(40), *M.bovis*'in kültür filtratını purifiye ederek MPB70'e benzer yapıda bir komponenti ayırmışlar, mikropalte'lere kaplamak için 4°C'de bir gece inkube etmişler, konjugat olarak peroxidase işaretli antibovine IgG, substrat olarak 2,2 azinobis kullanmışlar ve sonuçları 405 nm filtre ile değerlendirerek testte oldukça başarılı sonuç verdiğini bildirmişlerdir. *Hammam ve ark.*(53), absorbe serum kullanarak yaptıkları çalışmalarda, kros reasyonların büyük oranda azaldığını bildirmişlerdir. *Ritacco ve ark.*(94), 4°C'de bir gece inkube ederek kapladıkları PPD antijeni ile yaptıkları çalışmalarda sonuçları 405 nm filtre ile değerlendirmişler ve ELISA'nın, sığır tüberkülozunun tanısında düşük değere sahip bir test olduğunu, ancak infekte sürülerin saptanmasında etkili olduğundan epidemiyolojik çalışmalarda yardımcı olacağını bildirmişlerdir. *Harboe ve ark.*(56), MPB70 antijenini 4°C'de 48 saat inkube ederek kaplamışlar, testte peroxidase işaretli konjugatla birlikte 2,2 azinobis'i substrat olarak kullanmışlar ve sonuçları 405 nm filtre ile değerlendirerek, bu proteinin, *M.bovis* infeksiyonları için oldukça yüksek spesifiteye sahip bir antijen olduğunu, bu yolla yapılan testin yüksek sensitivitesinden dolayı doğal *M.bovis* infeksiyonlarının tanısı için kullanışlı olduğunu bildirmişleridir. *Dowling ve ark.*(34), *M.bovis* ve *M.avium-intracellulare-scrofloceum* serovar 2, 8, 9, 14 ve 18'in ısı ile öldürülmüş ve sonike edilmiş hücrelerini antijen olarak kullanmışlar ve tüberkülin enjeksiyonlarının infekte sığırlarda ortak antijenlere karşı antikor yanıtını artırdığını, ancak *M.bovis* için spesifik antijenlere karşı antikor yanıtını etkilemediğini bildirmişlerdir. *Fifis ve ark.* (39), ELISA ile 12 farklı purifiye *M.bovis* antijenini denemişler ve kros-reaksiyona neden olan epitoplara uzaklaştırılmadıkça bu antijenlerden biri veya bir kaçının kombinasyonu esasına dayanan bir serolojik testin çok fazla tatminkar olamayacağını bildirmişlerdir. *Hanna ve ark.* (55), deri testinde kullanılan antijenlerin hasta hayvanlarda PPD antikor yanıtını artırdığını, ancak infekte olmayan hayvanlarda bir değişiklik olmadığını bulmuşlardır. Bu çalışmada, *Ritacco ve ark.*'nın(93) bildirdiği gibi hazırlanan *M.bovis* PPD kullanılmış, antijen 4°C'de bir gece nemli bir ortamda inkube edilerek mikropalte'lere kaplanmış ve 1/80 olarak bulunan en uygun antijen titresinin 0.58

mg/ml yoğunlukta protein içerdiği biüret metodu ile(64)saptanmıştır. Bu sonuç, araştırmacıların bildirdiği uygun protein yoğunluğuna paralel bulunmuştur. Çalışmada, peroxidase işaretli antibovine IgG(H+L) konjugat olarak, 2,2 azinobis de substrat olarak kullanılmış ve sonuçlar 405 nm filtre ile değerlendirilmiştir. Araştırmada, *M.bovis* PPD antijeni kullanılarak ELISA ile incelenen 870 serum örneğinin 51 adedi (%5.8) ELISA ile pozitif, 819 adedi (%94.2) ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Tüberkülin testinde tüberküloz pozitif olarak bulunan her 4 hayvana ait serum örnekleri de ELISA ile değerlendirildiğinde pozitif olarak bulunmuştur. Buna karşın, tüberküloz şüpheli 5 hayvandan 3 tanesi ELISA ile pozitif olarak saptanırken 2 tanesi de negatif olarak bulunmuştur. Paratüberküloz şüpheli 3 hayvandan 1'i ELISA ile tüberküloz pozitif, 2'si de tüberküloz negatif olarak saptanmıştır. Ayrıca, tüberküline reaksiyon vermeyen 39 hayvan ELISA ile pozitif bulunmuştur. Çalışmada, ELISA ile toplam 51 adet hayvanın kan serumu pozitif bulunurken, tüberkülin testinde toplam sadece 4 hayvanın pozitif bulunması bu araştırmada da kros-reaksiyonları düşündürmektedir. Bu durum, hasta olduğu halde tüberküline reaksiyon vermeyen anejik hayvanların olabileceğini, öte yandan ELISA'da diğer mikobakteriler ve hatta diğer genustaki etkenlerle görülen kros reaksiyonların da olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü, intradermal tüberkülin deri testinde anerji olarak tanımlanan ve ileri yaş, doğum, infeksiyonun henüz başlangıcı veya çok ilerlemiş bir dönemde olması gibi nedenlerden dolayı, hayvanların tüberküline yanıt vermediği görülmektedir. Bu durum tüberkülin deri testinde ELISA'ya göre daha düşük oranda pozitiflik saptanmasına neden olabilir. ELISA'da kullanılan PPD antijeni, bakterinin sentezlediği bir protein olup, yapısı oldukça komplekstir(20,21,44,126). Bu nedenle, diğer bazı mikobakterilerle ve *Nocardia asteroides* ile de kros-reaksiyon veren antijenik epitoplara sahip olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (46,53,88,90,93). *Auer ve Schleeauf* (12), mikobakterilere karşı oluşmuş antikoları saptamak için yaptıkları çalışmada, infekte olmayan sığırlar, *M.bovis* dışında diğer mikobakterilerle infekte sığırlar ve değişik orijinli granuloamlar, squamas hücreli karsinoma, kist hydatid gibi patolojik bozuklukları olan sığırlarda da ELISA'da kros-reaksiyona neden olan mikobakteriyel antikoları saptamışlardır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda *M.bovis* kültür filtratlarında fazla miktarda bulunan 25 kDa ağırlığındaki proteinin(MPB70) tür-spesifik bir protein olduğu(40,46,48,56), fakat daha sonra bu antijenik yapının da *Nocardia asteroides* ile kros-reaksiyon verdiği, hem B, hem de T hücreleri için kros-reaksiyon epitopları taşıdığı bildirilmiştir (90). *Pollock ve ark.*(90), ayrıca 19,000 MA'daki *M.bovis*

