

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOYUNLARDA CORYNEBACTERIUM
PSEUDOTUBERCULOSIS'İN ELISA VE DOT - BLOT ELISA
İLE TEŞHİSİ**

**Veteriner Hekim
Ziya İLHAN**

108136

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

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

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Müjgan İZGÜR**

108136

2001-ANKARA

KABUL VE ONAY YAZISI

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

Tez Savunma Tarihi: 11. 07. 2001



Prof. Dr. Nejat AYDIN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Şenay BERKİN
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Müjgan İZGÜR
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Banur BOYNUKARA
Yüzüncü Yıl Üniversitesi



Doç. Dr. Mehmet AKAN
Ankara Üniversitesi

ÖNSÖZ

Koyun ve keçi yetiştiriciliği dünyanın birçok ülkesinde önem taşıyan bir sektör olarak günümüzde de önemini korumaktadır. Türkiye yaklaşık olarak 32 milyon koyun ve 9 milyon keçi varlığı ile Avrupa ülkeleri arasında ön sıralarda yer almaktadır. Sayısı ve damızlık yönü dikkate alındığında, Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne bağlı çiftliklerde yetiştirilen koyunların, ülke ekonomisi bakımından oldukça önemli roller üstlendiği görülmektedir.

Küçük ruminant yetiştiriciliği, dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de bir çok sorunla karşı karşıya bulunmaktadır. Özellikle infeksiyöz hastalıklar, bu sektörde oldukça ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır.

Kazeöz lenfadenitis koyun ve keçilerde; döl veriminde azalmaya, deri kalitesinde bozulmaya, ileri derecede zayıflamaya neden olmasından dolayı et veriminde düşmeye ve bazen de genç hayvanlarda ölümlere yol açmaktadır. Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde infeksiyonun koyun yetiştiriciliğine verdiği ekonomik zararlar daha iyi anlaşılabilir. Avustralya'da pseudotuberkulosisden kaynaklanan yıllık ekonomik kaybın yaklaşık 20 milyon dolar olduğu, ABD'de ise ekonomik kayıp açısından üçüncü önemli infeksiyon olduğu bildirilmektedir. İnfeksiyonun Türkiye ekonomisine verdiği ekonomik zararın miktarına ait herhangi bir yazılı bildirim rastlanılmamasına rağmen, ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda belli bölgelerde hastalığın yaygın olduğunun vurgulanmış olması, infeksiyondan kaynaklanan ekonomik kaybın hiç de az olmadığını düşündürmektedir.

Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis* infeksiyonunun teşhisi; klinik belirtiler, nekropsi bulguları ve laboratuvar muayenelerini içermektedir. Kronik bir infeksiyon olan pseudotuberkulosisin teşhisinde, klinik olarak görülebilen semptomların az ve non-spesifik olması, hastalığın tanısında birçok infeksiyöz hastalıkta olduğu gibi, direkt ve indirekt yöntemlerin uygulanmasını zorunlu kılmaktadır.

Kazeöz lenfadenitisin direkt teşhisinde materyal olarak genellikle, apse cidarından alınan svab örnekleri ile nekropsi sonrasında alınan apseli dokular kullanılmakta, izolasyon ve identifikasyon ise yaklaşık 1-2 haftada yapılabilmektedir. *C. pseudotuberculosis* uzun süre dış ortamda canlılığını koruduğu için, materyal alımı esnasında açılan apselerden dışarı çıkan etken diğer hayvanlara da bulaşabilmektedir. Böylece, özellikle yoğun yetiştiriciliğin yapıldığı işletmelerde bulaşma çok daha fazla olabilmektedir. Daha az bulaşma riski taşınması ve direkt teşhise göre daha kısa sürede sonuç vermesi bakımından bir çok serolojik test, hastalığın teşhisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır.

Kazeöz lenfadenitisin indirekt teşhisinde çeşitli primer ve sekonder bağlanma testleri kullanılmaktadır. Sekonder bağlanma testlerinin çoğu, sadece *C. pseudotuberculosis*'in ekzotoksinine karşı oluşan antikorları saptamaya yöneliktir. Ayrıca bu testlerin özgüllük ve duyarlılıklarının da düşük olduğu bildirilmektedir. Pseudotuberculosisle ilgili çalışmalarda, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) teknikleri yaklaşık 20 yıldan beri kullanılmaktadır. *C. pseudotuberculosis*'in ekzotoksini ve somatik antijenlerine karşı oluşan antikorlar; ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA teknikleri ile saptanabilmektedir. Hastalığın teşhisinde ticari ELISA kitlerinin bulunmaması nedeniyle, ELISA reagentleri rutin laboratuvarlarda hazırlanmakta ve standardize edilmektedir.

Bu çalışmada, koyunlarda *C. pseudotuberculosis* infeksiyonunun serolojik tanısında; ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinin standardizasyonları yapılarak, bu tekniklerin etkene karşı oluşan antikorların saptanmasında uygulanabilirlikleri araştırıldı.

Tez çalışmamın yürütülmesinde başta doktora danışmanlığımı üstlenen sayın Prof. Dr. Müjgan İzgür ile araştırmamın gerçekleştirilmesinde yardım ve ilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet Akan olmak üzere, A. Ü. Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve personeline, bana Ankara’da doktora yapma olanağı veren Y. Y. Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tez izleme komitesinde yol gösteren A. Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Şenay Berkin’e, materyallerin toplanmasında yardımcı olan A. D. Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Fatma Sayın ile Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü yetkililerine teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Tablo Listesi	ix
Resim Listesi	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Tanım	1
1.2. Tarihçe	1
1.3. Etiyoloji	2
1.4. Epizootiyoloji	5
1.5. Patogenezis	7
1.6. Semptomlar	10
1.7. Teşhis	12
1.7.1. Klinik Teşhis	12
1.7.2. Nekropsi Bulguları	13
1.7.3. Laboratuvar Teşhisi	13
1.7.3.1. Bakteriyoskopi	14
1.7.3.2. Kültür	14
1.7.3.3. Hayvan Deneyi	14
1.7.3.4. Allerjik Testler	14
1.7.3.5. Serolojik Testler	15
1.8. Sağaltım	23
1.9. Koruma	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Serumlar	28
2.1.1. Test Serumları	28
2.1.2. Kontrol Serumları	28
2.2. İzolasyon Materyali	28
2.3. Besiyerleri	29
2.4. Solusyon ve Tampon Sıvılar	29
2.5. Konjugat	29
2.6. Substrat	30
2.7. Durdurma Solusyonu	30
2.8. Ekzotoksin ve Sonike ELISA Teçhizatı	30
2.8.1. Pipet ve Mikropleytler	30
2.8.2. ELISA Okuyucusu	30
2.9. Dot-blot ELISA Teçhizatı	30

2.9.1. Nitrosetuloz Membran (NCM)	30
2.9.2. Plastik Pleyt, Pipet ve Ependorf Tüp	30
2.10. ELISA Antijenlerinin Hazırlanması	31
2.11. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
2.11.1. Ekzotoksin ve Sonike ELISA'ların Standardizasyonu	32
2.11.2. Ekzotoksin ve Sonike ELISA'ların Uygulanması	32
2.12. Dot-blot ELISA	33
2.12.1. Dot-blot ELISA'nın Standardizasyonu	33
2.12.2. Dot-blot ELISA'nın Uygulanması	33
2.13. İstatistiksel Değerlendirme	34
2.14. İzolasyon ve İdentifikasyon	35
3. BULGULAR	36
3.1. Ekzotoksin ve Sonike ELISA Sonuçları	36
3.1.1. Antijen Titrasyonu	36
3.1.2. Optimal Serum Dilasyonu	36
3.1.3. Konjugat Titrasyonu	36
3.1.4. Negatiflik Eğiğinin Belirlenmesi	36
3.2. Dot-blot ELISA Sonuçları	36
3.2.1. Antijen Titrasyonu	36
3.2.2. Serum Sulandırma	37
3.2.3. Konjugat Sulandırma	37
3.3. Test Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirme	37
3.4. İzolasyon Sonuçları	41
3.4. Doğrulama Çalışması	42
4. TARTIŞMA	43
5. SONUÇ	52
ÖZET	53
SUMMARY	54
KAYNAKLAR	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

