

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIĞIRLARDA TRICHOPHYTOSIS'İN TEŞHİSİNDE
ELISA'NIN KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Hülya KAPLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Oktay KESKİN

ŞANLIURFA

2019

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIĞIRLARDA TRICHOPHYTOSIS'İN TEŞHİSİNDE
ELISA'NIN KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Hülya KAPLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Oktay KESKİN

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17055 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hülya KAPLAN'ın hazırladığı "Sığırlarda Trichophytosis'in Teşhisinde ELISA'nın Kullanılabilirliğinin Araştırılması" başlıklı çalışması **28/06/2019** tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.



BAŞKAN
Prof. Dr. Oktay KESKİN
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÜYE
Doç. Dr. Neval Berrin ARSERİM
Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



ÜYE
Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **18.07/2019** tarih ve **2019/12/16**..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın en başından beri her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Oktay KESKİN'e,

Tez çalışmamın uygulamasında, katkı ve önerilerde bulunan Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK'e,

Tez çalışmamın izolasyon ve identifikasyon uygulamalarında, katkı ve önerilerde bulunan Prof. Dr. Osman Yaşar TEL'e

Tez çalışmalarımın uygulamalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE ve doktora öğrencisi Veteriner Hekim Songül ÖTKÜN'e,

17055 numaralı proje desteği için Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığı'na,

Bilgi birikim ve deneyimlerini benimle paylaşan saha çalışmalarında yardım ve desteğini esirgemeyen Dr. Yaser VEZİR'e,

Her başım sıkıştığında yardımına koşan ve her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan Dollvet A.Ş. Sorumlu Yöneticisi Dr. Hüseyin ZENGİN ve Dollvet A.Ş. Kalite Güvence Müdürü Dr. Nilay ÜNAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Veteriner Hekim Hülya KAPLAN

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
KISALTMA VE SİMGELER DİZİNİ	v
1. Simgeler	v
2. Kısaltmalar	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Dermatofitler	2
1.2.1. Trichophyton Cinsi	3
2. GEREÇ VE YÖNTEM	9
2.1. Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	9
2.2. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	12
3. BULGULAR	17
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	17
3.1.1. Mikroskopik İnceleme	18
3.1.2. Makroskopik İnceleme.....	19
3.2. ELISA Bulguları.....	21
4. TARTIŞMA	29
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
6. KAYNAKLAR	33
7. EKLER	37
7.1 Etik Kurul.....	37
7.2 Orijinallik Raporu	39
7.3 Orijinallik Raporu ve Beyan Belgesi	43
7.4 Tez Veri Giriş Formu	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Resim 3.1. İşletmelerde Klinik Olarak Trichophytosis Teşhisi Konulan Hayvanlar

Resim 3.2. Mikroskopta *T. verrucosum* Etkeni Mikrokonidilar ve Makrokonidialar

Resim 3.3. TA1 Ekim Öncesi Besiyeri ve Ekim Sonrası Üreme

Resim 3.4. TA3 Ekim Öncesi Besiyeri ve Ekim Sonrası Üreme

Resim 3.5. BCP Ekim Öncesi Besiyeri ve Ekim Sonrası Üreme

Resim 3.6. Üre agar Ekim Öncesi Besiyeri ve Ekim Sonrası Üreme

Resim 3.7. *T. verrucosum* Kolonilerinin SDA Besiyerinde Görünümü

Grafik 3.1. A İşletmesi Serum Sonuçlarının OD dağılımları

Grafik 3.2. B İşletmesi Serum Sonuçlarının OD dağılımları

Grafik 3.3. C İşletmesi Serum Sonuçlarının OD dağılımları

Grafik 3.4. D İşletmesi Serum Sonuçlarının OD dağılımları

Grafik 3.5. ELISA Sonuçlarının İşletmeler Arası Dağılımı

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Dermatofitlerin Morfolojik Özellikleri

Tablo 2.1. İşletmelerden Alınan Numune Dağılımları

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Serum Sayıları ve Orijinleri

Tablo 3.2. Negatif Serumların ELISA Sonuçları

Tablo 3.3. A İşletmesi ELISA Sonuçları

Tablo 3.4. B İşletmesi ELISA Sonuçları

Tablo 3.5. C İşletmesi ELISA Sonuçları

Tablo 3.6. D İşletmesi ELISA Sonuçları

Tablo 3.7. ELISA Sonuçlarının İşletmelere Göre dağılımı



KISALTMA VE SİMGELER DİZİNİ

1. Simgeler

ml: Mililitre

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

2. Kısaltmalar

BCP: Brom Cresol Purple Agar

CFU: Koloni Oluşturan Birim

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

OD: Optik Dansite

OPD: Ortho-phenylenediamine

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PP: Percent Positivity

SDA: Saboraud Dextrose Agar

TA1: Trichophyton Agar 1

TA3: Trichophyton Agar 3

ÖZET

SIĞIRLARDA TRICHOPHYTOSIS'İN TEŞHİSİNDE ELISA'NIN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hülya KAPLAN

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Trichophytosis, bütün dünyada hayvancılık sektöründe ekonomik kayıplara neden olan ve derinin epitelium tabakasının keratinize olarak kalınlaşması ve kılların dökülmesiyle karakterize olan bulaşıcı bir dermatomikozistir.

Sahada hastalığın tedavisi için ticari aşilar uygulanmaktadır. Ancak trichophytosis gerek diğer mantar enfeksiyonları ve gerekse başka enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz deri hastalıkları ile karışabilmektedir. Kesin teşhis yapılmadan tedavi uygulaması ise hem ekonomik kayba neden olmakta hem de gerçek enfeksiyonun tedavisi yapılamamaktadır. Bu amaçla *Trichophyton verrucosum* ile enfekte olan sığırların tedavisi için kesin tanı önem taşımaktadır. Bu çalışmada, trichophytosisin serolojik teşhisinde ELISA'nın kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada geliştirilen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile tanısal duyarlılık %95.24 ve tanısal özgüllük %100 olarak bulundu. Şanlıurfa ve civarında daha önce hastalık tespit edilen 4 sığır sürüsündeki sığırlardan alınan kan serumları Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile test edildi. Buna göre toplam 360 sığır serumu örneğinin 289'u (%80.3) pozitif bulundu.

Sonuç olarak Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'nın; tanıda kullanılan izolasyon yöntemi uzun süre aldığından, kısa sürede teşhis yapabilecek bir tanı yöntemi olduğu ve bu bağlamda hastalığın teşhisine büyük oranda katkı sağlayacağı kanısına varıldı. Ayrıca çalışmada elde edilen yüksek seropositivite oranı, serumlar her ne kadar daha önce hastalık görülen çiftliklerden alınmış olsa da, yine de hastalığın bölgede yaygın olduğunu ve gerekli kontrol önlemlerinin alınmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelime: *Trichophyton verucosum*, Trichophytosis, ELISA.

ABSTRACT

EVALUATION OF USAGE ELISA FOR DIAGNOSIS IN CATTLE TRICHOPHYTOSIS

Hülya KAPLAN

Department of Veterinary Microbiology, Master Thesis

Trichophytosis, is a contagious dermatomycosis characterized by keratinization and thickening of the skin and loss of hair and has been reported in many parts of the world causing big economical lossess.

Commercial vaccines have been applied in the field for the treatment of the disease. However, trichophytosis should be differentiated from other fungal infections and other infectious and non-infectious skin diseases. Treatment without definitive diagnosis might lead to both economical lossess and lack of treatment of the actual disease. Therefore, definitive diagnosis of cattle infected with *Trichophyton verrucosum* is utmost important. The aim of this study was to determine the utility of ELISA in the serological diagnosis of trichophytosis.

In this study, diagnostic sensitivity and specificity was found as 95,24% and 100%, respectively. Serum samples from four cattle facilities, in which the disease previously were seen, located in Şanlıurfa and its vicinity were tested with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). According to the results, 289 out of 360 (80,3%) serum samples were found as positive.

As conclusion, it was thought that Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) could be a useful tool for serologic diagnosis of the trichophytosis since culture of the agent is a quite timely process. In this regard, it is evaluated that to use Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) will contribute highly to the diagnosis of the disease. On the other hand, high seropositivity rate obtained in the study indicates that trichophytosis is endemic in the region and the importance to take necessary control measures although these serum samples were collected from the farms previously infected with *Trichophyton verrucosum*.

Keyword: *Trichophyton verrucosum*, Trichophytosis, ELISA.

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Mantarlar; sporla çoğalan, genellikle hareketsiz, kemoorganotrofik ve klorofil içermeyen ökaryotik organizmalardır. Morfolojik form bakımından mantarlar; filamentöz küf, tek hücreli maya ve maya benzeri bir form (psödoipliksi form) olmak üzere 3'e ayrılırlar. Pleomorfik ve küresel, eliptik formda olan mayalarda çoğalma tomurcuklanma şeklinde olur. Tomurcuklar uzar kopmazsa hif benzeri bir zincir üretirler (psödohif). Küfler ise miselyum ve üreme kısmı (sporlar) olarak 2 ana bölüme ayrılmıştır. Küf miselyumları hif olarak bilinen filamentlerden oluşur (1).

Mantarlarda gözlemlenen mantar hifleri; besinleri emmek için yapay ortama nüfuz eden bitkisel hifler, yapay ortam yüzeyinin üstünde büyüyen aerial hifler, spor taşıyan hava hifleri (üreme hifler), sönositik hifler, tek ve çok çekirdek hücreli septatlardır. Bunun dışında bazı mantarlar özel görünümlü spiral hifler, taraksı gövde, favik avizeler, raket hifleri ve nodüler gövde hiflerini üretirler (1).

Mantarların hücre yapısı elektron mikroskobu ile incelendiğinde sırasıyla hücre duvarı, sitoplazma zarı, sitoplazma ve çekirdek bulunur. 0,06 µm kalınlığında bulunan hücre duvarları; mannanlar, kitin, hemiselülozlar, ve β-glukanları içermektedir. Mantarlarda bulunan başlıca polisakkaritler; β-(1 → 3), β-(1 → 4), β-(1 → 6) ve α-(1 → 3) gibi çeşitli glikozidik bağlar içeren glukanlardır (2,3).

Üreme mantarlarda eşeyli ve eşeysiz olmak üzere 2 şekilde olur. Eşeyli üreme yeteneğine sahip mantarlar; oospor, basidiospor, zigospor, askospor oluşturarak üreme gösterir. Eşeysiz üreme gösteren mantarlar ise; arthrospor, conidiospor, chlamydiospor, blastospor, ve sporangiospor oluşturarak üreme gösterirler (4).

Mantarların beslenmeleri kendilerine özgüdür. Biyosentez için karbonlu kaynaklara ve enerji kaynakları için organik bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Heterotrofiklerdir. Hücre membranlarından monosakkarit, amino asit ve organik asitler gibi basit organik moleküller kolayca içeri girer. Disakkarid, polisakkarid, polipeptid ve proteinler gibi makromoleküller enzimatik membrandan geçecek seviyeye parçalandıktan sonra içeri girerler. Mantarların bir kısmı endositoz veya fagositoz yolu ile besinlerini hücre içine alabilirler (1).

1.2. Dermatofitler

Dermatofitozis, insan ve hayvanlarda fungal etkenler tarafından deri, saç, kıl ve tırnaklara yerleşerek epidermisin keratin tabakasını etkileyen kutanöz enfeksiyondur (1). İnsan ve hayvanlarda dermatofit etkenlerinin meydana getirdiği enfeksiyonlar 'Ringworm' olarak da tanımlanmaktadır (5).

Dünya'nın birçok yerinde dermatofit enfeksiyonları insan ve hayvanlarda büyük bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (6).

Deri yüzeyinde görülen yüzeysel mikotik enfeksiyon prevalansı en sık görülen enfeksiyon olarak Dünya nüfusunun %20-25'inden fazlasını etkileyecek seviyeye yükselmiştir (7).

Yaşam kaynaklarına göre dermatofitler; geofilik, zoofilik ve antropolik olmak üzere 3 ekolojik sınıfa ayrılmaktadır. Bu grupta toprağa uyum sağlayan grup geofilik dermatofitlerdir. Zoofilik grupta yer alan dermatofitler hayvanlarda hastalık oluştururlar ve bazende insanlara bulaşabilirler. Direkt temas ile bulaşma en yaygın şeklidir. Dermatofit etkenleri özellikle de *Microsporum*, *Trichophyton* ve *Epidermophyton* cinsine ait türlerin neden olduğu keratinize dokuların yüzeysel fungal enfeksiyonlara sebep olurlar (8,9).

Dermatofitozis; insan ve hayvanlarda *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* türleri tarafından meydana getirilen mantar enfeksiyonlarıdır. Bu türler uygun ortamda üretildiklerinde morfolojik olarak hifalar ile karakterize küflerdir (10).

Dermatofit türlerinin morfolojik özellikleri Tablo 1.1.'de verilmiştir (11).