antijeninin *M.tuberculosis*'te de bulunduğunu, MPB57 antijeninin ise, *E.coli* ısı-şok proteini ile %43 oranında homolog olduğunu, bunun da kros-reaksiyon epitoplarnın varlığını gösterdiğini bildirmişlerdir. *Fifis ve ark.(39)*, purifiye ettikleri 12 ayrı *M.bovis* antijeninin pozitif hayvanlar yanında, negatif hayvanlarla diğer mikobakterilerle infekte sığırlarda da kros-reaksiyon verdiğini göstermişlerdir. Bu nedenle kros reaksiyonların giderilmesi veya tür spesifik saf bir antijenle çalışılması ve sonuçların otopsi bulguları ve kültürle doğrulanarak spesifite ve sensitiviteilerinin karşılaştırılmaları gerekmektedir. Son zamanlarda hücresele bağışıklığı ortaya çıkaran bir test olan γ -interferon testi uygulamaya sokulmuş ve kros-reaksiyonları büyük oranda azalttığı bildirilmiştir (79,94,98,99,124). *Ritacco ve ark.(95)*, yaptıkları çalışmalarda γ -interferon ve ELISA'yı karşılaştırmışlar ve γ -interferon testinin ELISA'ya göre daha yüksek sensitivite ve spesifitede olduğunu, ancak ELISA'nın da eradikasyon programlarında hasta hayvanları saptamak için kullanılabileceğini savunmuşlardır. *Wood ve ark. (125)*, MPB70 antijeni ile yaptıkları ELISA, γ -interferon testi ve tüberkülin testini karşılaştırmışlar ve γ -interferon testinin pratikte kullanılabilecek bir test olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar, ELISA için MPB70 antijenini mikropate'lerde 4°C'de bir gece inkube ederek kaplamışlar ve sonuçları 450 nm filtre ile değerlendirmişlerdir. *Rothell ve ark.(99,100)* ve *Neill ve ark.(80)*, yaptıkları çalışmalarda γ -interferon testinin, özellikle tüberkülozun erken dönemlerinde de tanı sağlayan oldukça başarılı bir test olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, tüberkülozisin teşhisi için kullanılma olanakları araştırılan ELISA, ortaya çıkan kros reaksiyonlar açısından ele alınarak, farklı antijenlerle, özellikle de tür spesifik proteinlerle yeniden denenmelidir. Tür spesifik antijenlerin saptanması için, *M.bovis*'e spesifik protein bantlarının biyoteknolojik tekniklerle elde edilerek, bu proteinlerin saflaştırılması ve antijen olarak kros reaksiyonlara yol açıp açmadığının kontrol edilmesi uygundur. Bu sorunlar giderildiği takdirde, ELISA, tüberkülin deri testine göre daha kolay uygulanabilirliği, daha kısa sürede sonuç vermesi ve daha ucuz olması nedeni ile de tercih edilebilecek bir test olacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada, PPD tüberkülin testi için dört farklı işletmeden sağlanan 850 adet sığır ve ELISA için bu sığırlara ait kan serumları kullanıldı. Ayrıca ELISA'da kullanılmak üzere Ankara ili çevresindeki mezbahalardan 20 adet kan serumu alınarak incelendi.

Hayvanlardan serum için kan alındıktan sonra, boyun derisine intradermal PPD tüberkülin testi uygulandı ve sonuçlar 72 saat sonra değerlendirildi. ELISA'da, M.bovis AN5 suşundan hazırlanan mammalian PPD antijen olarak kullanıldı. Testte konjugat olarak, tavşanda hazırlanmış peroksidaz işaretli anti-bovine IgG(H+L) ve substrat olarak 2,2 azinobis kullanıldı. Sonuçlar 405 nm filtre ile okundu. PPD tüberkülin testi "Sığır Tüberkülozu Yönetmeliği"ne göre değerlendirilerek tüberküloz pozitif, tüberküloz şüpheli ve paratüberküloz şüpheli hayvanlara saptandı. Buna göre 850 sığırdan dördü tüberküloz pozitif, beşi tüberküloz şüpheli ve üçü paratüberküloz şüpheli olarak değerlendirildi. ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi için cut-off değeri hesaplandı ve bu değer üzerinde OD gösteren serumlar pozitif, bu değer altındaki serumlar negatif kabul edildi. PPD tüberkülin yapılan 850 adet sığıra ait kan serumlarından toplam 37 adedi ve mezbahadan sağlanan 20 adet serumun 14 adedi ELISA ile pozitif olarak saptandı.