AHI	Anti Hemoliz İnhibisyon
cfu	Colony forming unit
CMNR	Corynebacteria Mycobacteria Nocardia Rhodococci
HIT	Hemoliz İnhibisyon Test
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ID	İmmunodifüzyon
IHA	İndirekt Hemaglütinasyon
kDa	Kilodalton
KF	Komplement Fiksasyon
KLA	Kazeöz Lenfadenitis
NCM	Nitroseluloz Membran
OD	Optik Dansite
PLD	Fosfolipaz D
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIEF	Recycling Isoelectric Focusing
SD	Standart Deviation
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Gel Elektroferezis
SHI	Sinerjik Hemoliz İnhibisyon
TNF	Tümör Nekrozis Faktör

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: Çalışmada Kullanılan Serum Sayıları ve Orijinleri	28
Tablo-2: İncelenen 471 Adet Koyun Kan Serumunda <i>C. pseudotuberculosis</i> 'e Karşı Oluşan Antikorların Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA ile Elde Edilen Toplu Sonuç ve Oranları (%)	37
Tablo-3: Aşısız 371 Adet Koyun Kan serumunda <i>C. pseudotuberculosis</i> 'e Karşı Oluşan Antikorların Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA ile Elde Edilen Sonuç ve Oranları (%)	38
Tablo-4: Aşılı 100 Adet Koyun Kan Serumunda <i>C. pseudotuberculosis</i> 'e Karşı Oluşan Antikorların Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA ile Elde Edilen Sonuç ve Oranları (%)	38
Tablo-5: Polatlı Tarım İşletmesine Ait 340 Adet Koyun Kan Serumunda <i>C. pseudotuberculosis</i> 'e Karşı Oluşan Antikorların Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA ile Elde Edilen Sonuç ve Oranları (%)	39
Tablo-6: Altınova Tarım İşletmesinden Sağlanan 15 Adet Koyun Kan Serumunda <i>C. pseudotuberculosis</i> 'e Karşı Oluşan Antikorların Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA ile Elde Edilen Sonuç ve Oranları (%)	39
Tablo-7: Test Serumlarının Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA ile <i>C. pseudotuberculosis</i> Antikorları Yönünden İşletmelere Göre Pozitif Bulunan Serum Oranları (%)	40
Tablo-8: Koyun Kan Serumlarında Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA ile Elde Edilen Sonuçların İşletmeler Açısından Toplu Olarak Değerlendirilmesi	40
Tablo-9: TİGEM'e Bağlı İşletmelerden Sağlanan, Aşılı ve Aşısız Koyunlarda <i>C. pseudotuberculosis</i> Antikorlarının Tespiti Yönünden Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA Arasındaki Karşılaştırmalı Sonuçlar	41
Tablo-10: Koyunlarda <i>C. pseudotuberculosis</i> Antikorlarının Tespitinde; Ekzotoksin ELISA, Sonike ELISA ve Dot-blot ELISA Tekniklerinin Sensitivite (SN)/Spesifite (SP) Ölçüleri	42

RESİM LİSTESİ

Resim-1: Pozitif ve Negatif Serumların Dot-blot ELISA'da Ortofenilendiamin ile Göstermiş Olduğu Reaksiyon 34



1. GİRİŞ

1.1. Tanım

Kazeöz lenfadenitis (KLA, pseudotuberculosis) koyun ve keçilerde *Corynebacterium pseudotuberculosis* tarafından oluşturulan, özellikle lenf yumruları ve akciğerler başta olmak üzere diğer iç organlarda da kapsüllü apselerin oluşumu ile karakterize kronik bir enfeksiyondur (Stoops ve ark., 1984; Batey ve ark., 1986; Brown ve Olander, 1987; Pepin ve ark., 1988).

Tüm dünyada yaygın olarak görülen KLA, et ve yapağı veriminin miktar ve kalite bakımından düşmesine, fertilitenin azalmasına ve nadiren de olsa ölümlere sebep olması bakımından ekonomik önemi fazla olan bir enfeksiyondur (Batey ve ark., 1986; Holstad, 1986a; Alanso ve ark., 1992; Ter Laak ve ark., 1992). Örneğin, Avustralya'da prevalensi en yüksek enfeksiyonlardan biri olan (% 50-54) pseudotuberculosisden kaynaklanan yıllık ekonomik kaybın yaklaşık 20 milyon dolar olduğu (Eggleton ve ark., 1991a; Paton ve ark., 1991; Sutherland ve ark., 1992; Simmons ve ark., 1997), ABD'de ise ekonomik kayıp açısından üçüncü önemli enfeksiyon olduğu (Maddy, 1953; Rizvi ve ark., 1997) bildirilmiştir.

1.2 . Tarihçe

C. pseudotuberculosis'e benzeyen bir bakteriyi ilk kez 1888 yılında Fransız Veteriner Hekim Edmond Isidore Etienne Nocard, lenfadenitisli bir sığırdan izole etmiştir. Üç yıl sonra Budapeşte'de Hugo Von Preisz, bir koyunun böbrek absesinden benzer bakteriyi izole etmiş, daha sonra bu bakteri Preisz-Nocard Basili olarak isimlendirilmiştir. Preisz, 1894 yılında etkeni detaylı şekilde tanımlayarak *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* olarak, Buchanan 1911 yılında *Bacillus pseudotuberculosis* şeklinde ve 1918 yılında Ebersson ise bakterinin difteroid morfolojisini de göstererek *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Preisz) Ebersson şeklinde adlandırmışlardır. Bergey ve arkadaşları tarafından 1923 yılında etken

Corynebacterium ovis, 1948 yılında da aynı bilim adamlarının ortak görüşü ile *Corynebacterium pseudotuberculosis* olarak isimlendirilmiştir. Günümüzde Preisz-Nocard Basili, *C. ovis* şeklinde de adlandırılmasına rağmen, yaygın olarak kabul edilen isimlendirme *C. pseudotuberculosis*'dir (Jones ve Collins, 1986; Brown ve Olander, 1987; Arda ve ark., 1997).

Her ne kadar Fransa'da apse hastalığı sendromu olarak isimlendirilen KLA'in etkeni, *C. pseudotuberculosis* ve *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* birlikte kabul edilseler de (Pepin ve ark., 1988), yazılı literatürlerin hemen hepsinde etkenin *C. pseudotuberculosis* olduğu bildirilmektedir (Brogden ve ark., 1984a; Augustine ve Renshaw, 1986; Brown ve Olander 1987).

Türkiye'de, *C. pseudotuberculosis* infeksiyonu ile ilgili olarak hastalığın insidensi, etkenin biyokimyasal özellikleri, patogenezisi, allerjik ve indirekt teşhis yöntemlerini içeren bazı çalışmalar yapılmıştır (Böğrün ve Berker, 1973; Keskin-tepe, 1976b; Aydın, 1977; Erganiş ve ark., 1990; Kuyucuoğlu, 1995; Kahraman ve ark., 1998; Sayın, 1998; İzgür ve ark., 1999).

1.3. Etiyoloji

KLA'in etkeni olan *C. pseudotuberculosis* Gram pozitif, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, kokoid veya çomak formunda, fakültatif intraselüler bir bakteridir (Arda ve ark., 1997; Simmons ve ark., 1997; Yeraham ve ark., 1997). Düzensiz boyanan granüllere (metachromatic) sahip olan etken (Jones ve Collins, 1986) boyalı preparatlarda çit tarzında veya çin alfabesi şeklinde görülmektedir (Kwapinski, 1969). Boyutları 0.5-0.6 x 1.0-3.0 µm arasındadır. Taze kültürlerde pleomorfizm gösteren etken, mikroskopik morfoloji açısından *Corynebacterium diphtheriae* ve diğer türlerle benzerlik gösterir. Apselerden hazırlanan preparatlarda ise Gram pozitif, hafif açılı çomakçıklar veya kok morfolojisinde de görülebilir. Metakromatik granüller Neisser ve Albert boyama metotları ile daha iyi tespit edilmektedir (Jones ve Collins, 1986).