Zoofilik türler; Sığırlarda *Trichophyton verrucosum*, kemirgenlerde *Trichophyton mentagrophytes*, karnivorlarda *Microsporum canis* dermatofitozisine sebep olur ve yakın temas ile insanlara da bulaşır (12).

Saçkıran terimi olarak adlandırılan dermatofitoz; *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olarak adlandırılan üç cinsin enfeksiyonudur. Dünya çapında bu patojen mantarlara evcil hayvanların tümü hassastır. Bu patojenlerin arasında en önemlileri; *T. verrucosum*, *T. equinum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *M. canis*, ve *M. nanum*'dur (13).

Ekonomik öneme sahip olan dermatofitozların oluşturduğu lezyonlarda iyileşme çok iyi sağlansa bile deride tabaklama işlemi sonrası lezyon tekrar ortaya çıkar (14).

Tablo 1.1. Dermatofitlerin Morfolojik Özellikleri

Cins	Koloni Yapısı	Mikrokonidiyum	Makrokonidiyum
Microsporum	Gevşek, yün görünümünde küf kolonileri yapar.	Hifin kenarları boyunca teker teker dizilmiştir. Armut veya lobut şeklindedir. Az sayıda bulunmakla beraber ayırıcı tanıda önemleri yoktur.	Makrokonidiyumları ayırt edici karakterdedir. Mekik formunda olup kalın, tüberküle geniş hücre duvarlarına sahiptir. Uçları sivridir. Hücre sayısı 1-15 arasında değişir. Büyüklükleri 6-16 x 6-25 µm arasında değişir. Çok sayıda makrokonidiyuma sahiptir.
Trichophyton	Pamuğumsu örgüde küf kolonileri oluşturur. Pigment üretimi tür ayırımında önemlidir.	Genellikle çok sayıda mikrokonidiyum bulunur. Yapısı tür için karakteristiktir. Yuvarlak, armut veya lobut şeklindedir.	Genellikle ince duvarlı olmakla beraber kalın duvarlıda olabilir. Hücre sayısı 1-12 arasında değişir. Genellikle, silindirik uçları, bazen fusiform şeklindedir. Tek veya demetler halinde olabilir. Büyüklükleri 8-86x 4-14 µm arasındadır. Makrokonidiyumları yok ya da az sayıdadır.
Epidermophyton	Kıvrımlı küf kolonileri yapar. Ortası tümsek, yüzeysel olukludur.	Mikrokonidiyum oluşturmaz.	Çok sayıda makrokonidiyuma sahiptir. Makrokonidiyumları düz duvarlı, lobut şeklindedir. İkili üçlü kümeler yapabilir. 1-9 bölmelidir. 20-60x4-13 µm boyundadır. Epidermophytonfloccosum cinsin tekpatojenidir.

1.2.1. Trichophyton Cinsi

Trichophytonlar pürüzsüz duvarlı, mikrokonidia ve makrokonidia üretirler. Mikrokonidialar 2-3 µm büyüklüğünde, makrokonidialar iğ biçimli fuziform şekilde ince duvarlıdır. Trichophytonlar tırnak, saçlı deri ve saçsız deride dermatofitoz enfeksiyonu oluşturabilirler. Genellikle 7-10 günde ürerler. Üreyen koloniler beyaz-krem renkte, koloni tabanı kırmızı-kahve, sarı renktedir (3,9).

Dermatofitler yaşam kaynaklarına göre yaptıkları enfeksiyonlarda buldukları coğrafi bölgeye göre, sosyo ekonomik koşullar, nüfus yoğunluğu, iklim, insanların yaşam tarzları gibi faktörlerden etkilenir (15,16).

Sığırlarda en sık görülen dermatofitoz etkeni *T. verrucosum*'dur. Klinik olarak deri lezyonları ile karakterizedir. Deride oluşturduğu lezyonlar dışında kontrol ve öneminin pahalı ve zor olması sebebiyle sürü yönetimi ve ekonomisi üzerinde etkisi vardır. Sürü içinde bulunan hayvanlarda hastalık var ise hasta hayvanlardan sağlıklı hayvanlara yayılması çok kolaydır. *T. verrucosum* sporları buldukları ortamda yaklaşık olarak 2-3 yıl canlı kalabilirler. Zoonozdurlar. Yapılan araştırmalar sonucu İsveçli ve İsviçreli çiftçilerde sırasıyla %29 ve %74 mantar enfeksiyonu görüldüğü bildirilmiştir (17,18).

T. verrucosum sıcak havayı, nemi ve kirliliği seven fakültatif bir etkidir. Hızlıca yayılır ve canlılığını uzun süre korur. Sığırlarda trichophytosis hem hayvan sağlığı açısından hem de zoonoz olması sebebiyle insan sağlığı açısından büyük bir problemdir. Kontrol ve tedavi için aşılama en iyi seçenektir (19,20).

Sığırlarda *T. verrucosum*'un neden olduğu trichophytosis Dünya'nın ılıman bölgelerinde büyükbaş hayvancılığın büyük bir sorunudur. Hastalığın diğer hayvanlar, insanlar ve çevreye bulaştırılmasında ise klinik olarak hasta ve asemptomatik hayvanlar önemli rol oynamaktadır. Bunun nedeni hasta ve sağlıklı hayvanların aynı ortamda barındırılmaları ve ortam dezenfeksiyonunun yapılmamasıdır (21).

Etiyoloji ve Epidemiyoloji

Dünya'da son yıllarda, sığırlarda görülen mantar hastalığı vaka sayısı artmıştır. Bir bölgede görülen mantar enfeksiyonunun ortalama %30 olduğu bildirilmiştir. Bölgeler arasında bu oran farklılık gösterebilmektedir. Güney Avrupa ve Orta Doğu en çok tehlike altındaki bölgelerdir (22).

Sığırlarda dermatofitoza sebep olan trichophytosis dişli sürüler daha çok yatkındır. Özellikle 12 aydan küçük olan düvelerde daha çok görülmektedir. Hastalık bir sürüye girdiği zaman hayvanlar; temas veya buldukları ortamda 4 yıl canlı kalan mantar sporlarından enfekte olabilirler (23).

Sığırları enfekte eden ve insanlarda bulaşma özelliği olan trichophytosisin etkeni *T. verrucosum*'dur. Buldukları ortamda birkaç yıl canlı kalan bu mantar sporları çok dirençlidir ve enfekte ettiği deri bölgesi ultraviyole ışınına karşı dayanıklıdır (24).

Trichophytosis; kedi, köpek, eşek, koyun ve keçilerde görülse de asıl hedef türü sığırlardır. Özellikle yüksek süt verimi olan Holstein-Friesian ineklerinde çok sık görülür.

Hastalık mevsimsel olarak sonbahar ve kış aylarında hayvanların konaklama ve hijyen koşullarının eksik olduğu havasız ahırlarda çok fazla görülür. Ayrıca kış aylarında hayvanların yetersiz beslenmeleri ve bağışıklıklarının zayıf olması da enfekte olmalarını etkiler (25).

Patogenez

Derinin dışta bulunan kornifiye katmanlarında dermatofitler canlı kalabilirler. Canlılarda doğal enfeksiyon bu katmanlarda hifaların veya artrosporların birikmesiyle ortaya çıkar. Konakçı enfekte olduktan sonra artrosporlar veya hifalar yapışma ve penetrasyon aracılığı ile ilerleme sağlar. Enfekte olan canlılarda immune yanıt gelişimi T- hücreleri ile gecikmeli olarak gelişir (26).

Dermatofitler yalnızca derinin dış kornifiye tabakası üzerinde yaşayabilir (27).

Klinik Belirtiler

Sürü sağlığını etkileyen saçkıran olarak da bilinen dermatofitozlar ılıman bölgelerde daha sık görülür ve kışın daha çok yaygındır. Buzağılarda puriritik olmayan karakteristik lezyonlar daha çok görülür. Genellikle inekler ve düvelerde göğüs ve uzuvlarda bulunan dermatofitoz lezyonları boğalarda ense kısımlarında bulunur. Saç dökülmesine sebep olan lezyonlar gri-beyaz kabuk oluşumu ile karakterizedir. Zamanla kabuklaşma kalınlaşabilir (25).

Sığırlarda en sık görülen trichophytosis; enfeksiyon şiddetine ve konakçının bağışıklığına bağlıdır. Trichophytosis tespit edilen sığırlarda gözlenen belirgin klinik lezyonlar alopesi, eritema, kabuklaşma, halka biçiminde lezyonlar, vezikül ve papüllerle karakterizedir (28).

Enfekte sığırlarda görülen klinik belirtiler, local olarak boyun ve kafa bölgesinde gri veya beyaz değişiklikler ile karakterizedir. Görülen lezyonlar 10-50 mm boyutundadır. Lezyon görülen bölgede kıl dökülmesi ve kepekleşme çok fazladır. Hayvanlarda ortalama olarak 10-30 lezyon görülebilir. 50 lezyona kadar çıkan hayvanlar da olabilir (29).

Klinik olarak *T. verrucosum*'dan etkilenen hayvanlarda kıl dökülmesi ile birlikte kalın bir kabuk haline gelmiş gri-beyaz lezyonlar görülür. Sığırlarda *T. verrucosum*

dışında; *M. nanum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *T. equinum*, *M. canis* ve diğer bazı mantarlar da izole edilmiştir (30).

İzolasyon ve İdentifikasyon

T. verrucosum identifikasyonu için trichophytosisli sığırların lezyonlu bölgeleri % 70 alkol ile temizlenir ve lezyonların kenar kısımlarından alınan deri kazıntıları ve kıl örnekleri Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerine ekilip inkubasyona bırakılır. Üreyen koloniler *T. verrucosum* yönünden incelenir (31).

Wawrzkievicz (32), 27 örnek ile yaptığı çalışmada, *T. verrucosum* izolasyonu için Sabouraud sıvı besiyerine inokule edildiğini ve 9-11 gün inkubasyon sonunda *Aspergillus ssp.* kontaminasyonuna rağmen *T. verrucosum*'un ürediği ve izolasyon işleminin gerçekleştiğini bildirmiştir. Üretilen kültürün koyalara karşı virulensini kaybetmediği ve bu besi yerinde üretmenin aşı üretimi için uygun olduğu öne sürülmüştür (32).

Kontrol ve Mücadele

Trichophytosis'e karşı mücadelede hasta ve sağlıklı hayvanlarda tedavi ve koruyucu amaçla aşılama yapılmaktadır. Sığırlarda hastalığa sebep olan etken *T. verrucosum*'dur. Hastalık etkeni türe spesifiktir. Fakat trichophytosis bir deri hastalığı olduğu için diğer dermatofit enfeksiyonları ile karıştırılmaktadır. Hastalığın kontrol ve eradikasyonu için doğru teşhisin konulması kilit noktadır. Bu amaçla izole edilen etkenlerin identifikasyon ve izolasyonları yapılmaktadır. Ancak, gerek altyapı gereksinimi ve gerekse yüksek maliyeti nedeni ile dermatofit türlerinin; koloni özellikleri, mikroskop morfolojileri, büyüme gereksinimleri, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre tür düzeyinde tanılanması en az 15 günlük bir zaman almaktadır (33).

Rybnikár ve Oborilova (34), buzağuları farklı dozlarda *T. verrucosum* kültürü ile aşılamış ve daha sonra deneysel aşılanan buzağularda enfeksiyon sonrası, temas ve aşılama sonrası mantar enfeksiyonun klinik belirtilerini gözlemlemişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda aşılanan hayvanlarda kazanılmış bağışıklığın yanında enfeksiyon geçiren hayvanların da bağışıklık kazandığı görülmüştür.

Japonya'da yapılan bir çalışmada, sığırlarda trichophytosis lezyonu bulunmayan sağlıklı hayvanlardan ve hasta hayvanlardan alınan örneklerden yapılan ekimlerde *T. verrucosum* izolasyonu araştırılmıştır. Çalışma sonucunda sığırlarda dermatofitozise

sebeup olan *T. verrucosum*'un sağlıklı hayvanlara, hasta hayvanlardan temas yoluyla kolayca bulaşabileceği tespit edilmiştir. Bu sebeple araştırmacılar hayvancılıkta ciddi ekonomik kayıplara neden olan ve halk sağlığını etkileyen trichophytosis için ciddi önlemler alınması gerektiğini bildirmişlerdir (35).

İmmünizasyon amaçlı son yıllarda trichophytosis'e karşı birçok mantar izolatu kullanılarak çalışmalar yapılmış ve aşılama sonrası ELISA antikor titrelerinin yükseldiği bildirilmiştir (36,37).

Teşhis

Zahran ve ark. (38), *T. verrucosum* enfeksiyonuna karşı yapılan aşılama öncesi ve aşılama sonrası bağışıklık cevabının belirlenmesi için humoral immüneyi değerlendirmek amacıyla ELISA tekniğini kullanmışlardır.