Sonuç olarak, ortaya çıkan kros-reaksiyonların giderilmesi ve amaca uygun antijenin saptanması halinde ELISA, tüberkülin deri testine göre tercih edilebilecek bir test olacaktır.

Anahtar kelimeler; sığır tüberkülozu, ELISA, PPD tüberkülin, *Mycobacterium bovis*.

SUMMARY

Use of ELISA in the Diagnosis of Bovine Tuberculosis and Its Comparison with Allergic Test.

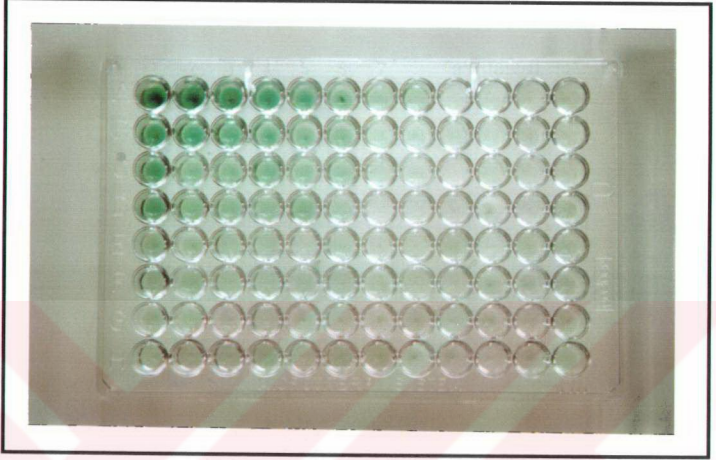
In this study, a total of 850 cattle provided from four different farms and their sera were investigated with intradermal PPD tuberculin test and ELISA, respectively. Also, an additional 20 sera provided from slaughterhouses around Ankara were investigated in ELISA.

After the animals had been bled for sera, intradermal PPD tuberculin applied to the animals' neck skin and the results evaluated after 72 hours. The mammalian PPD prepared from *M.bovis* AN5 strain, was used as antigen in ELISA. Peroxidase labelled rabbit anti-bovine IgG(H+L) was used as the conjugate and 2,2 azinobis as the substrate in ELISA and the results were read at 405 nm filter. PPD tuberculin test results were evaluated according to "Bovine Tuberculosis Statute" and four tuberculosis positive, five tuberculosis doubtful and three paratuberculosis doubtful animals were determined. Cut-off value was calculated for evaluation of ELISA results and sera with higher ODs than cut-off value were regarded as positive where sera with lower ODs as negative. Out of 850 cattle sera that had been subjected to PPD tuberculin test and 20 cattle sera that had been provided from slaughterhouses, 37 and 14 were found to be positive in ELISA, respectively.

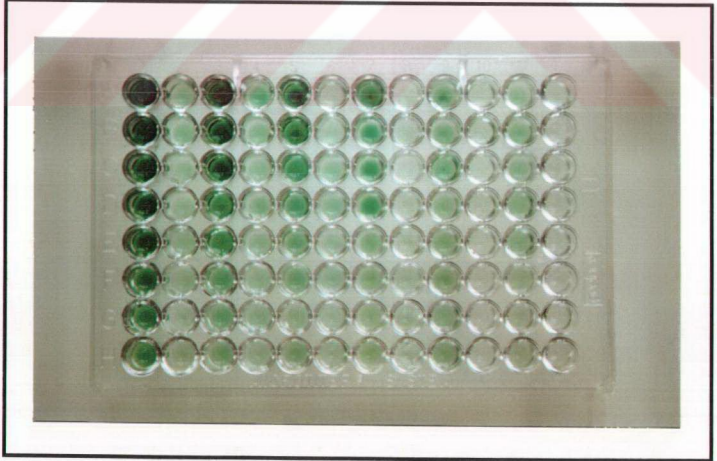
In conclusion, it was determined that if the cross-reactions will be eliminated and suitable antigenic structures for this purpose will be determined, ELISA will eventually become the test of choice instead of tüberkülin skin test.

Key words; bovine tuberculosis, ELISA, PPD tuberculin, *Mycobacterium bovis*.