Etken günümüzde Actinomycetales sınıfının, Actinomycetaceae familyasının, Corynebacterium cinsinin, *C. pseudotuberculosis* türü olarak sınıflandırılmış olup, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin düzensiz, spor oluşturmeyen Gram pozitif çomaklar seksiyonunda bulunmaktadır (Jones ve Collins, 1986).

Aerobik veya fakültatif anaerobik ortamlarda, 37°C'de iyi bir üreme gösteren etken, kanlı agarda 2-4 günde çevresinde dar bir hemoliz (beta hemoliz) alanı olan, 1 mm çapında, yuvarlak, sarımsı veya gri-beyaz renkte, öze ile temasta agar yüzeyinde kayan, aleve temas ettirildiğinde etrafa saçılan koloniler oluşturarak ürer (Kwapinski, 1969; Arda ve ark., 1997). Kolonilere ait bu özellik hücre yüzeyinde bulunan lipid tabakasından kaynaklanmaktadır. Bazı *C. pseudotuberculosis* kolonilerinde merkezden çevreye doğru yayılan konsantrik halkalar oluşmaktadır. Besiyerlerine kan, serum gibi zenginleştirici maddelerin eklenmesi ve inkubasyonun CO₂'li ortamda yapılması üreme üzerine olumlu etki yapmaktadır. Sıvı besiyerlerinde genellikle dipte üremekle birlikte bazı suşlar zamanla yüzeyde pellikül de oluşturabilir (Arda ve ark., 1997). Proteolitik etkisi olmayan etkenin, biyokimyasal aktivitesi zayıf ve değişkendir (Aydın, 1977; Jones ve Collins, 1986; Brown ve Olander, 1987). Etken glukoz, galaktoz, maltoz ve mannozu gaz oluşturmaksızın fermente edebilir. Nişasta, trehaloz, arabinoz, laktoz, ksiloz, mannitol, inositol, salisin ve sukroza etki edemeyen etkenin katalaz ve üreaz aktiviteleri pozitifdir (Muckle ve Gyles, 1982; Lloyd ve ark. 1990). *C. pseudotuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae* ve *Corynebacterium ulcerans*'ın pirazinamidaz aktiviteleri pozitif olduğu halde, diğer korinebakteri türlerinin negatiftir (Muckle ve Gyles, 1982). *C. pseudotuberculosis*'in nitrata olan etkisi bakımından, nitrat pozitif ve negatif olmak üzere farklı suşları vardır. Koyun ve keçi orijinli suşlar genellikle nitrat negatif, at ve sığır orijinliler ise pozitifdir (Batey, 1986a; Sutherland ve ark., 1996; Rizvi ve ark., 1997). Dünya'nın değişik bölgelerinden izole edilen 13 farklı (ABD ve Avustralya'dan 4 koyun ve 4 keçi, Kenya'dan 2 at ve ABD'den 3 sığır) nitrat pozitif ve negatif suşların restriction fragment length polymorphism (RFLP) ile analizinde, suşlar arasında genetik farklılığın olduğu anlaşılmıştır (Sutherland ve ark., 1996). Bununla birlikte nitrat redüktaz aktivitesi negatif olan suşlar, mastitis ve

ülseratif lenfadenitisli sığırlardan da izole edilmiştir (Sutherland ve ark., 1993; Sutherland ve ark., 1996; Steinman ve ark., 1999).

Lloyd ve ark. (1990) 100 adet hayvandan oluşan bir keçi sürüsünün yaklaşık % 30'unda klinik olarak KLA semptomları tespit etmişlerdir. Apse içeriklerinden hazırladıkları preparatlarda, 1-2 µm boyutlarında, çoğunluğu intraselüler olan Gram pozitif çomak ve kok morfolojisinde etkenleri görerek, yaptıkları izolasyon ve identifikasyon çalışmalarında katalaz, üreaz, maltoz, mannoz ve glukoz aktiviteleri pozitif; nitrat, arabinoz, galaktoz, salisin ve trehaloz testleri negatif olan etkenin *C. pseudotuberculosis* olduğunu ifade etmişlerdir.

İçlerinde 1950 yılından önce izole edilen 1 adet suşun da bulunduğu toplam 26 adet keçi orijinli *C. pseudotuberculosis* suşu çeşitli özellikleri yönünden tekrar incelenmiştir. Yirmi beş suşun tamamının katalaz, üreaz, mannoz ve maltoz aktiviteleri pozitif bulunurken; nitrat redüktaz, arabinoz, ksiloz, trehaloz, galaktoz, mannitol, salisin ve inositol test sonuçları da negatif bulunmuştur (Muckle ve Gyles, 1982). Yetmiş koyun ve 7 keçi orijinli *C. pseudotuberculosis* suşlarının çoğunun aynı morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikler gösterdiği ve glukoz, maltoz, galaktoz ile sakkaroz aktivitelerinin pozitif olduğu; hidrojen sülfid, indol, Voges-Proskauer, litmuslu süt ve jelatini eritme yeteneklerinin negatif olduğu; suşların sadece ikisinin metil red pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir (Aydın, 1977). Keskintepe (1976a) biyokimyasal özelliklerini incelediği 85 adet *C. pseudotuberculosis* suşunun hepsinin glukoz, galaktoz, maltoz, trehaloz, levüloz, mannoz ve dekstrini gaz oluşturmaksızın fermente ettiğini; hiç birinin mannitol, laktoz, ksiloz, rafinoz, ramnoz, dulsitol, salisin, arabinoz ve inositole etki etmediğini; katalaz testinin bütün suşlarda pozitif, indol ve jelatin testlerinin ise negatif olduğunu ifade etmiştir.

Koyun ve keçi orijinli *C. pseudotuberculosis* suşları arasında biyokimyasal aktivite bakımından önemli farklılıkların olmadığı bildirilmektedir (Sutherland ve ark., 1996).

Korinebakterilerin hücre duvarında esas yapısını mikolik asidin oluşturduğu kalın bir lipid tabakası (Hard, 1975; Brown ve Olander, 1987) ve bu tabakaya ilaveten çeşitli polisakkaritlerle birlikte peptidoglikan tabakada diamino ve mesodiamino pimelik asitler de bulunmaktadır (Ayers, 1977; Batey, 1986a). Ekstrakte edilebilen lipid tabakası bakterinin canlılığını devam ettirebilmesi bakımından zorunlu bir yapı değildir. Bu komponent, bir virulens faktörü olarak görev yapmakta ve etkenin konak savunma hücrelerinin fagositik etkisinden korunmasına yardımcı olmaktadır (Ayers, 1977; Batey, 1986a; Brown ve Olander, 1987).

1.4. Epizootiyoloji

Özellikle tropikal ve subtropikal bölgeler başta olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde görülen KLA, koyun ve keçi popülasyonunun yoğun olduğu bölgelerde daha sık görülmektedir (Holstad, 1986a; Leamaster ve ark., 1987; Schreuder ve ark., 1994; Pepin ve ark., 1997). Sağlıklı sürüye hasta bir hayvanın girmesinden yaklaşık 2-3 yıl sonra sürünün önemli bir bölümü infekte olmaktadır (Rizvi ve ark., 1997). İnfeksiyonun sürüye bir kez bulaştıktan sonra eradikasyonunun oldukça güç olduğu bildirilmektedir (Brown ve ark., 1986).

Çoğu ülkelerde koyun ve keçilerde infeksiyonun prevalansının % 50-60 arasında değiştiği (Lloyd, 1994), Avustralya'da 3 yaşın üzerindeki koyunlarda % 54 (Sutherland ve ark., 1992), ABD'nin batı eyaletlerindeki koyunlarda % 42.4 (Stoops ve ark., 1984), Batı Avustralya'da yabani keçilerde % 7.8 (Batey ve ark., 1986), Ürdün'de 1-3 yaşlı Awassi koyunlarında % 15.3 (Al Rawashdeh ve Al Qudah., 2000), Norveç'te keçilerde % 8-61 oranında olduğu (Lund ve ark., 1982a), hastalığın bazı Avrupa ülkelerinde Avustralya ve ABD'de olduğu kadar yoğun görüldüğü ifade edilmektedir (Lloyd, 1994). Serolojik yöntemlerle yapılan bir çalışmada, Güney Alberta'da aşısız Rambouillet, Suffolk, Finn, Dorset ve Romanov ırkı koyunlarda insidansın % 50-94 arasında değiştiği ifade edilmiştir (Stanford ve ark., 1998). Türkiye'de ise infeksiyonun ülke yada bazı bölgeler bakımından yaygın olduğu bildirilmiştir (Argun, 1951; Aydın, 1977; Muz ve ark., 1995).