Bagut ve ark. (39), sığırlarda mantar enfeksiyonunun serolojik tanısı için bir ELISA yöntemini geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Bu amaçla direkt mikroskopi, floresan mikroskopi ve PCR ile ringworm enfeksiyonu olan hayvanlarda hastalık doğrulanmış, infekte ve sağlıklı hayvanların serum örnekleri toplanmıştır. Antijen olarak *T. verrucosum*'a filogenetik olarak oldukça yakın olan iki farklı rekombinant proteini kullanmışlardır. Sonuçlar değerlendirildiğinde genel olarak, rekombinant antijenler ile yapılan ELISA'nın enfekte olmuş hayvanlar ile sağlıklı hayvanları ayırmada başarılı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar geliştiren ELISA'nın bir antijen ile % 89.6 duyarlılık, % 92.7 özgülük, diğer antijen ile % 88.1 duyarlılık ve % 90.9 özgülük değerine sahip bulunduğunu bildirmişlerdir.

Zrimsek ve ark. (40), *T. mentagrophytes* ile enfekte tavşanlar için bir indirekt ELISA geliştirmiş ve tanısal potansiyeli değerlendirmişlerdir.

Gudding ve ark. (41), sığır dermatofitozisinin immunoprofilaksisini araştırmak için buzağı ve tavşanları *T. verrucosum* ile aşılamışlar ve sonrasında hücresel yanıtı değerlenirmenin yanısıra humoral yanıtı değerlendirmek için antikor üretimini ELISA ile belirlemişlerdir.

Kane ve ark. (42), *T. verrucosum*'un erken teşhisi ve tanımlanması için Trichophyton türlerini (*T. verrucosum*, *T. schoenleinii*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. megninii*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. equinum*.) BCPPCYA agara

ekim yaparak 28⁰C'de 10 gün gözlemlemiştir. *T. verrucosum* ile diğer Trichophyton türlerinin karşılaştırılması sonucu *T. verrucosum*'un benzersiz sınırlı büyümesine ve geniş hidroliz zonu oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Elad ve ark. (43), *T. verrucosum*'a karşı aşılama sonrası buzağuların serumlarında anti-*T. verrucosum* antikorlarının varlığını belirlemek için ELISA tekniğini başarıyla kullanmışlardır.

Mikaili ve ark. (44), Trichophyton agarda ürettikleri *T. verrucosum* izolatını immunizasyon amaçlı 3 kere boyun bölgesinden kas içi uygulamışlar ve bu aşıları hayvanlar ile aşısız kontrol grubu hayvanların serumlarında ELISA ile antikor titrelerini saptayarak humoral yanıtı değerlendirmişlerdir.

Bu çalışmada, trichophytosisin serolojik teşhisinde ELISA'nın kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Besiyerleri ve Solüsyonlar

Saboraud Dextrose Agar

Trichophyton verrucosum suşunun üretimi ve identifikasyonu amacıyla kullanıldı.

Peptic digest of animal tissue.....	5.0 g
Pancreatic digest of casein.....	5.0 g
Dextrose.....	40.0 g
Agar.....	15.0 g
Distile su.....	1 lt

Besiyerinin hazırlanmasında 65 gr SDA (**BD Difco, 210950**) tozu 1 lt distile suda eritildi ve pH 6.0-7.0 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Steril besiyeri 40-45°C 'ye kadar soğuduktan sonra petrilere taksim edildi.

Trichophyton Agar 3

Trichophyton verrucosum suşunun identifikasyonu amacıyla kullanıldı.

Vitamin assaycasmino acids.....	2.5 g
Dextrose.....	40.0 g
Monopotassium phosphate.....	1.8 g
Magnesium sülfat.....	0.1 g
Agar.....	15.0 g
İnositol.....	50.0 mg
Thiamine HCl.....	200.0 ug
Distile su.....	1 lt

Besiyerinin hazırlanmasında 59 gr TA3 (**BD Difco, 296245**) tozu 1 lt distile suda eritildi ve pH 6.6-7.0 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Steril besiyeri 40-45°C 'ye kadar soğuduktan sonra petrilere taksim edildi.

Trichophyton Agar 1

Trichophyton verrucosum suşunun identifikasyonu amacıyla kullanıldı.

Vitamin assaycasmino acids.....	2.5 g
Dextrose.....	40.0 g
Monopotassium phosphate.....	1.8 g

Magnesium sülfat.....0.1 g
Agar.....15.0 g
Distile su.....1 lt

Besiyerinin hazırlanmasında 59,4 g TA1 (**BD, 296243**) tozu 1 lt distile suda eritildi ve pH 6.6-7.0 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Steril besiyeri 40-45°C 'ye kadar soğuduktan sonra petrilere taksim edildi.

Brom Cresol Purple Agar

Trichophyton verrucosum suşununun identifikasyonu amacıyla kullanıldı.

Lactose.....10 g
Bromo cresol purple.....0.025 g
Peptone mixture.....5 g
Beef extract.....3 g
Agar.....10.0 g
Distile su.....1 lt

Besiyerinin hazırlanmasında 28.03 g BCP (**HIMEDIA, M1905**) tozu 1 lt distile suda eritildi ve pH 6.6-7.0 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Steril besiyeri 40-45°C 'ye kadar soğuduktan sonra petrilere taksim edildi.

Üre Agar

Trichophyton verrucosum suşununun identifikasyonu amacıyla kullanıldı.

Per Liter Pancreatic Digest of Gelatin1.0 g
Dextrose1.0 g
Sodium Chloride5.0 g
Potassium Phosphate2.0 g
Urea20.0 g
Distile su.....1lt

Besiyerinin hazırlanmasında 29 g Üre agar (**Oxoid-SR020K**) tozu 1 lt distile suda eritildi ve pH 6.6-7.0 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Steril besiyeri 40-45°C 'ye kadar soğuduktan sonra petrilere taksim edildi.

Antijen Kaplama Solüsyonu

Sodium chloride	1,59 g
Sodium hydrogen carbonate	2,93 g
Distile su.....	1lt

Solüsyon hazırlanmasında 4,52 g toz 1 lt distile suda eritildi ve pH 9,6 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 20 dakika sterilize edildi.

Dengeli Tuzlu Su (PBS)

Sodiumchloride (NaCl).....	7,0 g
Di-sodium hydrogen orthophosphate (Na ₂ HPO ₄).....	1,4 g
Potassium di-hydrogenphosphate (KH ₂ PO ₄).....	2 g
Potassium chloride (KCl).....	0,2 g
Distile su.....	1lt

Solüsyon hazırlanmasında 10,6 g toz 1 lt distile suda eritildi ve pH 7,2 ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 20 dakika sterilize edildi.

Bloklama Solüsyonu

Tween 20.....	500 µl
Milk powder (Yağı alınmış).....	15 g
PBS	500 ml
Sodyum azid (0.02 %)	

Yıkama Solüsyonu

Tween 20.....	1 ml
PBS	1 lt

Substrat Solüsyonu (Fosfat-Sitrat Buffer, pH 5.0)

0.1 M sitrik asit.....	24.3 ml
0.2M dibazik sodyum sitrat.....	25.7 ml
OPD.....	0.4 mg/ml
%30 H ₂ O ₂	40µl
Distile su.....	50 ml

2.2. İzolasyon ve İdentifikasyon

Materyal ve Metod

İzolasyon Örnekleri: İzolasyon amacıyla Şanlıurfa ili ve çevresindeki ilçelerde bulunan işletmelerde klinik olarak trichophytosis şüpheli hayvanlarda deri lezyonları bulunan bölgeden sterilitiye uyularak deri kazıntısı ve kıl örnekleri alındı. Alınan örnekler laboratuvara getirilerek izolasyon için kullanıldı.

Alınan numuneler farklı yaş dağılımlarına göre alındı. Kan serumları farklı yaş grubu hayvanlardan, kıl örnekleri ve deri kazıntıları klinik olarak trichophytosis teşhisi konulan hayvanlardan alındı (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. İşletmelerden Alınan Numune Dağılımları

İşletme adı	Hayvan	Alınan numune	Yaş dağılımı	Hayvan sayısı
A	Sığır	Deri+kıl örnekleri Kan serumu	6-12 aylık	90
	Buzağı	Kan serumu	Yeni doğmuş	25
B	Sığır	Deri+kıl örnekleri Kan serumu	6-12 aylık	92
	Buzağı	Kan serumu	Yeni doğmuş	30
C	Sığır	Deri+kıl örnekleri Kan serumu	6-12 aylık	88
	Buzağı	Kan serumu	Yeni doğmuş	20
D	Sığır	Deri+kıl örnekleri Kan serumu	6-12 aylık	90
	Buzağı	Kan serumu	Yeni doğmuş	25
Toplam				460

Serum Örnekleri

Pozitif Kontrol Serumları: Deri kazıntısı ve kıl örneği alınarak izolasyon yapılan kültür pozitif hayvanların bulunduğu enfekte çiftlikten 40 adet hayvandan kan alınarak testin duyarlılığının saptanmasında pozitif referans olarak kullanıldı. Ayrılan serum kısımları, kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Negatif Kontrol Serumları: Testin özgüllüğünün ve eşik (cutoff) değerinin saptanmasında negatif referans kontrol olarak aşısız ve trichophytosis geçmişi olmayan annelerden doğan 100 adet buzağıdan doğumdan hemen sonra kan alınarak serumları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Test Serum Örnekleri: ELISA’da test edilmek üzere 4 işletmeden klinik olarak trichophytosis şüpheli 360 adet hayvandan kan alınarak serumları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

İzolasyon ve identifikasyon amacıyla, klinik olarak trichophytosis teşhisi konulan hayvanlar belirlendi. Deri kazıntıları ve kıl örnekleri alındı. Alınan deri kazıntıları ve kıl örnekleri direkt mikroskopi ve makroskopik olarak incelendi.

Direkt mikroskopi olarak; temiz bir lam üzerine Lakto fenol pamuk mavisi konulduktan sonra üzerine pens ile 5-6 kıl örnekleri bırakıldı ve lamelle kapatılarak mikroskop altında (200 X) incelendi. Aynı zamanda lam üzerine alınan kıl örneklerinin üzerine %10-20 KOH solüsyonu damlatılıp hafifçe ısıtıldıktan sonra 30-60 dakika beklenerek mikroskopta (200 X) incelendi (1).

Makroskopik olarak; laboratuvara getirilen deri kazıntıları SDA besiyerine ekildi. 20-25°C’de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. Üreyen koloniler 3-4 günde bir gözlemlendi. İnkubasyon sonunda toplanan kültürler identifikasyon amacıyla *T. verrucosum* spesifik besiyerlerine (Trichophyton Agar 1 (TA1), Trichophyton Agar 3 (TA3), Brom Cresol Purple Agar (BCP) ve Üre Agar) ekimleri yapılarak 20-25°C’de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda üreme saptanan mantar kolonilerinin; üreme hızları, morfolojileri, yüzey renkleri, tabandaki pigmentleri ve mikroskobik incelemede hiflerin yapısı, makrokonidyum ve mikrokonidyumların varlığı göz önüne alınarak identifikasyonları gerçekleştirildi (45,46).

Oluşan kolonilerin makroskobik ve mikroskobik morfolojileri değerlendirilerek etkenlerin identifikasyonları yapıldı (31).

***T. verrucosum* Suşunun Antijen Üretimi İçin Çoğaltılması**

İdentifikasyon ve izolasyon sonucu üreyen *T. verrucosum* kolonilerden Tiamin ve İnositol ile hazırlanmış SDA besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda SDA üzerinde üreyen *T. verrucosum* kültürleri steril pens ile steril şişe içine toplandı. Toplanan *T. verrucosum* kültürlerinin canlılık sayımı için dilusyonları yapıldı (34).

ELISA Antijenin Hazırlanması ve Belirlenmesi

ELISA için en uygun antijenin belirlenmesi amacıyla 3 farklı şekilde antijen hazırlandı. Bu amaçla üretimi yapılan canlı *T. verrucosum* suşu 50 ml cam şişelere aktarılarak 3'e bölündü.

- 1.antijenin hazırlanmasında üretilen *T. verrucosum* antijeni 121°C'de otoklav edildi.
- 2.antijenin hazırlanmasında dondurma-çözdürme metodu kullanıldı. Bu amaçla üretilen antijen sıvı azot (-196°C) tankı içerisine 30 dakika, sonrasında oda koşullarında 30 dakika olacak şekilde 4 kere dondurulup çözdürülerek hazırlandı.
- 3.antijenin hazırlanmasında dondurma-çözdürme metodu bu kez -20°C'de gerçekleştirildi. Bu yöntemde bekleme süreleri 60 dakika olarak belirlendi.

Sonuç olarak; 3 farklı şekilde hazırlanmış olan *T. verrucosum* antijenleri ile ELISA çapraz titrasyon (checkerbord) yapıldı. Bu amaçla antijenin ve serumun iki katlı dilüsyonları kullanıldı ve en uygun antijen dilüsyonu belirlendi. Belirlenen bu antijen dilüsyonunu antijenlerin ELISA pleytlerini kaplamada kullanıldı.