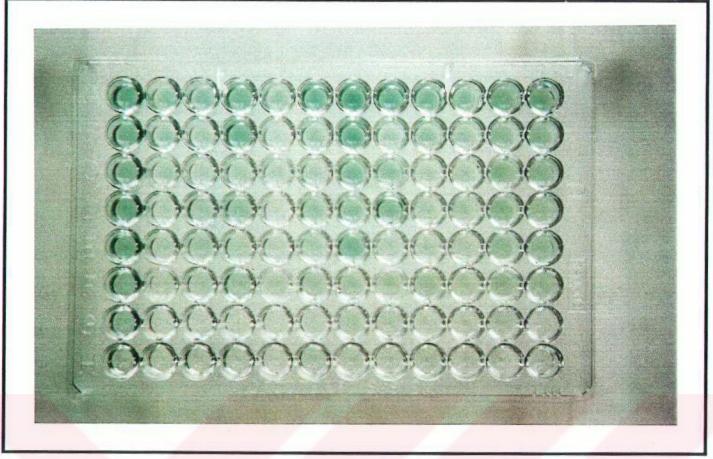
FOTOĞRAFLAR



Resim 1: ELISA için *M.bovis* PPD antijen titrasyonu



Resim 2: ELISA için konjugat titrasyonu



Resim 3:Şüpheli serumlar ile yapılan ELISA sonuçları

KAYNAKLAR

1. Akay, Ö., Aydın, N. Arda, M. ve Hazıroğlu, R.(1984): Bir Mink'te Saptanan Tüberkülozis Olgusu Üzerinde Araştırma. A.Ü.Vet.Fak.Derg., 31:463-470.
2. Aldwell, F.E., Pfeffer, A., DeLisle, G.W., Jowet, G., Heslop, J., Keen, D., Thomson, A. and Buddle, B.M.(1995): Effectiveness of BCG vaccination in protecting possums against bovine tuberculosis. ResVet.Sci., 58:90-95.
3. Anonim. (1978): Sığır Tüberkülozu Yönetmeliği. T.C.Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü, Yönetmelik sayısı 12, Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Deneme Çitli. Md. Basım Servisi, Ankara.
4. Anonim.(1988): PPD Bovin Tüberkülin Protokolü. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Tüberkülin ve Mallein Üretim Laboratuvarı,Ankara.
5. Arda. M.(1986): Türkiye'de Hayvan Tüberkülozis'i.XXII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Türk Mikrobiyol.Cem.Yayn No:8, 24-26 Haziran, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas,s.112-123.
6. Arda,M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N. ve Akay, Ö.(1992): Özel Mikrobiyoloji Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar, Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 741, Kars Veteriner Fakültesi Yayınları No: 1, Ders Kitapları Serisi No: 1, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum.
7. Artun, S.(1955): Beygirde bir tüberküloz olayı. A.Ü.Vet.Fak.Derg., 11:64-74.
8. Arya, S.C.(1993): Characterization of Mycobacterium bovis BCG Vaccines by DNA Fingerprinting by a Standardized Methodology. J.Clin.Microbiol., 31:2834-2839.
9. Ataç, E., Konuksal, C.i Ağaç, E., Özsancak, A.M. ve Aktüre, S.(1992): Serumda antimikobakteriyel Antikorlar ve Tanıdaki Değeri. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.18-19, 8-11 Eylül 1992, Bursa.
10. Attila, C.(1942): Tuberkel bakterilerinin boyanmasında Osol Metodunun Üstünlüğü.Türk Vet.Cem.Derg., 10:22-23.
11. Atun, İ.H.(1965): Kıbrıs'ta sığırlarda tüberkülin testi ile araştırmalar. Türk Vet.Hek.Der.Derg., 35: 383-388.
12. Auer, L.A. and Schleeauf, S.M.(1988): Antibodies to Mycobacteria in Cattle not Infected with Mycobacterium bovis. Vet.Microbiol., 18: 51-61.
13. Aygün, S. ve Heper, B.(1941): Sığırlarda tüberkülozun Allergi Usulile Teşhisi. Vet.Hek.Der.Derg., 11: 3-25.
14. Barry, T., Glennon, M., Smith, T. and Gannon, F.(1993): Detection of Mycobacterium bovis in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. Vet.Rec., 132:66-67.
15. Başaran, M.(1946): Tüberküloz ve Savaşı. Türk Vet. Cem.Derg., 623-44.

16. Berggren, S.A.(1981): Field experiment with BCG vaccine in Malawi. *Bri.Vet.J.*, 137: 88-94.
17. Boireau, E., Andre-Fontaine, G., Blanchard, D., Larrat, M. and Ganiere, J.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.
18. Burrows, W.(1973): *Textbook of Microbiology*, Ed.20, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
19. Cancela, M.M.G. and Marin, J.F.G.(1993): Comparison of Ziehl-Neelsen Staining and Immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine and Caprine Tuberculous Lesions. *J.Comp.Path.*, 109:361-370.
20. Cataldi, A., Romano, M.I. and Bigi, F.(1994): A Western blot characterization of *Mycobacterium bovis* antigens recognized by cattle sera. *Res.Microbiol.*, 145:689-698.
21. Choi, C.S., Frost, A.J. and Francis, J.(1981): Specificity of purified protein derivative extracts from cultures of mycobacteria killed by phenol. *Res.Vet.Sci.*, 31: 284-288.
22. Cisse, M.F., Agius, G., Dindinaud, G., Vaillant, V., Hane, A.A., Castel, O., Grollire, G. and Castets, M.(1990): Evaluation d'un ELISA utilisant l'antigène A60 de *Mycobacterium bovis* BCG: IgG et IgM spécifiques au cours des infections mycobatériennes. *Ann.Biol.Clin.*, 48:369-372.
23. Collins, C.H. and Grange, J.M. (1983): The bovine tubercle bacillus. *J.Appl.Bacteriol.*, 55: 13-229.
24. Collins, C.H., Yates, M.D. and Grange, J.M.(1981): A study of bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from humans in south-east England 1977-1979. *Tubercle*, 62: 113-116.
25. Collins, D.M., Erasmuson, s.K., Stephens, D.M., Yates, G.F. and DeLisle, 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.
26. Collins, F.M.(1982): The immunology of tuberculosis. *Am.Rev.Resp.Dis.*, 125: 42-49.
27. Corner, L.A., Barret, R.H., Lepper, A.W.D., Lewis, V. and Pearson, C.W.(1981): A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory. *Aust.Vet.J.*, 57: 537-542.
28. Cousins, D.V.(1987): ELISA for Detection of Tuberculosis in Seals. *Vet.Rec.*, 121:305.