İnfeksiyon Avustralya, Fransa, İspanya, İtalya, İsveç, Romanya, Almanya, Yeni Zelanda, Arjantin, Uruguay, Şili, Güney Afrika, ABD, Sudan, Mısır ve Norveç'te eskiden beri görülmesine rağmen (Maddy, 1953; Awad, 1960; Kuria ve Holstad, 1989b; Ellis ve ark., 1991; Schreuder ve ark., 1994; Zaitoun ve Bayoumi, 1994); Hollanda'da 1984 (Dercksen ve ark., 1996), İngiltere'de ise 1990 yılında (Rizvi ve ark., 1997, Scott ve ark., 1997) rapor edilmiştir.

C. pseudotuberculosis koyun ve keçiler başta olmak üzere at, sığır, geyik, deve, domuz ve bufalolarda da infeksiyonlara neden olmaktadır (Wisecup ve ark., 1964; Zhao ve ark., 1995; Afzal ve ark., 1996; Yeruham ve ark., 1997). Etken, atlarda ülseratif lenfangitis (Aleman ve ark., 1996), insanlarda lenfadenitis (Peel ve ark., 1997) ve diğer hayvanlarda da suppuratif lezyonlar oluşturmaktadır (Knight, 1978; Batey, 1986a; Muckle ve ark., 1992).

Steinman ve ark. (1999), İsrail'de sığırlarda, 1991 yılında olduğu gibi 1998 yılında da *C. pseudotuberculosis*'in neden olduğu bir ülseratif lenfangitis olgusu rapor etmişlerdir. Dana, düve ve ineklerden oluşan toplam 603 adet hayvanlık bir sürüde, prokain penisilin tedavisine cevap vermeyen, ayakların korona, karpus ve tarsus bölgelerinde oluşan ülseratif lenfangitisli 34 hayvandan izole ettikleri bakteriyi API sistemi ile inceleyerek, etkeni nitrat redüktaz aktivitesi negatif olan *C. pseudotuberculosis* olarak tanımlamışlardır.

C. pseudotuberculosis infeksiyonlarında bulaşma direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir (Brown ve Olander, 1987). Direkt bulaşma daha çok çeşitli nedenlerle oluşan deri yaralarından olmaktadır. Bundan dolayı KLA bir yara infeksiyonu olarak da nitelendirilmektedir (Uysal ve ark., 1993). Bu yaralar arasında en önemlisi kırkım yaralarıdır (Serikawa ve ark., 1993; Zaitoun ve Bayoumi, 1994). Kuyruk kesme, kastrasyon ve diğer yaralarla da bulaşma söz konusudur. İnfekte hayvanlara ait apse içerikleri, süt ve dışkı ile çevreye yayılan etken dış ortamda uzun süre canlı kalabilmektedir. Direkt güneş ışığına duyarlı olan bakterinin gölgede 20 haftadan daha uzun bir süre canlı kaldığı bildirilmektedir

(Schreuder ve ark., 1994). Kontamine kanül, toz, toprak, saman, ot, kaşığı, banyo suları ve çeşitli fomitlerle de indirekt bulaşma söz konusudur (Lund ve ark., 1982b; Holstad, 1986a; Dercksen ve ark., 1996; Arda ve ark., 1997). Bulaşmada kara sinekler ve artropotların da rolü olduğu saptanmıştır (Braverman ve ark., 1998). Etkenin vücuda sindirim, solunum ve sağlam deriden de girebildiği bildirilmektedir (Zaitoun ve Bayoumi, 1994; Rizvi ve ark., 1997).

İnfeksiyona duyarlılık bakımından dişi ve erkek koyunlar arasında herhangi bir farkın olmadığı ifade edilmiştir. Ancak infeksiyonun prevalensi ile yaş arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. Süt kuzuları ve bir yaşına kadar olan hayvanlarda morbidite düşüktür. Bir yaşından sonra 30. aya kadar morbidite oranı kırkım yaraları ile ilişkili olarak artmaktadır (Lund ve ark., 1982a; Zaitoun ve Bayoumi, 1994).

1.5. Patogenezis

Pseudotuberkulosisin patogenezisi tam olarak açıklanamamakla birlikte, hastalığın oluşumunda iki temel faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Bunlardan birincisi, etkenin konak savunma hücrelerinin litik etkisinden korunmasına yardımcı olan lipid tabakası; ikinci ise bir permeabilite faktörü gibi fonksiyon yaparak, bakterinin vücutta yayılmasına yardımcı olan ekzotoksinidir (Ayers, 1977; Brown ve ark., 1986; Brown ve Olander, 1987; Pepin ve ark., 1991; Simmons ve ark., 1997). Farelerde yapılan çalışmada, bir grup fareye etken verilerek tüm vücutta apseler şekillendiği halde, çeşitli yöntemlerle inaktive edilmiş ekzotoksin verildiğinde ise lokal steril apselerin oluştuğu görülmüştür. Bu sonuçlardan lipid tabakanın piyojenik faktör, ekzotoksinin de permeabilite faktörü olarak apse oluşumunda rol aldıklarının anlaşıldığı bildirilmiştir (Brown ve Olander, 1987).

Pasajlarla oluşturulan attenüasyon, lipid tabakanın incelmesine neden olmaktadır. Sitotoksik etkisi Mycobacterium tuberculosis'e göre daha zayıf olan korinebakteriyel lipid tabakanın, adjuvant özelliğinin de olmadığı ifade edilmiş, fazla miktarda kobaylara verildiği durumlarda ise sistemik bir toksisite oluşturmaksızın, sadece lokal lezyonlar oluşturduğu bildirilmiştir (Batey, 1986a).

Kloroform-metanol ekstraksiyon yöntemi ile lipid miktarı belirlenen 25 farklı izolatla farelerde yapılan çalışmada, suşların sahip olduğu lipid miktarı ile oluşturdukları apselerin sayı ve büyüklükleri arasında bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (Brown ve Olander, 1987).

C. pseudotuberculosis'in fakültatif intraselüler bir bakteri olmasında, lipid tabakanın da etkisi olduğu bildirilmektedir (Yeruham ve ark., 1997). Bakteri, makrofajlar tarafından alındıktan sonra bu hücreler içerisinde çoğalmaya devam eder. Bir süre sonra makrofajlar parçalanır ve etken serbest kalır. Serbest kalan bakteriler dolaşımda bulunan diğer fagositik hücreler tarafından alınarak siklus tekrarlanır. Tekrarlanan bu fagositoz siklusunun, koyunların pseudotuberculosisinde nüks eden lezyonların oluşmasına neden olduğu bildirilmiştir (Ayers, 1977; Batey ve ark., 1986; Brown ve ark., 1986; Brown ve Olander, 1987; Yeruham ve ark., 1997).

Lipid tabakanın hastalığın serolojik teşhisinde otoaglutinasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Holstad, 1986a). Lipid tabaka dikkate alındığında; korinebakteriler, mikobakteriler, nokardialar ve rhodokoklar (CMNR grup) birlikte sınıflandırılmaktadır (Brown ve Olander, 1987).

Bütün C. pseudotuberculosis suşları, fosfolipaz D (PLD, fosfatidilkolin fosfatidialhidrolaz) olarak da bilinen güçlü bir ekzotoksin sentezlemektedir (Batey, 1986a; Brown ve Olander, 1987; Eggleton ve ark., 1991c). Lipid tabaka ile birlikte PLD, etkenin virulens faktörleridir (Pepin ve ark., 1988; Muckle ve ark., 1992). Protein yapıda olan ekzotoksin, membran sfingomiyelinin yapısını bozarak damar permeabilitesini artırmak suretiyle, etkenin vücuda giriş yerinden bölgesel lenf yumruları ve iç organlara yayılmasına yardımcı olmaktadır. PLD'nin yayılmada diğer bir fonksiyonu da nötrofillerin etkenin olduğu bölgeye mobilizasyonunu engellemek suretiyle, opsonizasyonu kısmen de olsa sınırlandırmasıdır (Yozwiak ve Songer, 1993).