ELISA Prosedürü

Çalışmada hazırlanan ve en uygun titresi belirlenen antijen ile indirekt ELISA tekniği uygulandı. ELISA prosedürü Bagut ve ark. (39), bildirdiği yöntem modifiye edilerek kullanıldı.

İndirekt ELISA

Çalışmada kullanılacak olan ELISA solid faz antijeni antijen kaplama tampon solüsyonu içinde 1/50 oranında sulandırılarak 96 gözlü tabanlı maxisorppolistiren pleytlere (NUNC 692620) 100 µl olacak şekilde taksim edildi. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler

4°C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında pleytler %0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandılar ve sonrasında %3 yağsız süt tozu ile hazırlanan PBS solüsyonu ile 1 saat süre ile çalkalayıcıda blokladılar. Bloklama sonrası pleytler 4 kez yıkandıktan sonra 1/100’lük dilüsyonları yapılan pozitif ve negatif kontrol serumları pleyt kuyucuklarına 100 µl olacak şekilde konuldu. Pleytlerin üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile shaker üzerinde inkübasyonları yapıldı. Pleytler tekrar 4 kez aynı yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, horseradishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini dilüsyon çözeltisinde üretici firmanın belirttiği dilüsyonda dilüe edilerek tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 4 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H₂O₂) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H₂SO₄ ilave edilerek pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm’de absorbans değerleri okundu.

Testin eşik değerinin belirlenmesinde negatif absorbans değerlerinin ortalaması artı 3 standart sapma alındı. Belirlenen eşik değeri, farklı işletmelerden alınan test serumlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

ELISA’nın tanısal özgüllüğü ve duyarlılığının saptanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

Duyarlılık (Sensitivite)

$$\frac{\text{Gerçek Pozitif Sayısı}}{\text{Gerçek Pozitif Sayısı} + \text{Yanlış Negatif Sayısı}} \times 100$$

Özgüllük (Spesifite)

$$\frac{\text{Gerçek Negatif Sayısı}}{\text{Gerçek Negatif Sayısı} + \text{Yanlış Pozitif Sayısı}} \times 100$$

Testin sonuçlarının belirtilmesinde aşağıdaki formül kullanıldı.

Yüzelik Pozitivite (Percent positivity PP)

$$\frac{\text{Test Serumu Optik Dansite} - \text{Ortalama Negatif Serum Optik Dansite}}{\text{Ortalama Pozitif Kontrol Optik Dansite} - \text{Ortalama Negatif Serum Dansite}} \times 100$$

Etik Onay: Çalışma için, 23.11.2016 tarih 2016/35 sayılı izin belgesi, Dollvet A.Ş.
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır.



3. BULGULAR

Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ve çevresindeki ilçelerde bulunan işletmelerde klinik olarak trichophytosis tanısı konulan hayvanlardan alınan deri kazıntısı ve kıl örnekleri ile kan serumları kullanıldı. Testin özgüllüğü ve eşik değerinin belirtilmesinde negatif referans kontrol olarak aşısız ve trichophytosis geçmişi olmayan annelerden doğan 100 adet buzağıdan alınan kan serumları kullanıldı.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Klinik Örnekler

Şanlıurfa ve çevresinde bulunan işletmelerde tespit edilen Trichophytosis'li hayvanların lezyonlu bölgelerinden yöntemine uygun olarak deri kazıntısı ve kıl örnekleri laboratuvara getirildi.

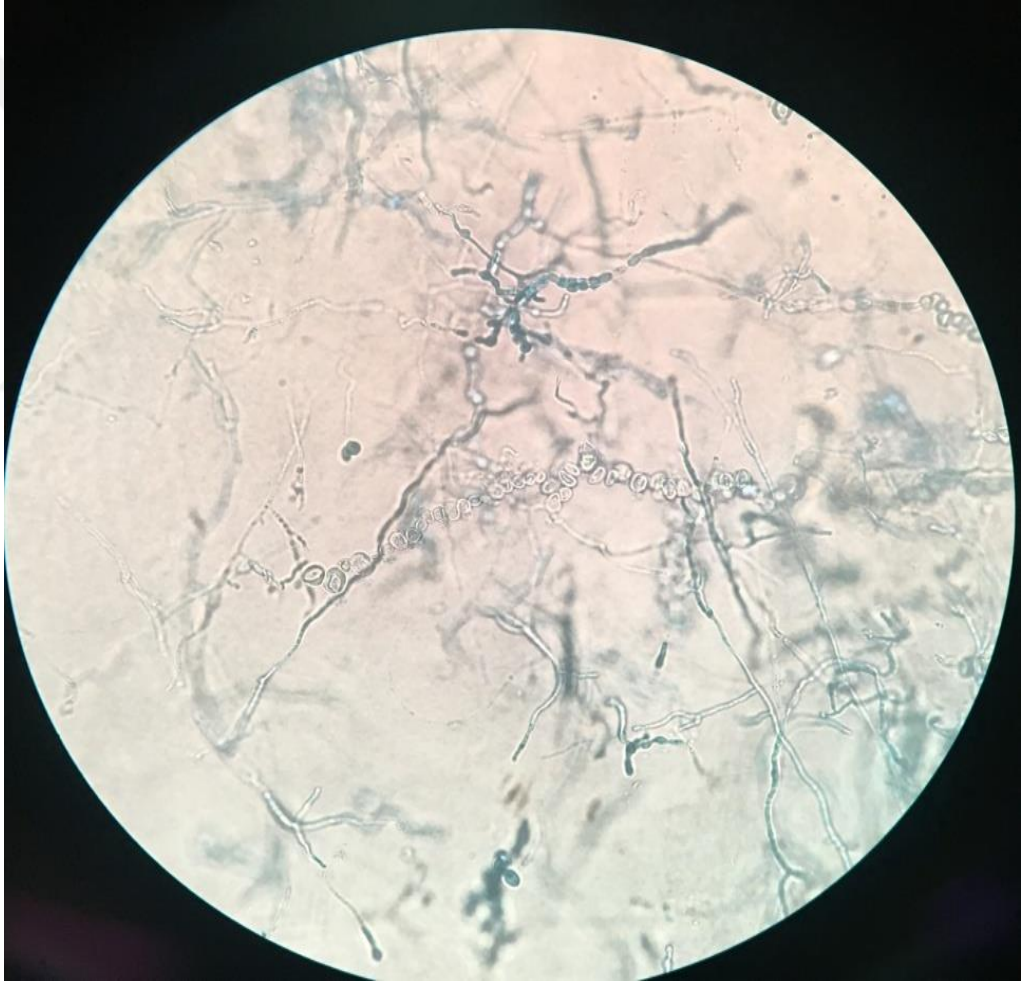


Resim 3.1. İşletmelerde Klinik Olarak Trichophytosis Teşhisi Konulan Hayvanlar

3.1.1. Mikroskopik İnceleme

Temiz bir lam üzerine 1-2 damla lactophenol pamuk mavisini (Merck, 1.13741.0100) damlatıldıktan sonra üzerine steril pens yardımıyla trichophytosis'li hayvanların lezyonlu bölgelerinden alınan deri kazıntısı ve kıl örnekleri konuldu ve üzeri lamel ile kapatıldı. Mikroskopik olarak incelendi.

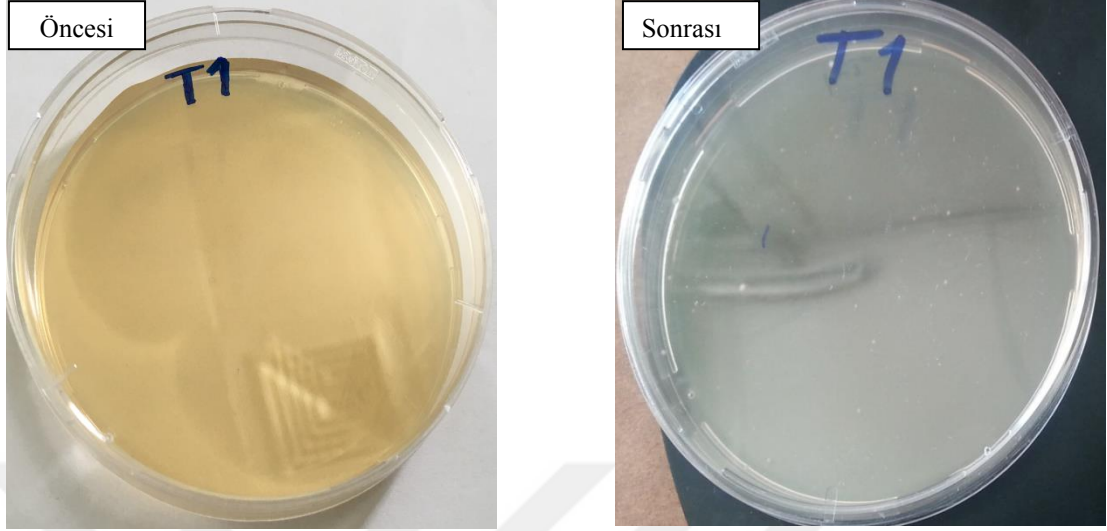
Mikroskoptaki incelemeler sonucu *T. verrucosum* etkeni makrokonidia ve mikrokonidiler şeklinde görüldü. Miseller renksiz, dallanmış, düz veya kıvrımlı, fare kuyruğu şeklinde gözlemlendi. Mikrokonidyumlar ise, oval, yuvarlak veya armut biçiminde olduğu görüldü.



Resim 3.2. Mikroskopta *T. verrucosum* Etkeni Mikrokonidiler ve Makrokonidialar

3.1.2. Makroskobik İnceleme

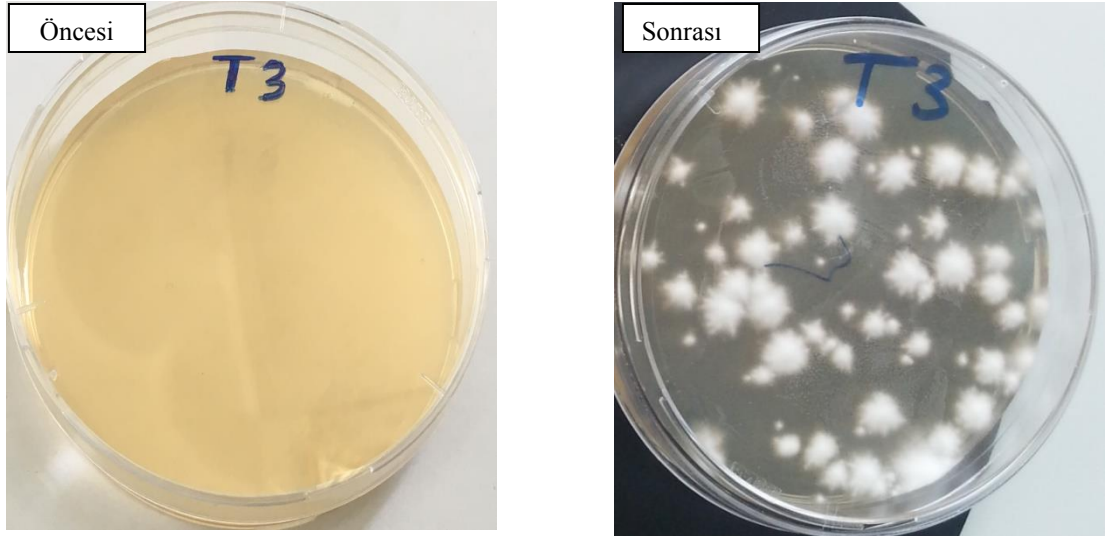
Trichophyton Agar 1



Resim 3.3. TA1 Ekim Öncesi Besiyeri ve Ekim Sonrası Üreme

TA1'e ekim yapıldı. İnkubasyon süresi sonunda zayıf nokta tarzında *T. verrucosum*'a ait spesifik üremeler gözlemlendi.