29. Dannenberg, A.M.(1982): Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Am.Rev.Res.Dis.*, 125:25-29.
30. Davies, P.D., Humphries, M.J. and Byfield, S.P.(1984): Bone and joint tuberculosis. A survey of notifications in England and Wales. *J.Bont and Joint Surgery*, 60: 326-330.
31. Del Portillo, P., Murillo, L.A. and 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.
32. Diker, F.(1989): Tüberküloz'un Dünü ve Bugünü. *Vet.Hek.Der.Derg.*, 59: 32- 36.
33. Doherty, M.L., Monaghan, M.L., Bassett, H.F. and Quinn, P.J.(1995): Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res.Vet.Sci.*, 58:217-221.
34. Dowling, L.A. and Schleeauf, 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.
35. Durupınar, B., Yanbey, S. Leblecioğlu, H. ve Günaydın, M.(1992): Tüberkülozun Serolojik Tanısında Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) Testinin Önemi. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.71, 8-11 Eylül 1992, Bursa.
36. Dye, W.E. and Kubica, G.P.(1970): "Tuberculosis and Other Mycobacterioses" 153-206, Howard L.Bodily et all.(Editors), *Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic İnfections*, Ed.5, American Public Health Association, Inc., New York.
37. Ertürk, Ö.(1948): Tüberküloz ve teşhis metotları. *Türk Vet.Hek.Der.Derg.*, 22:18-22.
38. Ertürk, Ö. ve Finci, E.(1966): Çeşitli *Mycobacteri*'lerin identifikasyonu üzerinde araştırmalar. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 13: 239-252.
39. Fifis, T., Costopoulos, C., Corner, L.A. and Wood, P.R.(1992): Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet.Microbiol.*, 30:343-354.
40. Fifis, T., Plackett, P., Corner, L.A. and Wood, P.R.(1989): Purification of a Major *Mycobacterium bovis* Antigen for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis. *Scand.J.Immunol.*, 29:91-101.
41. Francis, J.(1958): *Tuberculosis in Animals and Man. A study in comparative pathology.* Cassell, London.
42. Francis, J.(1972): Route of infection in tuberculosis. *Aust.Vet.J.*, 48:578.

43. Francis, J., Seiler, R.J., Wilkie, I.W., O'Boyle, D., Lumsden, M.J. and Frost, A.J.(1978): Vet.Rec., 103:420. In: Cousins, D.V.(1987): ELISA for detection oftuberculosis in seals. Vet.Rec., 121:305.
44. Gilot, P. and Cocito, C.(1993): Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle. FEMS Microbiol. Letters, 110:307-312.
45. Golem, S.B.(1941): Memleketimizde sığır Tuberkülozunun insan için olan tehlikesi. Vet.Hek.Der.Derg.,11: 28-38.
46. Goodger, J., Nolan, A., Russell, W.P., Dalley, D.J., Thoms, C.J., Stuart, F.A., Croston, P. and Newell, D.G.(1994): Serodiagnosis of Mycobacterium bovis infection in badgers: development of an indirect ELISA using a 25 kDa antigen. Vet.Rec., 135:82-85.
47. Goren, M.B., Brokland, O. and Schaefer, W.B.(1974): Lipids of putative relevance to virulence in Mycobacterium tuberculosis: correlation of virulence with elaboration of sulphatides and strongly acidic lipids. Infect.Immun., 9: 142-149.
48. Griffin, J.F.T., Nagai, S. and Buchan, G.S.(1991): Tuberculosis in domesticated red deer: comparison of purified protein derivative and the specific protein MPB70 for in vitro diagnosis. Res.Vet.Sci., 50:279-285.
49. Griffin, J.M.(1993): The Role of Bought-in Cattle in Herd Breakdowns due to Tuberculosis in part of Country Cavan during 1989. Irish Vet.J., 46:143-148.
50. Habib, N.I. and Warring, F.C.(1966): A fatal case of infection due to Mycobacterium bovis . Am.Rev.Res.Dis., 93: 804-810.
51. Hall, M.R. and 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.
52. Hall, M.R. and 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.
53. Hammam, H., Refai, M., Bisping, W. and Kirpal, G.(1989): Studies on the Efficiency of Absorbed Bovine PPD in Tuberculin and Serological Tests. J.Vet.Med.B, 36:175-179.
54. Hanna, J., Neill, S.D. and O'brain, J.J.(1989): Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. Res.Vet.Sci., 47:43-47.
55. Hanna, J., Neill, S.D. and O'brain, J.J.(1992): ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. Vet.Microbiol., 31:243-249.