Doty ve ark. (1964), 105 koyun, 9 keçi, 6 at ve 1 boğadan izole ettikleri toplam 121 adet *C. pseudotuberculosis* suşuna ait ekzotoksin örneklerini, kros-nötralizasyon testi ile incelediklerinde, tüm toksin örneklerinin antijenik olarak benzer olduklarını tespit etmişlerdir.

Molekül ağırlığı 13.5-40 kDa arasında olan ekzotoksin (Egen ve ark., 1989), bakterinin daha çok sitoplazmasından olmak üzere hücre duvarından da sentezlenmektedir (Brown ve Olander, 1987). Etkene ait supernatantlardan elde edilen PLD'nin; dermonekrotik etkisi yanında, yüksek dozlarda kobay, fare, tavşan ve koyunlar için letal etkisinin de olduğu bildirilmiştir (Brown ve Olander, 1987; Egen ve ark., 1989; Muckle ve ark., 1992). PLD, önemli bir hücre yüzeyi komponenti olan sfingomiyelinin yapısını bozarak, seramidfosfat ve koline yıkımlamaktadır. Sfingomiyelinin seramide kadar parçalanması hücrelerin lizisi için yeterlidir (Ayers, 1977; Brown ve Olander, 1987). Isı (60°C'de 10 dk, 37°C'de 2 hafta, 25°C'de 3 ay), asidik pH (pH < 5) ve formolle inaktive olan PLD'ye karşı immun yanıt oluşmaktadır (Ayers, 1977; Jones ve Collins, 1986; Brown ve Olander, 1987).

Muckle ve ark. (1992), *C. pseudotuberculosis*'in tüm hücre antijenlerini sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforesis (SDS-PAGE) ile analiz ederek, molekül ağırlıkları 5-200 kDa arasında değişen, 7 farklı protein profili tespit etmişlerdir. Bu kompleks profillerin coomassie blue ile boyanmasında, major proteinin 31.5 kDa'luk protein olduğu saptanmıştır. Daha sonra 31.5 kDa'luk majör protein, NaCl ekstraksiyon ve fast-protein liquid chromatography gel filtration ile purifiye edildiğinde bu proteinin; sfingomiyelinaz, fosfolipaz C ile sinerjik hemoliz ve doğal infekte koyun serumları ile reaksiyon verdiği görülmüştür. Bu proteinin molekül yapısı (N-terminal uçlarındaki amino asit sekansları) ve immunojenik aktivitesi nedeniyle, *C. pseudotuberculosis*'in PLD'si ile identik olduğu, böylece humoral bağışıklıkta önemli rollere sahip olduğu, aşı hazırlanmasında ve serolojik teşhiste kullanılabileceği bildirilmiştir.

Kromatografik yöntemler, presipitasyon ve iyon değişimi gibi değişik tekniklerle purifiye edilebilen *C. pseudotuberculosis* ekzotoksini, recycling isoelectiric focusing (RIEF) ile de purifiye edilerek oluşan ürünün elektroforezi yapıldığında, 31.7 kDa'lık bantın majör protein olduğu tespit edilmiştir. Bu bant katı faza aktarılarak infekte keçi serumları ile işaretlenebildiği gibi, *Rhodococcus equi*'nin fosfolipaz C'si ile sinerjik hemolitik aktivite de gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak purifiye PLD'nin, *C. pseudotuberculosis* ile ilgili patogenezis çalışmalarında, aşı hazırlanmasında ve enzim kullanılarak yapılan in vivo ve in vitro teşhis yöntemlerinde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Egen ve ark., 1989). Braithwaite ve ark. (1993), *C. pseudotuberculosis*'in tüm hücre ve ekzotoksin antijenlerini önce SDS-PAGE, sonra da immunoblot tekniklerle inceleyerek, hem somatik antijenlere hem de ekzotoksine karşı infekte hayvanlarda antikor sentezlendiğini bildirmişlerdir.

İn vitro ortamlarda koyun eritrositlerini tek başına belirgin şekilde lize edemeyen PLD (Yozwiak ve Songer, 1993), *Corynebacterium equi*'nin ekzotoksini (fosfolipaz C) ile koyun eritrositlerini uygun koşullarda lize edebilmektedir (Egen ve ark., 1989; Muckle ve ark., 1992). Toksinlerin bu özelliklerinden yararlanılarak, PLD'ye karşı oluşmuş antikorların ortaya konulması amacıyla sinerjik hemoliz inhibisyon (SHI) testi geliştirilmiştir (Knight, 1978; Brown ve Olander, 1987). Ekzotoksin, koagülaz pozitif stafilokokların beta-lizin aktivitelerini inhibe etmektedir. Böylece etkenin identifikasyonunda kullanılan CAMP testi geliştirilmiştir (Ayers, 1977; Brown ve Olander, 1987).

1.6. Semptomlar

Kronik bir infeksiyon olan pseudotuberkulosisde, yüzeysel lenf yumrularının apseleşmesine kadar geçen sürede dikkat çekici klinik bir bulgu şekillenmemektedir (Stoops ve ark., 1984; Brown ve ark., 1986; Brogden ve ark., 1990). İnfeksiyon eksternal (deri) ve internal (visceral) form olmak üzere iki şekilde oluşmaktadır (Batey, 1986b; Brown ve Olander, 1987; Leamaster ve ark., 1987; Zaitoun ve Bayoumi, 1994).

Eksternal formda mandibular, preskapular, retrofarengial, parotit, prefemoral ve mamarial (superfisial, inguinal) lenf yumrularında ağrısız şişkinlikler oluşur. Cheesy gland olarak da (Hodgson ve ark., 1992) isimlendirilen kazeöz özellikteki apseler; merkezde kuru, yeşilimsi beyaz renkte, kokusuz bir irin kitlesi ve kitleye sıkıca bağlı kapsuladan oluşur. Zamanla yeni kapsulalar oluşarak apseler lamelli bir kitle halini almaktadır. Apselere özgü bu yapı özelliğinin KLA için tipik olduğu bildirilmektedir (Stoops ve ark., 1984). Zamanla dışarı açılan apselerden yeşilimsi renkte, koyu kıvamda ve kokusuz bir irin akmaktadır (Ayers, 1977; Arda ve ark., 1997). İnfekte lenf yumrusu bölgesinde bulunan kıllar genellikle dökülmektedir (Zaitoun ve Bayoumi, 1994).

Hastalığın visceral formunda ise mediastinal ve bronşial lenf düğümlerinin etkilenmesi ile akciğerlerde lezyonlar şekillenmektedir. Akciğerlerin etkilenmesinde bulaşma daha çok solunum yolu ile olup, ağırlı bir öksürükle birlikte burun akıntısı dikkat çekmektedir. Akciğerlerden başka karaciğer, böbrekler ve diğer iç organlar da etkilenmektedir (Ayers, 1977; Augustine ve Renshaw, 1986; Brogden ve ark., 1990; Simmons ve ark., 1997). İnternal formda prognozun daha endişe verici olduğu bildirilmiştir (Brown ve ark., 1986). Bu form, koyunlarda döl verimi ve döl verim yaşının düşmesine, prematüre doğumlarla birlikte aşırı derecede zayıflamaya da neden olmasından dolayı hastalık, zayıf koyun sendromu olarak da isimlendirilmektedir. Ölümler de daha çok bu formda görülmektedir (Gates ve ark., 1977; Ellis, 1988; Paton ve ark., 1988; Brogden ve ark., 1990). İnfeksiyonda zayıflamanın bir nedeninin de tümör nekrozis faktör (TNF) olduğu bildirilmiştir. Bu monokin, koyunların gerek deneysel gerekse doğal korinebakteriyel infeksiyonlarında pulmonal pyogranülomların oluşmasıyla lokal olarak sentezlenmeye başlar. Zamanla tüm vücuda yayılarak kaşeksi tablosunun oluşmasına yardımcı olur (Hodgson ve ark., 1992; Serikawa ve ark., 1994; Ellis ve ark., 1995). Apselerin yerleştiği organlara göre solunum güçlüğü, pneumoni, ataksi ve topallık gibi klinik bulgular dikkat çekmektedir (Brown ve Olander, 1987).