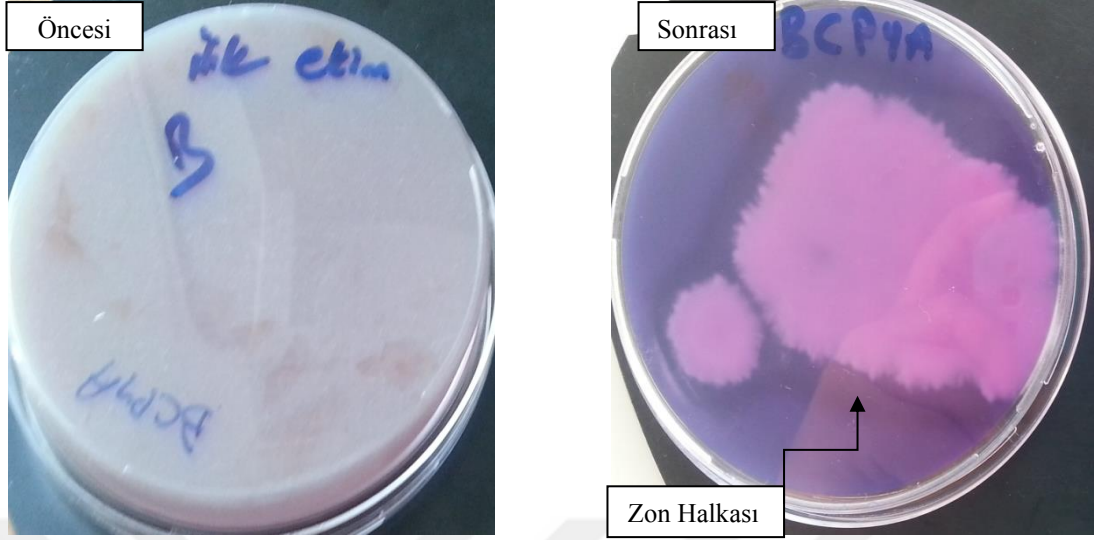
Trichophyton Agar 3



Resim 3.4. TA3 Ekim Öncesi Besiyeri ve Ekim Sonrası Üreme

TA3'e ekim yapıldı. İnkubasyon süresi sonunda kuvvetli spesifik yıldız şeklinde *T. verrucosum*'a ait koloniler gözlemlendi.

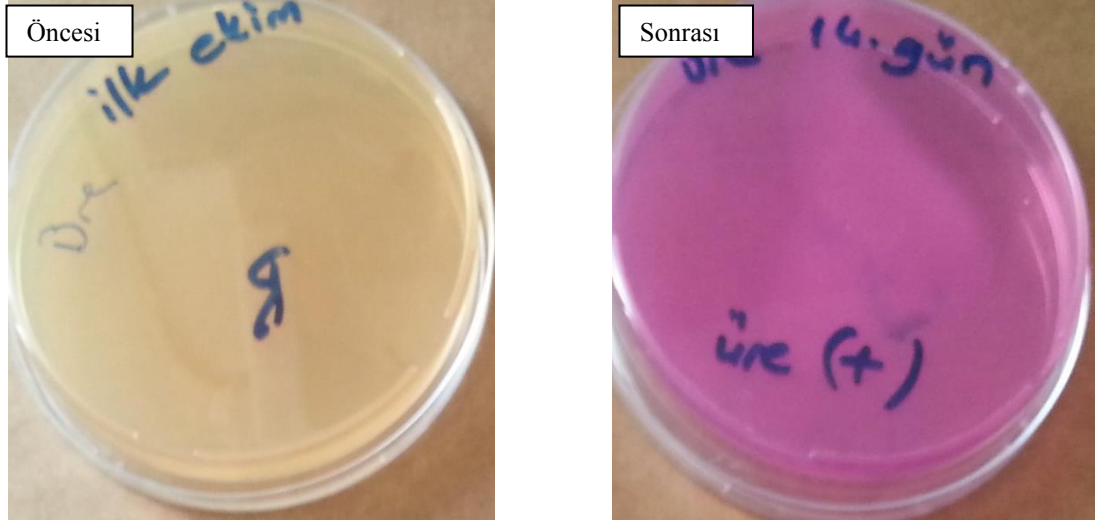
Brom Cresol Purple Agar



Resim 3.5. BCP Ekim Öncesi Besiyeri ve Ekim Sonrası Üreme

T. verrucosum suşu kazeini hidrolize ederek üremesi etrafında berrak, çok belirgin zon halkası oluşturdu. Pozitif sonuçlarda üremeden dolayı pH nötr ortamdan alkali ortama geçtiği için içindeki indikatör boyanın etkisi ile pembe renk aldı.

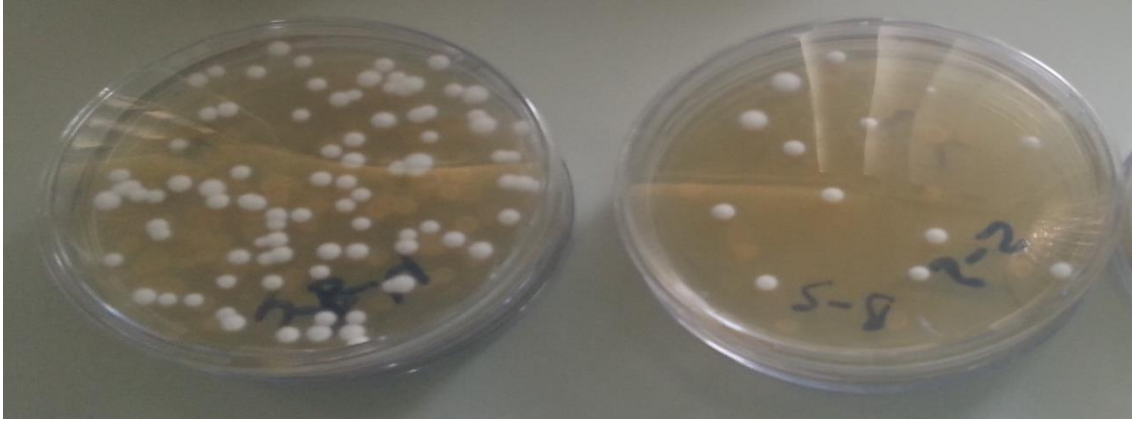
Üre Agar



Resim 3.6. Üre agar Ekim Öncesi Besiyeri ve Ekim Sonrası Üreme

T. verrucosum suşu ekim yapılmadan önce üre agar sarı renktedir. Pozitif sonuçlarda üremeden dolayı pH nötr ortamdan alkali ortama geçtiği için içindeki indikatör boyanın etkisi ile fuşya pembe renk aldı.

Saboraud Dextrose Agar



Resim 3.7. *T. verrucosum* Kolonilerinin SDA Besiyerinde Görünümü

T. verrucosum antijeni ekim yapıldıktan 10-15 gün sonra agar üzerinde yapılan canlılık sayımı 8×10^6 CFU/ml olarak belirlendi (34).

Makroskobik olarak oluşan koloni rengi, yapısı, alt ve üst yüzey rengi dikkatlice incelendi, mantar atlasında bulunan bilgilerle karşılaştırıldı ve uygunluğu ispat edildi.

3.2. ELISA Bulguları

ELISA Antijenin Belirlenmesi

Hazırlanan 3 farklı antijenin çapraz titrasyon sonuçları birbirine benzer sonuçlar verdiği için güvenlik nedeni ile canlı olmayan otoklav edilen suş (1.antijen) ELISA solid faz antijeni olarak seçildi.

Serum Örnekleri

Çalışmada kullanılacak serumlar: Şanlıurfa ili ve çevresinde bulunan işletmelerde (A,B,C,D) klinik olarak tespit edilen; trichophytosisli ve sağlıklı hayvanlardan temin edildi. Bu işletmelerde bulunan hayvanlardan kan örnekleri alınarak serumlar çıkarıldı ve bu serumlar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edildi.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Serum Sayıları ve Orijinleri

İşletme adı	A	B	C	D	Toplam
Serum sayısı	90	92	88	90	360

Eşik Değerinin Hesaplanması

Çalışmada negatif kontrol serumlarının OD değerlerinin ortalaması artı 3 standart sapma ELISA için eşik değeri olarak hesaplandı. Hesaplanan bu değer çalışmada kullanılan test serumların sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

Tablo 3.2. Negatif Serumların ELISA Sonuçları

0,0788	0,0749	0,0758	0,0763	0,0905	0,0841	0,0928	0,1082	0,0594	0,0716	0,0463	0,0435
0,0389	0,0418	0,0463	0,049	0,055	0,0556	0,0432	0,0432	0,1185	0,0448	0,057	0,0639
0,0417	0,0375	0,044	0,0481	0,048	0,0473	0,0455	0,0447	0,0738	0,0692	0,072	0,0767
0,0615	0,0756	0,0593	0,0379	0,0451	0,0485	0,0406	0,0411	0,0573	0,0499	0,0487	0,0474
0,0452	0,0512	0,0518	0,0555	0,0515	0,0576	0,0536	0,0579	0,0819	0,0757	0,062	0,0705
0,0621	0,065	0,0631	0,0657	0,0667	0,0556	0,0564	0,061	0,0621	0,0452	0,0609	0,0707
0,0781	0,0746	0,0587	0,0604	0,0579	0,0581	0,0514	0,06	0,0756	0,045	0,0447	0,0747
0,042	0,0438	0,0459	0,0485	0,0612	0,0827	0,3681	0,3798	0,0899	0,0893	Blank	Blank

Ortalama değer: 0,066596

Standart sapma: 0,048253

Eşik değeri: 0,211358

Tanısal Özgüllüğün (Spesifisite) ve Duyarlılığın (Sensitivite) Hesaplanması

Çalışmada pozitif referans olarak kullanılan 40 pozitif serumun ELISA çalışmamızda belirlenen eşik değeri dikkate alınarak pozitif bulunan serum sayısı 38 olarak bulundu.

Buna göre testimizin tanısal duyarlılığı;

Duyarlılık (Sensitivite)=

$$\frac{\text{Gerçek Pozitif Sayısı}}{\text{Gerçek Pozitif Sayısı} + \text{Yanlış Negatif Sayısı}} \times 100$$
$$= \frac{40}{40 + 2} \times 100$$

= %95.24 olarak bulundu.

Çalışmada negatif referans olarak kullanılan 100 serumun hiçbiri eşik değerin üzerinde Optik Dansite (OD) değeri vermedi. Buna göre testimizin tanısal özgüllüğü;

Özgüllük (Spesifite)=

$$\frac{\text{Gerçek Negatif Sayısı}}{\text{Gerçek Negatif Sayısı} + \text{Yanlış Pozitif Sayısı}} \times 100$$
$$= \frac{100}{100 + 0} \times 100$$

= %100 olarak bulundu.

ELISA Sonuçları

Tüm işletmelerden klinik olarak trichophytosis teşhisi konulan hayvanlardan ve sağlıklı hayvanlardan alınan serum örnekleri ile ELISA yapıldı ve değerlendirildi. Eşik değerine göre pozitif ve negatif serumlar belirlendi.

Her test serumu için yüzdeler pozitivite aşağıdaki formülle hesaplandı.

Yüzdeler Pozitivite (Percent positivity PP)

$$\frac{\text{Test Serumu Optik Dansite} - \text{Ortalama Negatif Serum Optik Dansite}}{\text{Ortalama Pozitif Kontrol Optik Dansite} - \text{Ortalama Negatif Serum Dansite}} \times 100$$

Ortalama Negatif Serum Optik Dansite Değeri: 0,066596

Ortalama Pozitif Kontrol Optik Dansite Değeri: 2,204845

Tablo 3.3. A İşletmesi ELISA Sonuçları

Numune	0,8663	0,8322	1,5473	1,5453	2,0913	1,8936	2,4977	2,36	0,8481	0,8382	1,4326	1,3577
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% PP	37,39	35,805	69,248	69,154	94,689	85,44	113,69	107,25	36,548	36,085	63,884	60,381
Numune	0,7678	0,7645	1,0999	1,1928	2,0405	1,2035	1,6182	1,3616	0,4759	0,3811	0,9646	0,8929
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PP	32,79	32,63	48,32	52,66	92,31	53,16	72,56	60,56	19,14	14,70	41,99	38,64
Numune	1,7925	1,7256	2,8215	2,9031	1,4684	1,1836	1,1689	1,06	0,424	0,2877	0,4452	0,532
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% PP	80,71	77,58	128,8	132,6	65,55	52,23	51,55	46,45	16,71	10,34	17,70	21,76
Numune	1,4339	1,6162	1,3348	1,5108	2,6038	2,4172	2,169	2,1657	0,6791	0,1663	0,2477	0,1947
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
% PP	63,94	72,47	59,31	67,54	118,6	109,9	98,32	98,16	28,64	4,662	8,469	5,991
Numune	0,6972	0,6871	0,5735	0,5616	2,6758	2,5552	2,2857	2,1933	0,0716	0,0576	0,0507	0,0549
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
% PP	29,49	29,01	23,70	23,14	122,0	116,3	103,75	99,46	0,234	-0,42	-0,74	-0,54
Numune	0,1763	0,1739	0,4555	0,4542	0,0886	0,0799	0,0843	0,0874	0,2752	0,2113	0,0504	0,0548
+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
% PP	5,130	5,018	18,18	18,12	1,029	0,622	0,827	0,972	9,755	6,767	-0,75	-0,55
Numune	2,5673	2,4994	0,4849	0,5719	0,12	0,0481	0,2171	0,1912	0,1061	0,1002	1,5218	1,388
+/-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
% PP	116,9	113,7	19,56	23,63	2,497	-0,86	7,038	5,827	1,847	1,571	68,05	61,79
Numune	1,5311	1,1937	0,9312	0,8799	2,2306	1,9994						
+/-	+	+	+	+	+	+	N	N	P	P	BLANK	BLANK
% PP	68,49	52,71	40,43	38,03	101,2	90,39						

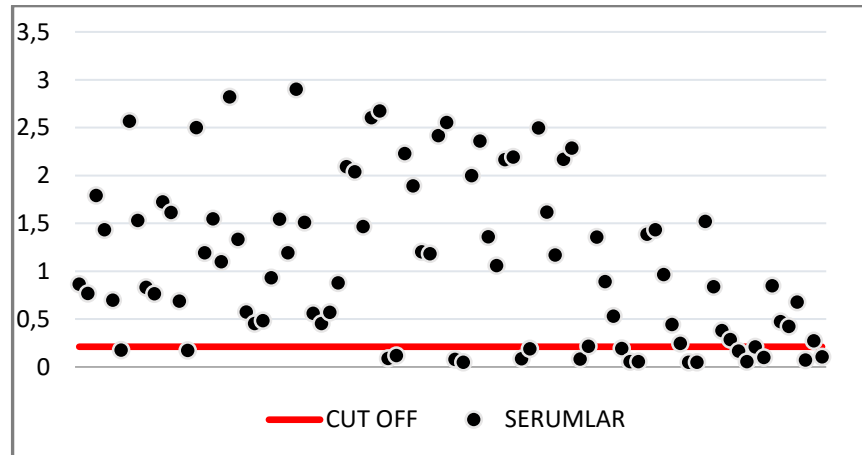
Toplam Serum Sayısı: 90 adet serum

Pozitif Serum Sayısı: 71 adet serum

Negatif Serum Sayısı: 19 adet serum

A çiftliğinde yapılan ELISA'da serumların %78,9'u pozitif ve %21,1' negatif bulundu.