56. Harboe, M., Wiker, H.G., Duncan, J.R., Garcia, M.M., Dukes, T.W., Brooks, B.W., Turcotte, C. and Nagai, S.(1990): Protein G-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Anti-MPB70 Antibodies in Bovine Tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.*, 28:913-921.
57. Haznedaroğlu, T., Albay, A., Gün, H., Başustaoğlu, A.C. ve Kısa, Ö.(1992): Tüberküloz Serolojisinde BCG Kullanılarak ELISA Yönteminin Uygulanması. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.18, 8-11 Eylül 1992, Bursa.
58. Haznedaroğlu, T., Gün, H., Başustaoğlu, A. ve Albay, A.(1992): Akciğer Tüberkülozlu Hasta Serumlarında PPD'ye Karşı IgG Antikorlarının ELISA Yöntemi ile Saptanması. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.17-18, 8-11 Eylül 1992, Bursa.
59. Higgins, D.A.(1981): Markers for T and B lymphocytes and their application to animals. *Vet.Bull.* 51: 925-963.
60. İsmail, R.(1921): Tederrünle Mücadele. *Baytari Mecmua*, 7:129-142.
61. Jamagin, L.J., Brennan, P.J. and Harris, S.K.(1983): Rapid identification of *Mycobacterium bovis* by a thin-layer chromatographic technique. *Am.J.Vet.Res.*, 44: 1920-1922.
62. Jenkins, P.A.(1981): Lipid analysis for the identification of mycobacteria: an appraisal. *Rev.Infec.Dis.*, 3:862-866. In: Pritchard, D.G.(1988): A Century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J.Com.Pathol.*, 99:357-399.
63. Jubb, K.V.F. and Kennedy, P.C.(1970): Tuberculosis. In *Pathology of Domestic Animals*. Vol.1, 2nd Edit., Academic Press, New York and London, pp.233-248.
64. Kaneko, J.J. (1980): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 3rd Edit., Academic Press, Inc. Orlando, Florida, USA. 97-119.
65. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C.Jr.(1992): *Diagnostic Microbiology*, Ed.4, J.B.Lippicott Company, Philadelphia.
66. Lehmann, K.B. and Neumann, R.(1896): *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speciellen Bakteriologischen Diagnostik*. J.F. Lehmann, Munich. In: Pritchard, D.G.(1988): A Century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J.Com.Pathol.*, 99:357-399.
67. Lepper, A.W.D. and Pearson, C.W.(1973): The route of infection in tuberculosis of beef cattle. *Aust. Vet.J.*, 49:266-267.
68. Liebana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J.C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M. and Dominguez, L.(1995): Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Vet.Bull.*, 65: 650.

69. Lurie, M.B.(1942): Studies on mechanism of immunity in tuberculosis: fate of tubercle bacilli indested by mononuclear phagocytes derived from normal and immunized animals. *J.Exp.Med.*, 75: 247-267.
70. Lurie, M.B., Heppleston, A.G., Abramson, S. and Swartz, I.B.(1950): Evaluation of method of quantitative airborne infection and its use in study of pathogenesis of tuberculosis. *Am.Rev.Tub.*, 61: 765-797.
71. Magnusson, M., Kim, H.K. and Bentzon, M.W. (1963): Tuberculin Production. *Acta Pat.Microbiol. Scan.*, 59: 357-368.
72. Marks, J.(1976): A system for examination of tubercle bacilli and other mycobacteria. *Tubercle*, 57: 207-225.
73. McFadyean, J.(1888): Congress for study of tuberculosis in man and animals. *J.Comp.Pathol.Therap.*, 1:262-275. In:Pritchard, D.G.(1988):A Century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J.Com.Pathol.*, 99:357-399.
74. McIlroy, S.G., Neill, S.D. and McCracken, R.M.(1986): Pulmonary lesions and Mycobacterium bovis excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet.Rec.*,118: 718-721.
75. McNicol, M.(1983): Trends in epidemiology of tuberculosis-a physician's view. *J.Clin.Pathol.*, 36: 1087-1090.
76. Merchant, I.A. and Packer, R.A.(1961): *Veterinary Bacteriology and Virology*.Ed.6, Bailliere Tindall and Cox, London.
77. Minnikin, D.R.(1982): Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In *The Biology of the Mycobacteria*. Vol.1, C. Ratletge and J.L. Stanford, Eds., Academic Press, London. pp.95-184.In:Pritchard, D.G.(1988):A Century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J.Com.Pathol.*,99:357-399.
78. Mullenax, C.H., Allison, M.J. and Songer, J.R.(1964): Transport of aerosolized micro-organisms from the rumen to the respiratory system during eructation. *Am.J.Vet.Res.*, 25: 1583-1593.
79. Muscoplat, C.C., Johnson. D.W., Pomeroy, K.A., Olson, J.M., Larson, V.L., Stevens, J.B. and Sorensen, D.K.(1969): Lymphocyte subpopulations and immunodeficiency in calves with acute lymphocyte leukaemia. *Am.J.Vet.Res.*, 35: 1571-1573.
80. Neill, S.D., Hanna, C.J., Mackie, D.P., Pollock, J.McA., Clements, A., Walton, E. and Bryson, D.G.(1994): Detection of Mycobacterium bovis infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet.Rec.*, 135:134-135.
81. Onuk, S.(1947): Sığır tuberkulozu ile savaşta metod meselesi ve tüberkulin aksaklıkları. *Vet.Hek.Der.Derg.*, 16:10-24.