Koyunlarda daha sık görülmekle birlikte keçilerde de meme dokusuna yerleşen etken, burada kazeöz odakların oluşmasına ve supramamam lenf

yumrularının apseleşmesine neden olmaktadır. Bu durum süt veriminin azalmasına, apselerin meme bezlerine açılması sonucu süt kuzularının zayıf gelişmesine ve septisemi sonucu ölümlerine de sebep olabilmektedir (Brogden ve ark., 1990; Dercksen ve ark., 1996; Arda ve ark., 1997).

Pseudotuberkulosisin visceral ve eksternal formları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Batey, 1986b; Batey ve ark., 1986; Brown ve Olander, 1987; Pepin ve ark., 1988; Zaitoun ve Bayoumi, 1994).

Koyun ve keçilerde lezyonların vücuttaki dağılımları farklılık göstermektedir. Avustralya'da kesimi yapılan 2.920 keçi incelendiğinde lezyonlar baş bölgesinde % 49.3, gövde de % 46.7 ve iç organlarda % 12.3 oranında tespit edilmiştir. Keçilerde akciğer lezyonlarının oranı koyunlara göre daha az bulunmuştur. Ancak böbrek lezyonları keçilerde daha yaygındır. Keçilerde parotit, retrofarengial ve mandibular lenf yumrularının apseleşmesi koyunlara göre daha çok olmaktadır (Batey ve ark., 1986).

1.7. Teşhis

Kazeöz lenfadenitisin teşhisi; klinik teşhis, nekropsi bulguları ve laboratuvar muayeneleri ile olmaktadır.

1.7.1. Klinik Teşhis

Pseudotuberkulosis kronik karakterde bir hastalıktır. Klinik teşhiste yüzeysel lenf yumrularının apseleşmesi ve zayıflama önemli bulgular arasındadır. Apse yüzeyindeki kıllar genellikle dökülmektedir. Apseler zamanla fistülleşerek sarı-yeşilimsi renkte, kokusuz ve koyu kıvamda irin akmaktadır. Visceral formda aşırı derecede zayıflama dikkat çeker. İnfeksiyon iç organlara yerleşmiş ise bu organların fonksiyonel bozukluklarına bağlı semptomlar görülmektedir. Akciğerlerin etkilendiği durumlarda öksürük ve solunum güçlüğü ile birlikte seyrek de olsa ölümler de görülebilir. Eklemler etkilendiğinde topallık, memeler etkilendiğinde ise mastitis dikkat çekmektedir (Brown ve Olander,

1987; Brogden ve ark., 1990; Arda ve ark., 1997).

1.7.2. Nekropsi Bulguları

Nekropside akciğer, karaciğer ve böbrek gibi iç organlarla; mediastinal, bronşial ve preskapular lenf yumruları gibi bazı lenf yumrularında tipik apseler görülür. Oluşan apselerin çapı ortalama 5-10 cm arasındadır. Konsantrik tabakalaşma (lamellasyon) hastalığın ilerleyen dönemlerinde daha belirgin hale gelmektedir (Stoops ve ark., 1984; Brown ve Olander, 1987).

ABD'nin batı bölgesinde kesimi yapılan 37.383 koyun arasından nekropsi bulguları ile pseudotuberkulosis olduğu düşünülen 4.089 adet koyunun lezyonları vücuttaki dağılımları bakımından incelenmiştir. Buna göre lezyonların % 24.99'u göğüs boşluğu organlarında, % 23.09'u iskelet dokularında ve % 11.79'u da karın boşluğu organlarında tespit edilmiştir. Çalışmada, koyunlarda infeksiyonun visceral formunda en çok etkilenen organların torasik ve mediastinal lenf yumruları olduğu saptanmıştır. Abdominal organlar arasında lezyonların en çok görüldüğü organ karaciğer olup bunu böbrek izlemektedir (Stoops ve ark., 1984). Başka bir çalışmada kesimi yapılan 11.205.149 adet koyundan 12.056 adetinde makroskopik olarak KLA bulguları tespit edilmiştir. Lezyonlar bronşial lenf yumrularında % 89, mediastinal lenf yumrularında % 81, akciğerlerde % 76, preskapular lenf yumrularında % 24, prefemoral lenf yumrularında % 15, hepatik lenf yumrularında % 14, karaciğerlerde % 12, supramamal lenf yumrularında % 9, skrotumda % 8, böbreklerde % 5, dalak ve kas dokusunda % 4, popliteal lenf yumrularında % 2, diğer lenf yumruları ile visceral organlarda ise % 1 oranında saptanmıştır (Maddy, 1953).

1.7.3. Laboratuvar Teşhisi

Hasta hayvanlardan alınan apse içerikleri, fistül cidarından alınan svab ve süt örnekleri ile nekropsisi sonrasında alınan lezyonlu organlar marazi madde olarak kullanılmaktadır (Arda ve ark., 1997; Yeruham ve ark., 1997).

1.7.3.1. Bakteriyoskopi

Hazırlanan preparatlar Gram yöntemi ile boyanarak pleomorfik yapıda Gram pozitif kokobasil yada çomaklar aranır (Arda ve ark., 1997). Metakromatik granüller ise Albert ve Neisser boyama metodları ile daha net olarak saptanmaktadır (Jones ve Collins, 1986).

1.7.3.2. Kültür

C. pseudotuberculosis kan veya serum ile zenginleştirilen çeşitli katı ve sıvı besiyerlerinde üremektedir. İnkubasyonun % 5-10 CO₂'li ortamda yapılması üremeyi hızlandırmaktadır. İdentifikasyonda katalaz, üreaz, nitrat redüktaz ve çeşitli karbonhidrat fermantasyon testleri ile CAMP testi yapılmaktadır (Aydın, 1977; Muckle ve Gyles, 1982; Brown ve Olander, 1987; Lloyd ve ark., 1990; Sutherland ve ark., 1993; İzgür ve ark., 1999).

1.7.3.3. Hayvan Deneyi

Kobay, tavşan, fare ve kuzular deney hayvanı olarak kullanılmaktadır. Kobaylar *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarına en duyarlı laboratuvar hayvanlarıdır. Ekzotoksinin letal etkisi için kobayların, dermonekrotik etkisi için de tavşanların uygun deney hayvanları olduğu bildirilmiştir. Fareler, infeksiyona nispeten daha dirençli olmaları ve hastalığın oluşumu bakımından da, koyun ve keçilerin doğal infeksiyonu ile benzerlik göstermesi nedeniyle, kazeöz lenfadenitisle ilgili çalışmalarda tercih edilmektedirler (Batey, 1986a; Pepin ve ark., 1991).

1.7.3.4. Allerjik Testler

C. pseudotuberculosis infeksiyonlarında çeşitli deri testlerinin tanıya yardımcı olduğu bildirilmesine rağmen, henüz pratiğe konulmuş bir allerjenin mevcut olmadığı bildirilmiştir (Brown ve ark., 1986; Arda ve ark., 1997).