Grafik1.'de test serumlarının OD değerine göre eşik değeri dikkate alınarak elde edilen dağılımı verilmiştir.



Grafik 3.1. A İşletmesi Serum Sonuçlarının OD dağılımları

Tablo 3.4. B İşletmesi ELISA Sonuçları

Numune	1,0219	1,5227	0,3919	0,4098	0,3554	0,352	0,9566	0,9236	0,1795	0,1856	0,7784	0,6581
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
% PP	44,67	68,09	15,21	16,05	13,50	13,34	41,62	40,07	5,280	5,565	33,28	27,66
Numune	0,3517	0,4798	0,3089	0,3272	0,1714	0,1583	0,4513	0,5143	2,2888	2,2741	0,4909	0,4376
+/-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
PP	13,33	19,32	11,33	12,18	4,901	4,288	17,99	20,93	103,9	103,2	19,84	17,35
Numune	0,6857	1,0769	0,0542	0,0598	1,8451	1,7944	0,157	0,1344	0,9734	0,855	1,2982	1,0273
+/-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
% PP	28,95	47,24	-0,57	-0,31	83,17	80,80	4,227	3,171	42,40	36,87	57,59	44,92
Numune	0,7236	0,9711	0,1035	0,1219	0,5187	0,4995	0,6147	0,5611	0,0814	0,0729	1,2381	1,1175
+/-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
% PP	30,72	42,30	1,725	2,586	21,14	20,24	25,63	23,12	0,692	0,294	54,78	49,14
Numune	1,9082	1,8142	0,2648	0,2886	1,6742	1,6205	2,1575	1,949	1,462	1,4038	1,4056	1,1891
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% PP	86,126	81,730	9,269	10,38	75,18	72,67	97,78	88,03	65,25	62,53	62,62	52,49
Numune	2,2414	2,1653	1,6698	1,6578	2,08	1,8494	1,7555	1,7542	1,7621	1,7821	1,1524	1,1563
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% PP	101,7	98,15	74,97	74,41	94,16	83,37	78,98	78,92	79,29	80,22	50,78	50,96
Numune	2,1331	2,0243	2,3515	2,2683	1,9857	1,8253	0,2422	0,2613	1,7503	1,6292	1,5808	1,7426
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% PP	96,64	91,55	106,8	102,9	89,75	82,24	8,212	9,105	78,74	73,07	70,81	78,38
Numune	2,0119	1,8745	2,2627	2,2826	0,047	0,043	0,0873	0,0445				
+/-	+	+	+	+	-	-	-	-	N	P	BLANK	BLANK
% PP	90,97	84,55	102,7	103,6	-0,91	-1,10	0,968	-1,03				

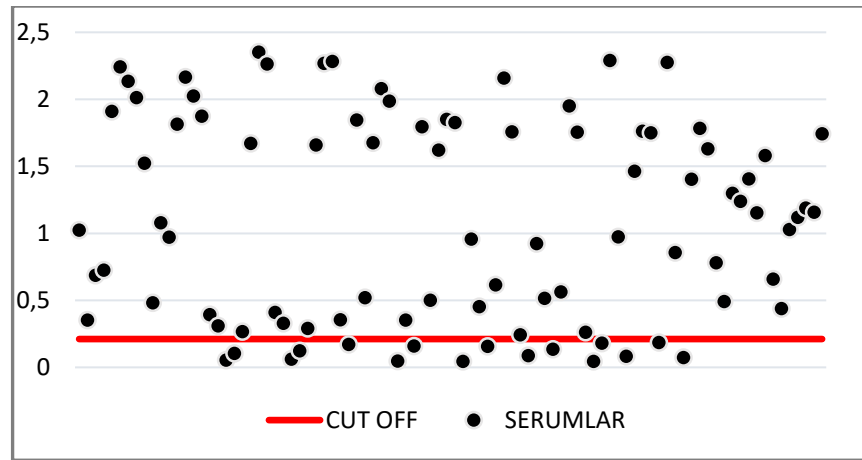
Toplam Serum Sayısı: 92 adet serum

Pozitif Serum Sayısı: 76 adet serum

Negatif Serum Sayısı: 16 adet serum

B çiftliğinde yapılan ELISA'da serumların %82,6'sı pozitif ve %17,4'ü negatif bulundu.

Grafik.2'de test serumlarının OD değerine göre eşik değeri dikkate alınarak elde edilen dağılımı verilmiştir.



Grafik 3.2. B İşletmesi Serum Sonuçlarının OD dağılımları

Tablo 3.5. C İşletmesi ELISA Sonuçları

Numune	0,2677	0,7249	0,833	0,6191	0,7249	0,2681	0,4274	0,4078	0,5105	0,4606	1,0058	0,2398
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% PP	9,405	30,78	35,84	25,83	30,78	9,423	16,87	15,95	20,76	18,42	43,92	8,100
Numune	0,396	0,1822	1,4724	0,6749	1,0729	0,9043	0,8372	1,2298	0,343	0,6071	0,884	1,0891
+/-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PP	15,40	5,406	65,74	28,44	47,06	39,17	36,03	54,39	12,92	25,27	38,22	47,81
Numune	1,5682	0,6717	0,3404	0,5113	1,0121	0,6756	0,5469	0,6227	1,5927	0,3191	0,2524	0,2904
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% PP	70,225	28,29	12,80	20,79	44,21	28,48	22,46	26,00	71,37	11,80	8,689	10,46
Numune	1,5351	1,8349	0,9202	1,0607	1,3758	0,3436	1,0645	0,3547	0,955	0,7365	0,1528	0,5854
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
% PP	68,67	82,69	39,92	46,49	61,22	12,95	46,66	13,47	41,54	31,32	4,031	24,26
Numune	0,374	0,4327	0,9925	1,1737	0,8338	0,7056	0,4281	1,0518	0,5691	0,585	0,6173	0,5822
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% PP	14,37	17,12	43,30	51,77	35,88	29,88	16,90	46,07	23,50	24,24	25,75	24,11
Numune	0,5011	0,6736	0,3809	0,8877	0,4732	0,482	0,8789	0,3187	0,1933	0,8742	2,2442	1,697
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
% PP	20,32	28,38	14,69	38,40	19,01	19,42	37,98	11,79	5,925	37,76	101,8	76,24
Numune	0,425	1,7879	1,4192	1,1465	0,8518	2,2915	0,245	1,4352	1,6102	0,8156	1,3607	1,2075
+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
% PP	16,76	80,50	63,25	50,50	36,72	104,0	8,343	64,00	72,19	35,02	60,52	53,35
Numune							N	N	P	P	BLANK	BLANK
+/-												
% PP												

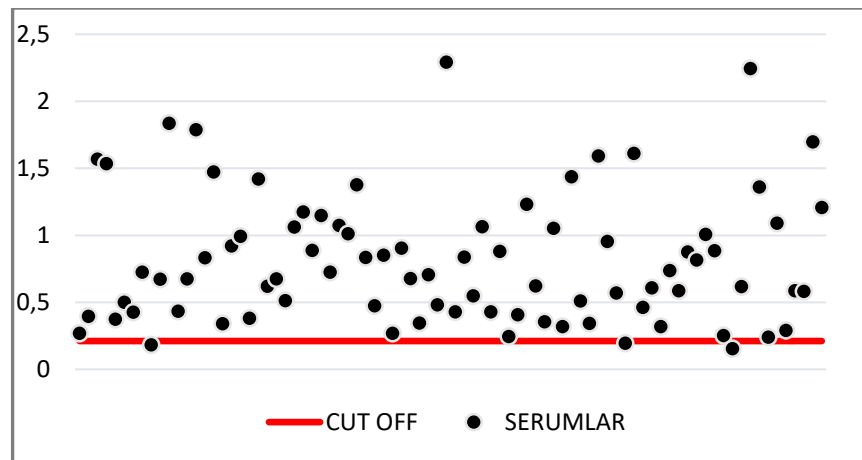
Toplam Serum Sayısı: 88 adet serum

Pozitif Serum Sayısı: 84 adet serum

Negatif Serum Sayısı: 4 adet serum

C çiftliğinde yapılan ELISA'da serumların %95,45'i pozitif ve %4,54'ü negatif bulundu.

Grafik.3'de test serumlarının OD değerine göre eşik değeri dikkate alınarak elde edilen dağılımı verilmiştir.



Grafik 3.3. C İşletmesi Serum Sonuçlarının OD dağılımları

Tablo 3.6. D İşletmesi ELISA Sonuçları

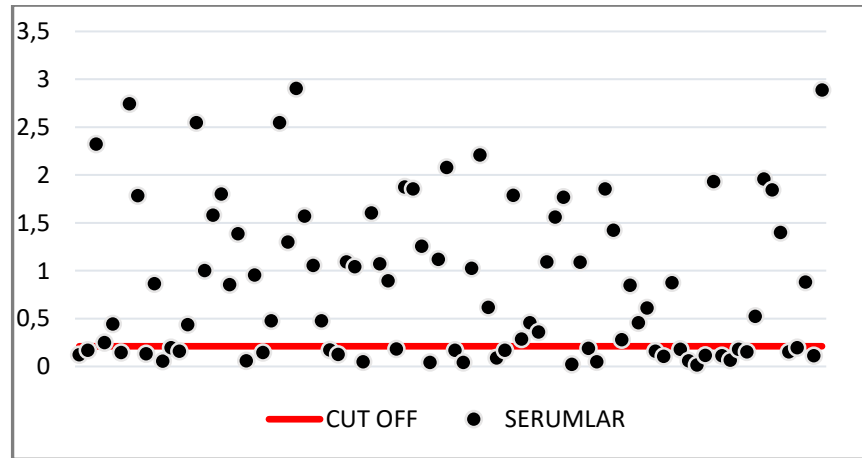
Numune	0,122	0,1322	1,5783	2,5453	1,0913	1,8536	2,2077	0,36	0,0481	0,1582	1,9326	1,8452
+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
% PP	2,591	3,068	70,69	115,9	47,92	83,57	100,1	13,72	-0,86	4,284	87,26	83,18
Numune	0,1678	0,8645	1,7999	1,2988	1,0425	1,255	0,6182	1,0913	1,8536	0,1061	0,1102	1,398
+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
PP	4,733	37,31	81,06	57,62	45,64	55,57	25,79	47,92	83,57	1,847	2,039	62,26
Numune	2,3225	0,055	0,8547	2,9031	0,047	0,043	0,0873	1,56	1,424	0,8755	0,0638	0,1532
+/-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
% PP	105,5	-0,54	36,85	132,6	-0,91	-1,10	0,96	69,8	63,48	37,83	-0,130	4,050
Numune	0,2477	0,1947	1,3848	1,5708	1,6038	1,1172	0,169	1,7657	0,2785	0,1783	0,1777	0,1958
+/-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
% PP	8,469	5,991	61,64	70,34	71,89	49,13	4,789	79,46	9,910	5,224	5,196	6,042
Numune	0,4416	0,1576	0,0587	1,0549	1,0716	2,0786	1,787	0,0199	0,8488	0,0576	0,1515	0,8795
+/-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
% PP	17,53	4,256	-0,36	46,2	47,00	94,09	80,45	-2,183	36,58	-0,420	3,970	38,01
Numune	0,1453	0,4356	0,9535	0,4748	0,8954	0,1699	0,2843	1,0874	0,4572	0,0155	0,5244	0,1118
+/-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
% PP	3,680	17,25	41,47	19,09	38,76	4,831	10,18	47,74	18,26	-2,38	21,4	2,11
Numune	2,7453	2,547	0,1459	0,1719	0,182	0,0421	0,4571	0,1872	0,611	0,1152	1,9571	2,888
+/-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
% PP	125,2	116,0	3,708	4,924	5,397	-1,14	18,26	5,640	25,46	2,273	88,41	131,9
Numune	1,7848	1,0025	0,4752	0,1236	1,8745	1,0244						
+/-	+	+	+	-	+	+	N	N	P	P	BLANK	BLANK
% PP	80,35	43,76	19,10	2,665	84,55	44,79						