82. Oral, M.(1957): Memleketimizde et muayeneleri yönünden önemli hastalıkların yayılış durumu. *Türk Vet.Hek.Der.Derg.*, 27: 3432-3438.
83. Özcebe, İ.(1939): Tablet Tüberkülin. *Türk Vet.Bir.Derg.*, 1,2:43-45.
84. Özgencil, B.(1972): *Mycobacterium tuberculosis*'le enfekte edilmiş danalarda avian ve mammalian PPD tüberkülinlerin lokal reaksiyonları üzerinde karşılaştırmalı araştırmalar. *Türk Vet.Hek.Der.Derg.*, 42: 9-17.
85. Öztürk, R.(1993): Mikobakterilerin Sonike Edilmiş Adsorbe Antijeni ve Purifiye Protein Derivesi Kullanılarak Yapılan ELISA İle Akciğer Tüberkülozunun Serolojik Tanısı. *Türk.Mikrobiyol.Cem.Derg.*, 23: 84-90.
86. Paterson, A.B.(1959): Tuberculosis: Bacteriology. In *Infectious Diseases of Animals Diseases due to Bacteria. Vol.2. A.W. Stebleforth and I.A. Galloway, Eds., Butterworths Scientific Publications, London, pp. 671-678.*
87. Pepys, J., Augustin, R. and Paterson, A.B.(1959): Common Antigenic Components of *Mycobacterial* Extracts. *The J.Brit. Tuber.Ass.*, XL:163-172.
88. Plackett, P., Ripper, J., Corner, L.A., Small, K., de Witte, K., Melville, L., Hides, S. and Wood, P.R.(1989): An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Aust.Vet.J.*, 66:15-19.
89. Plikaytis, B.B., Eisenach, K.D., Crawford, J.T. and Shinnick, T.M.(1991): Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction assay. *Molecular and Cellular Probes*, 5:215-219.
90. Pollock, J.M., Douglas, A.J., Mackie, D.P. and Neill, S.D.(1994): Identification of bovine T-cell epitopes for three *Mycobacterium bovis* antigens: MPB70, 19,000 MW and MPB57. *Immunology*, 82:9-15.
91. Pritchard, D.G.(1988): A century of Bovine Tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J.Comp.Pathol.*, 99:357-399.
92. Pritchard, D.G., Stuart, F.A., Wilesmith, J.W., Cheesman, C.I., Brewer, J.L., Bode, R. and Sayers, P.E.(1986): Tuberculosis in East Sussex.III. Comparasion of post-mortem and clinical methods for diagnosis of tuberculosis in badgers. *J.Hyg.*,97: 27-36.
93. Ritacco, V., De Kantor, I.N., Barrera, L., Nader, A., Bernardelli, A., Torrea, G., Errico, F. and Fliess, E.(1987): Assessment of the Sensitivity and Specificity of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of *Mycobacterial* Antibodies in Bovine Tuberculosis. *J.Vet.Med.B*, 34:119-125.
94. Ritacco, V., Lopez, B., Barrera, L., Nader, A., Fliess, E. and De Kantor, I.N.(1990): Further Evaluation of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis. *J.Vet.Med.B*, 37:19-27.

95. Ritacco, V., Lopez, B., De Kantor, I.N., Barrera, L., Errico, F. and Nader, A.(1991): Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res.Vet.Sci.*, 50:365-367.
96. Roberts, T.(1986): A retrospective assesment of human health protection benefits from removal of tuberculous beef. *J.Food Protect.*, 49: 293-298.
97. Rota,S.(1992): Tüberküloz Serolojisi. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.?-?, 8-11 Eylül 1992, Bursa.
98. Rota, S. ve Toksöz, D.(1992): Pulmoner Tüberkülozun Antijen-6 Kullanılarak Enzim-İmmun Assay İle Serolojik Tanısı. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.72, 8-11 Eylül 1992, Bursa.
99. Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C. and 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: 34-137.
100. Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C. and 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.
- 101.Rothstein, E.(1970): The twenty-ninth Veterans Administration Armed Forces Pulmonary Disease Research Conference, *Am.Rev.Res.Dis.*, 101: 788.
- 102.Runyon, E.H.(1981): Mycobacteria: an overview. *Rev.Infec.Dis.*, 3:819-821. In:Pritchard, D.G.(1988):A century of Bovine Tuberculosis 1888-1988:Conquest and Controversy.*J.Comp.Pathol.*, 99:357-399.
- 103.Saçılık, S.C.(1991): Aktif akciğer tüberkülozu tanısında ELISA'nın Önemi. *İnfek.Derg.*, 5: 27-29.
- 104.Saniç, A., Baysal, B. ve Özerol, H.İ.(1992): ELISA ile Tuberculosis'in Antijen 60 (A60)'a Karşı Oluşmuş IgG ve IgM Antikorlarının Tayini ve Tüberküloz Teşhisindeki değeri. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.16, 8-11 Eylül 1992, Bursa.
- 105.Schaefer, W.B.(1965): Serological identification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Am.Rev.Res.Dis.*, 92: 85-93.
- 106.Sedat, R.(1930): Verem Aşısı. *Baytari Mecmua*, 7: 178-187.
- 107.Snider, T.G., Pierce, K.R. and Adams, G.(1982): Response of neonatally thymectomized Holstein calves to bacille Calmette Guerin. *Am.J.Vet.Res.*, 43: 1363-1366.
- 108.Stamp, J.T.(1959): Epidemiology and Pathology. In *Infectious Diseases of Animals Disease due to Bacteria*. Vol.2. A.W. Stableforth and I.A. Galloway, Eds., Butterworth, London, pp.687-702.