1.7.3.5. Serolojik Testler

Pseudotuberculosisin serolojik teşhisinde; lam aglütinasyon (Aydın, 1977; Erganiş ve ark., 1990; Muz ve ark., 1995), tüp aglütinasyon (Aydın, 1977; Erganiş ve ark., 1990; Muz ve ark., 1995), mikro aglütinasyon (Menzies ve ark., 1991), agar jel presipitasyon (Aydın, 1977; Muz ve ark., 1995), immunodifüzyon (ID) (Burrell, 1980b), komplement fiksasyon (KF) (Shigidi, 1979), toksin nötralizasyon (Shigidi, 1979), serum nötralizasyon (Doty ve ark., 1964), hemoliz inhibisyon (HIT) (Burrell, 1980a; Lund ve ark., 1982b; Kuria ve Holstad, 1989b), sinerjik hemoliz inhibisyon (SHI) (Knight, 1978; Holstad, 1986b), indirekt hemaglütinasyon (IHA) (Shigidi, 1979), anti hemoliz inhibisyon (AHI) (Lovell ve Zaki, 1966a; Lovell ve Zaki, 1966b), anti stafilokokal β -hemolizin inhibisyon testleri ile (Zaki, 1968); enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve modifiye şekilleri olan sonike ELISA (Maki ve ark., 1985; Ellis ve ark.,1990), ekzotoksin ELISA (Maki ve ark., 1985; Ellis ve ark.,1990), çift antikor sandviç ELISA (Ter Laak ve ark., 1992), dot-blot ELISA (Prodhon ve ark.,1993) ve immunoblot (Ter Laak ve ark., 1992) teknikleri de kullanılmaktadır.

Awad (1960), koyunların C. pseudotuberculosis infeksiyonunun teşhisinde lam ve tüp aglütinasyon testlerinin güvenilirliklerini, izolasyon sonuçlarını da dikkate alarak araştırmıştır. Çalışmada 264 adeti klinik olarak KLA semptomları gösteren ve 519 adeti de lezyon göstermeyen toplam 783 adet koyun kan serumu kullanmıştır. Semptom gösteren hayvanların 197 (% 64.6)'sinden C. pseudotuberculosis, 43 (% 16.2)'ünden Staphylococcus spp., 24 (% 9.0)'ünden de her hangi bir etken izole edememiştir. Lam aglütinasyon testi ile C. pseudotuberculosis izole edilen hayvanlardan 188 (% 95.4)'i, izolasyon yapılamayan hayvanlardan 6 (% 25.0)'sı ve klinik bulgu göstermeyen hayvanlardan da 53 (% 10.2)'ü pozitif sonuç vermiştir. Staphylococcus spp. izole edilen hayvanlardan hiç biri test ile reaksiyon vermemiştir. Araştırmacı lam aglütinasyon testinin, tüp aglütinasyon testine göre daha pratik olduğunu ve güvenilirliğinin % 96.5 olduğunu bildirmiştir.

Holstad (1986b), *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorları tüp aglütinasyon ve HIT ile saptamaya çalışmıştır. Testlerde pozitif kontrol olarak *C. pseudotuberculosis* izole edilen 25 adet, negatif kontrol olarak da anamnez ve klinik bulgular bakımından KLA semptomları göstermeyen aynı sayıda keçi serumu kullanmıştır. Test serumu olarak 155 adet keçi serumu kullanmış ve testlerde örnekleri, log₁₀ tabanına göre sulandırarak, U tabanlı mikroyetlerde, 50 µl reagent kullanarak gerçekleştirmiştir. Her iki testin spesifite ve sensitivitesini % 96 olarak belirlemiştir. Araştırmacı testlerin keçilerdeki *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarının teşhisinde kullanılabileceğini, ancak HIT'nin tüp aglütinasyon testinden daha güvenilir sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, *C. pseudotuberculosis*'e karşı antikor taşıyan annelerin kolostrumunu alan oğlaklarda bir çalışma yapılmıştır. Tüp aglütinasyon testi ile serum örneklerinin 1. yıl % 82.8'i, 2. yıl % 91.6'sı, 3. yıl da % 94.7'si pozitif bulunurken; HIT ile 1. yıl % 90.9'u, 2. yıl % 97.6'sı ve 3. yıl da % 100'ü pozitif bulunmuştur. Üç yıllık sürede hayvanlar kontrollü bir şekilde KLA'e karşı aşılınmalarına rağmen, testlerle pozitif bulunan hayvanların oranı % 10-12 arasında artma göstermiştir. Bu artışın nedeni, aşılama kullanılan kanülün kontamine olacağı veya *C. pseudotuberculosis*'in çevresel bakteriyel floranın normal bir üyesi olabileceği şeklinde açıklanmıştır. Çalışmada, her iki testin kolay uygulanabilen ve çabuk sonuç veren teknikler olduğu bildirilmiştir. Ancak tüp aglütinasyon testinde titrenin belirlenmesinde, HIT'inde ise eritrositlerin duyarlılaştırılmasında ve hazırlandıktan sonra 1-2 gün içerisinde kullanılma zorunluluğunun olması gibi çeşitli güçlüklerin olduğu ifade edilmiştir (Lund ve ark., 1982a).

Menzies ve ark. (1991), *C. pseudotuberculosis*'in tüm hücre antijenlerinden hazırladıkları, adjuvantlı inaktif aşıya karşı oluşan antikorları mikro aglütinasyon testi ile incelemişlerdir. Aşırı 1 ay ara ile 0.5 ml dozunda iki kez uygulamışlardır. Çalışmada 1-2 yaşlarında 44 adet koyun ve 81 adet keçi serumu kullanmışlardır. Araştırmacılar, hazırlanan aşının koyun ve keçilerde *C. pseudotuberculosis*'e karşı koruyucu düzeyde antikor oluşumunu sağladığını bildirmişlerdir.

Tüp aglütinasyon, KF, jel difüzyon, AHI, ve IHA testlerinin koyunlardaki *C. pseudotuberculosis* infeksiyonun teşhisinde güvenilirlikleri başka bir çalışmada araştırılmıştır. Çalışma, deneysel olarak *C. pseudotuberculosis* enjekte edilen koyun serumları ile yapılmıştır. İki yaşlı hayvanlar üçer adetten 4 gruba ayrılarak, 1. gruba yaklaşık 10^9 bak/ml, 2. gruba 10^7 bak/ml, 3. gruba 10^5 bak/ml miktarında, 1 gecelik sıvı kültürden 5 ml, oluşturulan deri yaralarına sürülerek uygulanmıştır. Dördüncü grup ise kontrol amacıyla kullanılmıştır. Serum örnekleri haftalık olarak 27 hafta süresince alınarak test edilmiştir. Bu süre sonunda hayvanların nekropsileri yapılarak, KLA lezyonları ve etken izolasyonu bakımından değerlendirilmiştir. Tüp aglütinasyon testi ile en erken elde edilen pozitif sonuç, 1. grup hayvanlardan sadece birinde, inokulasyondan sonraki 2. haftada saptanabilmiştir. Üç hafta sonunda etken verilen gruplardan 8 hayvan pozitif bulunurken, bu süreden sonra antikor titresi düşmeye başlamış ve 18. hafta sonunda sadece 4 hayvanın pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Kontrol grubu test ile negatif bulunmuştur. KF testi ile 2. gruptan 2 ve 3. gruptan 1 hayvan, inokulasyondan sonraki 1. haftada pozitif bulunmuştur. Antikor titresinin 3-8. haftalar arasında düşmeye başladığı görülmüştür. Kontrol grubu ile birlikte diğer hayvanlar test ile negatif sonuç vermiştir. Jel difüzyon testi ile inokulasyondan sonraki 2. haftada, 2. ve 3. gruplardan birer hayvan pozitif bulunmuş, titrenin 15. haftadan sonra düşmeye başladığı görülmüştür. Kontrol grubundaki hayvanlar da pozitif sonuç vermiştir. AHI testi ile 1. ve 2. gruptan birer hayvan en erken, 9. hafta sonunda pozitif bulunmuş ve 20. haftadan sonra titre belirlenememiştir. Kontrol grubu negatif bulunmuştur. IHA testi ile en erken antikor titresi, deneme grubundaki 3 hayvanda 4. hafta sonunda belirlenmiştir. Diğer 6 hayvan ise 8. hafta sonunda pozitif sonuç vermiş ve test ile 27. hafta sonunda pozitif sonuç veren hayvan olmamıştır. Bu testlerden hiç biri koyunlardaki *C. pseudotuberculosis* infeksiyonunun teşhisinde % 100 güvenilir bulunmamıştır. AHI testi en fazla olmak üzere diğer testlerin de yüksek oranda yanlış negatif sonuç verdiği saptanmıştır. *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorlar en erken, KF testiyle etken verilmesinden 1 hafta sonra belirlenebilmiştir. Bunun muhtemel nedeni, test ile IgM'lerin tespit edilmiş olması şeklinde açıklanmıştır. Yanlış pozitif sonuç en yüksek oranda jel difüzyon testi ile elde edilmiştir. Bu durum ise düşük oranda bulunan ve diğer testlerle belirlenemeyen, kros reaksiyon veren antikorlarla

açıklanmıştır. Sonuç olarak söz konusu testler arasında IHA testinin, hastalığın teşhisinde ve kontrolünde en güvenilir yöntem olduğu bildirilmiştir (Shigidi, 1979).