Toplam Serum Sayısı: 90 adet serum

Pozitif Serum Sayısı: 58 adet serum

Negatif Serum Sayısı: 32 adet serum

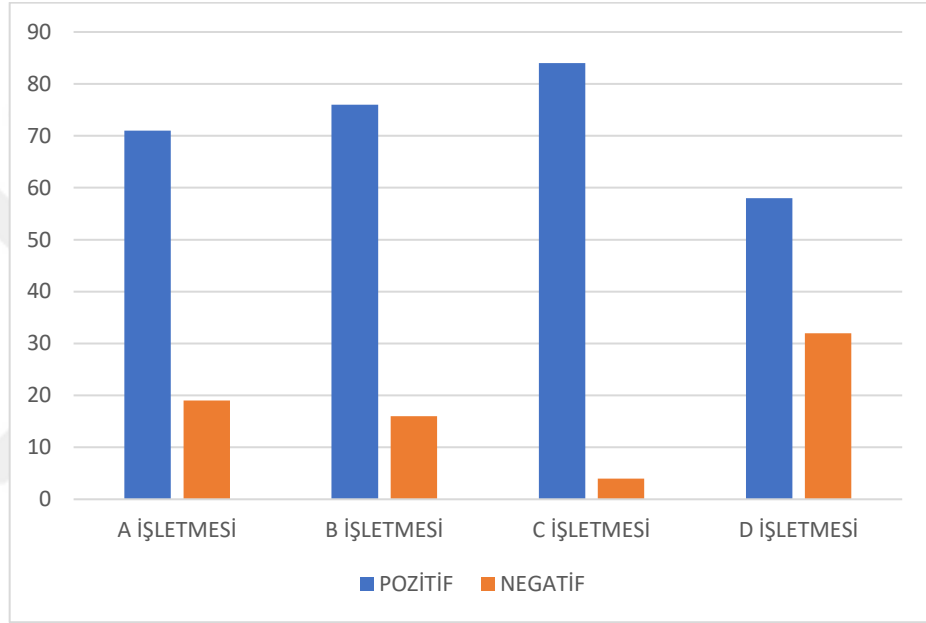
D çiftliğinde yapılan ELISA'da serumların %64,44'ü pozitif ve %35,55'i negatif bulundu. Grafik.4'de test serumlarının OD değerine göre eşik değeri dikkate alınarak elde edilen dağılımı verilmiştir.



Grafik 3.4. D İşletmesi Serum Sonuçlarının OD dağılımları

Tablo 3.7. ELISA Sonuçlarının İşletmelere Göre dağılımı

İşletme adı	A	B	C	D	Toplam
Pozitif serum sayısı ve % oranı	71 %78,9	76 %82,6	84 %95,45	58 %64,44	289 %80,3
Negatif Serum sayısı ve % oranı	19 %21,1	16 %17,4	4 %4,54	32 %35,55	71 %19,7
Toplam Serum Sayısı	90	92	88	90	360



Grafik 3.5. ELISA Sonuçlarının İşletmeler Arası Dağılımı

Bu sonuçlara göre test edilen 360 adet serumdan 289 (%80,3) adedi pozitif, 71 (%19,7) adedi ise negatif olarak değerlendirildi.

4. TARTIŞMA

Sığırlarda ringworm olarak bilinen dermatofitozisin en yaygın olarak görülen etkeni zoofilik bir dermatofit olan *T. verrucosum*'dur. *T. verrucosum*'un buzağılarda en önemli morbidite faktörlerinden biri olduğu bildirilmiş olmasının yanı sıra, koyun, keçi ve atlarda da enfeksiyon oluşturur. Sığırlardaki trichophytosis aynı zamanda insanlara zoonotik geçişi nedeniyle önem taşır. Bugüne kadar, sığırlarda trichophytosis'e karşı immün yanıtın değerlendirilmesine yönelik az sayıda çalışma yapılmıştır. Deneysel enfeksiyonlar veya aşılama çalışmalarından sonra hem humoral, hem de hücre sel yanıtı değerlendiren birkaç çalışma bulunmaktadır. Dermatofitozis olgularında vücutta antikor yanıtının gelişimi, hastalığın tanısında serolojik teşhisi kullanma imkan sağlar. Ulaşılabilen literatür verilerine göre, hayvanlarda dermatofitozis olgularında antikor yanıtlarının değerlendirilmesi için ELISA teknikleri geliştirilmiştir, ancak sığırlarda *T. verrucosum* tanısı amacıyla spesifik antikorların saptanmasına yönelik çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Zrimsek ve ark. (47) *Trichophyton mentagrophytes* ile enfekte tavşanlarda tanıs al potansiyelini değerlendirmek amacıyla bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar *T. mentagrophytes* ile enfekte olmuş tavşanlarda ELISA ile humoral yanıtın değerlendirilmesinin, standart yöntemlerden daha erken ve daha uygun bir dermatofitoz teşhisine katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Zrimsek ve Drobnic-Kosorok (47), kedilerde ve tavşanlarda *Microsporum canis* ve *T. mentagrophytes*'e karşı oluşan spesifik IgG yanıtının saptanması için iki indirekt ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Bu amaçla enfekte 20 kedi ve 25 tavşana ait serum örneğini test etmişlerdir. Araştırmacılar tavşanlarda ELISA ile mevcut klasik teşhis yöntemlerine göre daha erken ve uygun teşhis sağladığını, kedilerde spesifik antikorların saptanması ile de doğru tedaviye çok erken başlamanın mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

Brouta ve ark. (48), *M. canis* majör fungal antijenlerini saptamaya yönelik olarak çalışmada ELISA ile humoral yanıtı ölçmüşler ve antijenleri başarı ile tespit etmişlerdir.

Peano ve ark. (49), köpeklerde *M. canis* tarafından oluşturulan dermatofitozislerin teşhisi için geliştirdikleri ELISA'nın duyarlılığını %83,3, özgüllüğünü %95,2 olarak bildirmişler ve testin duyarlılığının direkt mikroskopi ve kültür tekniklerinden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Zahran ve Abdeen (38), hazırladıkları *T. verrucosum* aşısının tavşanlarda deneysel olarak araştırılması için humoral immün yanıtı değerlendirmek için ELISA'dan yararlanmışlardır.

Santana ve ark. (50) semptomatik ve asemptomatik dermatofitozisli kedilerde serolojik tanı için bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar geliştirdikleri testin duyarlılığını %94 bulurken özgüllüğü %75 olarak hesaplamışlardır.

Elad ve Segal (43) yapmış oldukları aşılama çalışmasında oluşan humoral yanıtın değerlendirilmesi için ELISA tekniğini kullanmışlar ve aşılama ile hücresel immün yanıt yanında humoral yanıtın da uyarıldığını bildirmişlerdir.

Mikaili ve ark. (44) sığırlarda canlı *T. verrucosum* ile immunizasyon sonucunda oluşan antikorların saptanması amacıyla ELISA tekniği kullanmışlar ve immunizasyon yapılan hayvanların serum OD değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bagut ve ark. (39), sığırlarda *T. verrucosum* tarafından oluşturulan dermatofitozislerin teşhisi amacıyla bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar bu amaçla *T. verrucosum*'a %98 yapısal benzerlik gösteren *Trichophyton rubrum*'a ait iki rekombinant antijen kullanmışlardır. Trichophytosisli olduklarını direkt mikroskopi, floresan mikroskopi ve PCR ile doğruladıkları 135 sığırdan aldıkları serum örnekleri ile hastalık geçmişi bulunmayan ve herhangi bir deri lezyonu taşımayan 55 sığır serumunu kontrol serumu olarak kullanmışlardır. Kullanmış oldukları bir antijenle yapılan ELISA'nın duyarlılığını %89,6, özgüllüğünü %92,7 bulurken, ikinci antijen için özgüllük %96,8, özgüllük %78,4 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bu sonuçlara göre geliştirdikleri ELISA tekniğinin epidemiyolojik çalışmalarda, aşılama veya aşılama yöntemlerinin sonuçlarını değerlendirmede kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada otoklavlanmış etken ile hazırlanmış antijen ile yapılan ELISA'da duyarlılık %95,24, özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlar araştırmacıların bildirdiği oranlara kısmen yakın olsa da özellikle özgüllük belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Bunun da negatif kontrol serumu olarak kullanılan serum örneklerinden veya antijenin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sığırlarda iklim, mevsim, yaş gibi faktörlere bağlı olarak çiftlikten çiftliğe değişiklik göstermekle beraber çiftliklerde trichophytosis prevalansı araştırmacılar tarafından %10-100 arasında bildirilmektedir (25). Bu çalışmada işletmelere göre

pozitiflik oranı %58-84 arasında saptanırken genel olarak incelen 360 adet serumdan 289 (%80,3) adedi pozitif, 71 (%19,7) adedi ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitiflik oranının yüksek seviyelerde olmasının nedeni incelenen serum örneklerinin etken izolasyonu yapılarak trichophytosis olduğu doğrulanan sürülerden toplanmış olması, hayvanların bir yaşın altında olması ve bölge ikliminin hastalık çıkışına yatkın olması gibi etkenlere bağlı olduğu düşünülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, sığırlarda trichophytosisin serolojik teşhisi için bir ELISA geliştirmenin amaçlandığı bu çalışmada duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek seviyede bir ELISA tekniği oluşturulmuştur. Geliştirilen bu ELISA ile hastalıklı sürülerden alınan serumların incelenmesi ile işletmelerde trichophytosis pozitifliğinin oldukça yüksek olduğu saptanmıştır.

Trichophytosis sürülerde yaygın olarak bulunduğunda sürü performansını düşürmekte, tedavi ve deri hasarları nedeniyle ekonomik kayıplara yol açmakta, ancak buzağılarda ölümler de oluşturabilmektedir. Bu nedenle gerek şüpheli durumlarda hastaların tespiti, gerekse epidemiyolojik çalışmalar amacıyla ELISA ile seropozitifliğin saptanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca etkenin zoonoz özelliği de göz önüne alınırsa, sürü ile bağlantılı kişiler için bir risk taşıyan hasta hayvanların erken teşhisi ve tedavisi gerek hayvan sağlığı, gerekse insan sağlığı açısından oldukça önemlidir.

Erken tedavi ile hastalığın neden olduğu yanlış tedavi giderleri, performans kayıpları gibi ekonomik kayıplara yol açan birçok faktör de etkisiz hale getirilebilecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. Ankara: Medisan Yayınevi; 2000. 2. Baskı. s.315-367.
2. Manzi P, Pizzoferrato L. Beta-glucans in edible mushrooms. Food Chemistry. 2000; 68: 315-318.
3. Tel OY. Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu [Doktora Tezi]. Ankara. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2005.
4. Kaşık G. Mantar Bilimi. Konya: Selçuk Üniversitesi. 2010; 1. Baskı.
5. Biberstein EL, Hirsh DC. Dermatophytes. In: Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RL, eds. Veterinary Microbiology. Oxford: Blackwell Publishing Co, 2004; 273-284.
6. Abdul-Elteen KH and Malek MA. Prevalence of dermatophytoses in the Zarqa district of Jordan. Mycopathologia 1999; 145: 137-142.
7. Male O. The significance of mycology in medicine. In: Hawksworth DL, ed. Frontiers in Mycology. Wallingford: CAB International 1990. 131-156.
8. White TC. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. American Society for Microbiology. 2008; 8: 1238-1244.
9. Simpanya MF. Dermatophytes: Their taxonomy, Ecology and pathogenicity. In: Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi. Ed.: Kushwaha R.K.S, Guarro J. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología 2000.
10. Deacon JW. Introduction to modern mycology, 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1988: 1-239.
11. Tümbay E. Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 1015-1159.
12. Placzek M, Heuvel ME, Flaig MJ, Korting HC. Perniosis-liketinea corporis caused by *Trichophyton verrucosum* in coldexposed individuals. Mycoses 2006. 49:476-479.
13. Chermette R, Ferreiro L, Guillot J. Dermatophytosis in animals. Mycopathologia 2008. 166(5- 6):385-4050.
14. Bar M. Traumatische und pilzbedingte Hautlasionen beim Rind und ihre Abheilung im Hinblick auf Lederschaden (Inaugural Dissertation). Switzerland, Zurich: University of Zurich 1986. 55.
15. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses 2008. 51 (Suppl. 4):2-15.
16. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. Clin. Dermatol 2010. 28: 197-201.