- 109.Stanford, J.L. and Grange, J.M.(1974): The meaning and structure of species as applied to mycobacteria. *Tubercle*, 55: 143-152.
- 110.Stites, D.P., Stobo, J.D. and Wells, J.V.(1987): *Basic and Clinical Immunology*. 6th Edit., Appleton and Lange, California, USA.
- 111.Şahin, N., Kılıç, H., Özcan, M. ve Dalkılıç, A.E.(1992): Akciğer Tüberkülozu Tanısında Mikroskopi, Kültür ve ELISA Yöntemlerinin Karşılaştırılması. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.15, 8-11 Eylül 1992, Bursa.
- 112.Thoen, C.O., Armbrust, A.L. and Hopkins, M.P.(1978): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibodies in Swine Infected with *Mycobacterium avium*. *Am.J.Vet.Res.*, 40:1096-1099.
- 113.Thoen, C.O. and Himes, E.M.(1986): Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* Infection. *Prog.Vet.Microbiol.Immun.*, 2:198-214.
- 114.Thoen, C.O., Karlson, A.G. and Himes, E.M. (1981): Mycobacterial Infections in Animals. *Rev. Infect.Dis.*, 3: 960-971.
- 115.Thoen, C.O., Petersburg, T.A., Stumpff, C.D., Hall, M.R. and Angus, R.D.(1983): Swine Tuberculosis: Application of a Modified ELISA for the Detection of Mycobacterial Antibodies in Sera. Proceedings of the 87th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, Las Vegas, Nevada.
- 116.Thorns, C.J. and Morris, J.A.(1983): The immune spectrum of *Mycobacterium bovis* infections in some mammalian species: a review. *Vet. Bull.*, 53: 543-550.
- 117.Uçar, N. (1960): İnsan ve sığır tüberkülozuna karşı antibakteriel chemoprophylaxi ve izoniazid ile yapılan deneyler. *Türk Vet.Hek.Der.Derg.*, 30: 624-630.
- 118.Walley, T.(1888): Veterinary sanitation. *J.Comp.Path.Therap.*, 1:25-32. In: Pritchard, D.G.(1988):A Century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J.Com.Pathol.*, 99:357-399.
- 119.Wards. B.J., Collins, D.M. and Lisle, G.W.De.(1995): Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet.Bull.*, 65: 650.
- 120.Wayne, L.G.(1984): *The Mycobacteria. A sourcebook. Part B*.Ed.Kubica, G.P.Marcell Dekker,Inc.New York and Basel.
- 121.Wayne, L.G. and Kubica, G.P.(1986): Section16.Mycobacteria.Peter H.A.Sneath (Ed.),Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Vol.2, p,1436-1457, Williams and Wilkins. Baltimore.
- 122.Wells, W.F., Ratcliffe, H.L. and Crumb, C.(1948): On the mechanics of droplet nuclei infection. II.Qantitative experimental air-borne tuberculosis in rabbits.*Am.J.Hyg.*,47: 11-28.

123. Wilkins, E.G.L., Griffiths, R.J. and Roberts, C.(1986): Bovine tuberculosis of the skin. *J.Infect.*, 12: 280-281.
124. Wolinsky, E. (1990): "Mycobacteria" 647-664, Bernard D. Davis et all. (Editors), *Microbiology Ed.4*, J.B.Lippicott Company, Philadelphia.
125. Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Ripper, J.L., Fifis, T., McCormick, B.S., Francis, B., Melville, L., Small, K., DeWitte, K., Tolson, J., Ryan, T.J., de Lisle, G.W., Cox, J.C. and Jones, S.L.(1992): A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet.Microbiol.*, 31: 71-79.
126. Young, D.B., Ivanyi, J., Cox, J.H. and Lamb, J.R.(1987): The 65kDa antigen of mycobacteria-a common bacterial protein? *Immunol.Today.*, 8:215-218.
127. Yücesoy, M., Yüce, A., Hashempoor, R., Özbakkaloğlu, B. ve Yuluğ, N.(1992): Mycobacteriyel A-60 Antijeni Kullanılarak Aktif Tüberküloz Tanısında Enzim İmmun Assay'in Yeri. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, s.17-18, 8-11 Eylül 1992, Bursa.



TEŞEKKÜR

Doktora tez çalıőmamın yürütülmesinde yardım ve yakın ilgilerini gördüğüm başta doktora yöneticim değerli hocam olmak üzere, A.. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli oğretim üyelerine, tüm çalışma arkadaőlarıma, çalıőmalarıma olan katkılarından dolayı Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tüberküloz Laboratuvarı Bölüm őefi Sayın Uzman Veteriner Hekim Bülent Vural'a, çalışmada kullandığım serumların sağlanmasında yardımcı olan Tarım İőletmeleri Genel Müdürlüğü'ne ve bu projeye maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.



ÖZGEÇMİŞ

20.03.1967 tarihinde İçel-Mut'ta doğdum. İlk ve orta öğrenimimi burada tamamladıktan sonra lise öğrenimimi Çumra Ziraat Meslek Lisesi'nde yaptım. 1985 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdim ve 1990 yılında mezun oldum. Aynı yıl içinde Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu doktora sınavını kazanarak doktora başladım. 1992 yılında Araştırma Görevlisi sınavını kazanarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım ve halen aynı görevi sürdürmekteyim.