17. Carlsson J. Risken for ringorm hos notkreatur och miinniska. *Sven Vet Tidn* 1993; 45: 467-471.
18. Haab C. *Epidemiologie der Trichophytie beim Mastkalb (Inaugural Dissertation)*. Switzerland, Zurich: University of Zurich 1991. 77.
19. Morrell J, Stratman E. Primary Care and Specialty Care Delays in Diagnosing Infection Related to Cattle Exposure. *Journal of Agromedicine* 2011; 16(4): 244-250.
20. Davidov I, Radinovic M, Kovacevic Z, Erdeljan M, Galfi A, Ilić S. Trichophytosis In Beef Cattle. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* 2018; 18(2): 428-445.
21. Maslen MM. Human cases of cattle ringworm due to *Trichophyton verrucosum* in Victoria, Australia. *Aust J Dermatol* 2000; 41:90-94.
22. Rogožarski D, Bojkovski J, Relić R, Savić B, Pavlović I. Contribution to knowledge trichophytia by cattle. *Bulltein UASVM Cluj-Napoca Symposiums, The 11th International Symposium "Prospects for the 3rd millennium agriculture, Veterinary Medicine* 2012. 69 (1-2): 428-430.
23. O’Gorman SM, Britton D, Collins P. An uncommon dermatophyte infection: two cases of cutaneous infection with *Trichophyton verrucosum*. *Clinical and Experimental Dermatology* 2015. 40(4): 395–398.
24. Seebacher C, Bouchara J-Ph, Mignon B. Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. *Mycopathologia* 2008. 166(5-6): 335–352.
25. Papini R, Nadoni S, Fanelli A, Mancianti F. High Infection Rate of *Trichophyton verrucosum* in Calves from Central Italy. *Zoonoses and Public Health* 2009. 56(2): 59–64.
26. Tainwala R, Sharma YK. Pathogenesis Of Dermatophytoses. *Indian J Dermatol*. 2011 May-Jun 56(3): 259–261.
27. Rippon JW. 3rd edn. Philadelphia: Saunders; 1988. *Medical Mycology: The pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes* 1988. pp. 140–275.
28. Weber A. Mycozoonoses with special regard to ringworm of cattle. *Mycoses, Suppl* 1 2000. 43:20-22.
29. Sayfarth F, Roediger C, Graser Y, Erhard M, Burmester A, Elsner P, et al. Case report: *Trichophyton verrucosum* infection after needlestick injury with an attenuated live vaccine against cattle ringworm. *Mycoses* 2011. 54(6): 870–876.
30. Radostits OM, Gay CC, Blood CD, Hinchcliff KW. *Veterinary Medicine, a text book of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9th ed. New York 2000. 55(2):343-344.

31. Çenesiz S, Cevat N, Yarım GF, Arslan HH, Çiftçi A. Trikofitozisli ineklerde serum adenozin deaminaz aktivitesi (ADA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2007. 54:155-158.
32. Wawrzkievicz K. Culture of *Trichophyton verrucosum* in a liquid medium. Institute of Infectious Diseases, Veterinary Faculty, Lublin, Poland.
33. Gökçe G, Şahin M, Irmak K, Otlu S, Aydın F, Genç O. Sığır Trichophytosis'inde Profilaktif ve Terapötik Amaçla Aşı Kullanımı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1999. 5(1):81-86.
34. Rybníkár A, Oborilova E. Clinical assessment of postinfection, postcontact and postvaccination immunity manifestation after experimental inoculation of calves with *Trichophyton verrucosum* culture. Mycoses 2007. 51:236–242.
35. Takatori KA, Takahashi S, Kawai S, Ichijo and AHasegawa. Isolation of *Trichophyton verrucosum* from lesional and non-lesional skin in calves. J. Vet. Med. Sci 1993. 55: 343-344.
36. Kocik T. Evaluation of the immunogenic properties of live and killed vaccines against trichophytosis of guinea pigs and calves (in Polish). Pol. Arch. Weter 1982. 23:95-97.
37. Bos JD, Kapsenburg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. Immunol. Today 1993. 14: 75-78.
38. Zahran RN, Eman AA. Evaluation Of The Immune Response To *T. verrucosum* Vaccines. American Journal of Immunology 2013. 9 (4): 139-147.
39. Bağrı ET, Cambier L, Heinen MP, Cozma V, Monod M, Mignon B. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Ringworm Infection in Cattle. Clinical and Vaccine Immunology 2013. 20(8):1150-1154.
40. Zrimsek P, Kos J, Pinter L, Drobnic-Kosorok M. Detection by ELISA of the humoral immuneresponse in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*, Vet Microbiolog 1999 Oct. 70(1-2):77-86.
41. Gudding R, Lund A. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. Can. Vet. J 1995. 36:302-306.
42. Kane J, Smitka C. Early Detection and Identification of *Trichophyton verrucosum* 1978; 8(6):740-7.
43. Elad D, Segal E. Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial vaccine, Vol. 13 1995. No. 1, pp.3-87.
44. Mikaili A, Chabili M, Ghashghaie A, Mostafaie A. Immunization against bovine dermatophytosis with live *Trichophyton verrucosum*. African Journal of Microbiology Research 2012, 6(23): pp. 4950-4953.

45. Kiraz M. Dermatofitlerin tür tanısı ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Doktora tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;1988.
46. Thomas JW, Hayden RT, Larone DH. Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification 2018. 6: 270-280.
47. Zrimsek P, Drobnic-Kosorok M. Diagnostic Value of ELISA Tests for the Detection of Specific Antibodies in Cats and Rabbits with Dermatophytosis. Biotechnol 2002, 40(3):171-175.
48. Brouta F, Descamps F, Vermout S, Monodi M, Losson B. Humoral and cellular immune response to a *Microsporum canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs. Medical Mycology 2003.41:495-501.
49. Peano A, Rambozzi L, Gallo MG. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of canine dermatophytosis caused by *Microsporum canis*. Veteriner Dermatology 2005.16:102-107.
50. Santana AE, Taborda CP, Severo JS, Rittner GMG, Munoz JE, Larsson Jr CE. Development of enzyme immunoassays (ELISA and Western blot) for the serological diagnosis of dermatophytosis in symptomatic and asymptomatic cats. Medical Mycology 2018. 56:95-102.

7. EKLER

7.1 Etik Kurul



Sayı : 2016/35
Konu : Yerel Etik Kurul Kararı

23/11/2016

DOLLVET A.Ş.
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(DOLLVET-HADYEK)

Sayın: Hülya KAPLAN

19.11.2016 tarihinde kurulumuza yapmış olduğunuz “Sığır Trichophytosis’in Teşhisinde ELISA’nın Kullanılabilirliğinin Araştırılması” isimli HÜBAK projenizde yapacağınız hayvan denemeleri kurulumuza taahhülle bulunduğunuz çerçevede dâhilinde olması şartı ile uygun bulunmuştur.

Dr. Hüseyin ZENGİN
Sorumlu Yönetici

Ek:
• Karar onayı

DOLLVET A.Ş.
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DOLLVET-HADYEK)

Karar No : 2016/35
Konu : Yerel Etik Kurul Kararı

19.11.2016 tarihinde kurulumuza yapmış olduğunuz “Sığır Trichophytosis’in Teşhisinde ELISA’nın Kullanılabilirliğinin Araştırılması” isimli HÜBAK projenizde yapacağınız hayvan denemeleri kurulumuza taahhülle bulunduğunuz çerçevede dâhilinde olması şartı ile uygun bulunmuştur.

Yapılan başvuru formunun incelenmesi sonucu çalışmanın uygun olduğu görüşüne oy birliğince karar verilmiştir.

Dr. Hüseyin ZENGİN
Sorumlu Yönetici

Hülya KAPLAN
Veteriner Hekim
Deney Hayvan Üretim ve
Araştırma Laboratuvarı
Sorumlusu

Dr. Nilay ÜNAL
Veteriner Hekim
Kalite Güvence Birimi
Sorumlusu

Cahit BAYBURS
Veteriner Hekim
Üretim Sorumlusu

Müzeyyen KENDİRCİ
Veteriner Hekim
Kalite Kontrol Birimi
Sorumlusu

Rojda KIZILTAŞ
Veteriner Hekim
Hayvan Refahı Birimi
Sorumlusu

İbrahim YAŞAR
Biyolog
Bakteriyel Aşılarda Üretim
Laboratuvarı

Ramazan ABNİOĞLU
Biyolog
Paraziter Aşılarda Üretim
Laboratuvarı Sorumlusu

Ahmet Özgür YAHLİZADE
Veteriner Hekim
Damızlık Sığır Yetiştiricileri
Birliği Üyesi
Sivil Üye (T.C. Vatandaşı)

Aziz YALÇIN
Veteriner Hekim
Süt Üreticileri Birliği Üyesi
Sivil Üye (T.C. Vatandaşı)

7.2 Orijinallik Raporu

SIĞIRLARDA TRICHOPHYTOSIS'İN TEŞHİSİNDE ELISA'NIN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Yazar Hülya Kaplan

Gönderim Tarihi: 31-May-2019 12:20AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1138026320

Dosya adı: h_lya_TURNITIN.docx (8.83M)

Kelime sayısı: 6373

Karakter sayısı: 41751

SİĞİRLARDA TRICHOPHYTOSIS'İN TEŞHİSİNDE ELISA'NIN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 6	% 2	% 8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Harran Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 3
2	Submitted to Adnan Menderes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 2
3	12-7-8.pdfnias.go.kr İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	% 1
5	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
6	www.tru-fit.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.learningace.com İnternet Kaynağı	<% 1

9	Veterinary Mycology, 2015. Yayın	<% 1
10	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
11	pharmacy.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
12	Submitted to Cardiff University Öğrenci Ödevi	<% 1
13	infeksiyon.dergisi.org İnternet Kaynağı	<% 1
14	J.L. Richard, M.C. Debey, R. Chermette, A.C. Pier, A. Hasegawa, A. Lund, A.M. Bratberg, A.A. Padhye, M.D. Connole. "Advances in veterinary mycology", Medical Mycology, 1994 Yayın	<% 1
15	krishikosh.egranth.ac.in İnternet Kaynağı	<% 1
16	ERMAN, Erdem and KÜÇÜK, Fahrettin. "Korkuteli (Antalya)'deki Alabalık İşletmelerinin Ekonomik Analizi", Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 2017. Yayın	<% 1
17	en.bio-protocol.org İnternet Kaynağı	<% 1

18 ÇAKIROĞLU, Yiğit, DOĞER, Emek, KOPUK YILDIRIM, Şule, ÖZCAN, Canan, NALBANT, Betül, ÇORAKÇI, Aydın and YÜCESOY, İzzet. "Prediction of tumor grade and stage in endometrial carcinoma by preoperative assessment of sonographic endometrial thickness: Is it possible?", Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği, 2014.
Yayın

<% 1

19 Submitted to TechKnowledge Turkey
Öğrenci Ödevi

<% 1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

7.3 Orijinallik Raporu ve Beyan Belgesi



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

Öğrencinin	
Numarası	:1553260003
Adı, Soyadı	:Hülya KAPLAN
Anabilim Dalı (Bölümü)	:Veteriner Mikrobiyoloji
Programı	: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
Tezin Adı	: Sığırlarda Trichophytosis'in Teşhisinde ELISA'nın Kullanılabilirliğinin Araştırılması

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen yüksek lisans tez çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 52 sayfalık kısmına ilişkin, 31/05/2019 tarihinde şahsım/danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı % 10'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orijinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntılarım bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden her hangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 31/05/2019

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı-Soyadı: Hülya KAPLAN

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 31/05/2019

Danışmanın

Unvanı-Adı-Soyadı: Prof. Dr. Oktay KESKİN

İmzası:

7.4 Tez Veri Giriş Formu

26.08.2019

Ulusal Tez Merkezi | Tez Form Yazdır

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10283933
Yazar Adı / Soyadı	HÜLYA KAPLAN
T.C.Kimlik No	16229887384
Telefon	5423731959
E-Posta	h.kaplan.dollvet@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	SİĞİRLARDA TRICHOPHYTOSIS'İN TEŞHİSİNDE ELISA'NIN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI
Tezin Tercümesi	EVALUATION OF USAGE ELISA FOR DIAGNOSIS IN CATTLE TRICHOPHYTOSIS
Konu	Veteriner Hekimliği = Veterinary Medicine
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	54
Tez Danışmanları	PROF. DR. OKTAY KESKİN
Dizin Terimleri	Enzime bağlı immünosorbent testi=Enzyme-linked immunosorbent assay
Önerilen Dizin Terimleri	ELISA, Trichophyton verucosum, Trichophytosis.

26.08.2019

İmza: 