Zaki (1968), KLA semptomları gösteren 97 koyundan % 4.1'ini, 44 keçiden % 55.9'unu ve *C. pseudotuberculosis* enjekte ettiği 74 koyundan % 91.9'unu AHI testi ile pozitif bulmuştur. Diğer yandan 94 adet at ve eşekten % 10.6'sında söz konusu testle antikor tespit ederek bu durumu prozon fenomeni ile açıklamıştır. Sonuç olarak araştırmacı, testin % 4.1 oranında yanlış pozitif sonuç vermesine rağmen kullanılan reagent miktarının az olması, sonuçların 1 günde değerlendirilebilmesi ve antijen hazırlanmasındaki kolaylıklardan dolayı AHI testinin, *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarının teşhisinde güvenilir, spesifik bir test olduğunu bildirmiştir.

Koruma testi ile AHI testinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise, KLA lezyonları gösteren hayvanlardan ancak % 37.5'i AHI testiyle pozitif bulunmuştur (Zaki ve Abdel-Hamid, 1974).

Doty ve ark. (1964), tavşanda gerçekleştirdikleri serum nötralizasyon testinin, KLA'in teşhisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, toksinin bir defada fazla miktarda hazırlanıp standardize ve liyofilize edildikten sonra uzun süre saklanabilmesini, bir tavşanda 12 adet serumun test edilebilmesini ve sonuçların 48 saat içerisinde değerlendirilebilmesini testin avantajları olarak bildirmişlerdir.

Kuria ve Holstad (1989b), Norveç'in güney bölgelerinde *C. pseudotuberculosis* infeksiyonunun dağılımını, HIT ile seroepidemiolojik bir çalışmada araştırmışlardır. Çalışmalarında 30 farklı sürüden seçtikleri, kolostrum almamış 10 adet ve 6 aylık 256 adet kuzu ile yaşları 1-9 arasında değişen 764 adet koyuna ait kan serumunu incelemişlerdir. Toplam 1.030 hayvandan 89 (% 8.6)'unu pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar, kuzulardan hiç birinin pozitif sonuç vermediğini ifade etmişlerdir. Başka bir çalışmada, nekropsi sonrasında KLA lezyonları gösteren 30 hayvandan 24'ü ve bu hayvanlardan kolostrum almış 7 kuzudan 6'sı HIT ile pozitif bulunarak, testin KLA'in teşhisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Burrell, 1980a).

ID test ile yapılan bir çalışmada, nekropsilerinde KLA lezyonları gösteren toplam 32 adet koyun ve keçinin tamamı pozitif bulunurken, lezyon göstermeyen 16 hayvan da negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif bulunan hayvanların kolostrumu ile beslenen 16 adet oğlaktan 10'unda test ile antikor saptanmıştır. Sonuç olarak testin az miktarda reagentle yapılabilmesi ve bir petri kutusunda 16 adet serum örneğinin değerlendirilebilmesi gibi avantajlarla birlikte, teşhiste kullanılacak güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Burrell, 1980b).

KLA'in indirekt teşhisinde kullanılan bir başka test enzyeme linked immunosorbent assay (ELISA) tekniğidir. ELISA son yıllarda KLA ile ilgili çalışmalarda güvenilir bir test olarak kabul edilmekte ve kullanılmaktadır (Serikawa ve ark., 1993).

Kuria ve Holstad (1989a), HIT ve ekzotoksin ELISA'nın hastalığın teşhisindeki güvenilirlik ve üstünlüklerini araştırmışlardır. Çalışmalarını KLA semptomları gösteren, aşısız 52 koyun serumu ile yapmışlardır. Hayvanlardan 42'si HIT, 48'i de ELISA ile pozitif sonuç vermiştir. Araştırmacılar, sonuç olarak HIT'inin sensitivitesinin serumdaki antikor miktarına bağlı olduğunu, ekzotoksin ELISA'nın, HIT'inden daha güvenilir sonuçlar verdiğini ve bundan dolayı C. pseudotuberculosis infeksiyonlarının eradikasyonunda başarı ile kullanılacak bir tarama testi olduğunu bildirmişlerdir.

Klinik açıdan KLA semptomları göstermeyen, aşı uygulanmamış, değişik sürülere ait, farklı yaşlardaki toplam 1.186 adet koyun serumu ekzotoksin ELISA ve ID test ile seroepidemiolojik bir çalışmada değerlendirilmiştir. Ekzotoksin ELISA ile 466 (% 39.3), ID test ile 330 (% 27.8) koyun pozitif sonuç vermiş ve testler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Hayvanlardan 329 (% 27.7)'u her iki testle de pozitif, 137 (% 11.6)'si ELISA ile pozitif, ID test ile negatif bulunurken; sadece 1 (% 0,1) hayvan ID test ile pozitif, ELISA ile negatif sonuç vermiştir. Hayvanlardan 719 (% 60.6)'u her iki testle de negatif bulunmuştur. Sonuç olarak, ID testin sensitivitesinin ekzotoksin ELISA'dan daha düşük olmasına rağmen, non-spesifik reaksiyon vermemesi ve kolay uygulanabilmesi nedeniyle

teşhiste kullanılabilir pratik bir test olduğu, ELISA'nın ise non-spesifik reaksiyonlar verdiği ifade edilmiştir (Chikamatsu ve ark., 1989).

Bir başka çalışmada yaşları 2-9 arasında değişen, aşı uygulanmamış, pseudotuberkulozlu toplam 104 koyun kan serumu ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve HIT ile değerlendirilmiştir. Hayvanlar arasında tipik KLA semptomları gösteren 33 (% 31.7) hayvandan *C. pseudotuberculosis* izole edilmiştir. Bu 33 hayvandan sonike ELISA ile 32 (% 96.9)'si, ekzotoksin ELISA ile 28 (% 84.8)'i pozitif bulunurken, HIT ile 1/2-1/32 arasında titre bulunmuştur. İzolasyon yapılamayan 71 hayvandan ekzotoksin ELISA ile 35'i, sonike ELISA ile de 46'sı pozitif sonuç vermiştir. Sonuç olarak ekzotoksin ELISA'nın % 49.2, sonike ELISA'nın da % 64.7 oranında yanlış pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir (Ellis ve ark., 1990).

Maki ve ark. (1985), koyunlardaki *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarının teşhisinde ekzotoksin ve sonike ELISA ile AHI testini karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında 4 adet dişi, 6 adet erkek koyunu deneme, 6 adet dişi koyunu da kontrol amacıyla kullanmışlardır. Denemede kullanılan hayvanlar ikişerli gruplara ayrılarak dişilere 10^5 , 10^8 ; erkekler de 10^2 , 10^3 ve 10^4 bak/ml içeren *C. pseudotuberculosis* sıvı kültüründen deri altı yoluyla 0.1 ml enjekte etmişlerdir. Erkek hayvanların etken verilmesinden 4 ay sonra, dişi hayvanların da 18 ay sonra nekropsilerini yapmışlardır. Ekzotoksin ELISA ile deneme grubundaki erkek hayvanlardan 3'ünde inokulasyondan sonraki 1. ve 3. aylarda yüksek titrede antikor tespit ederken, 3 hayvanda da titrenin artmadığını görmüşlerdir. Test ile deneme grubundaki dişi hayvanlarda 18. ayın sonunda da yüksek titrede antikor saptamışlardır. Genel olarak ekzotoksin ELISA ile tespit edilen antikor titresinin, sonike ELISA ile saptanan titresinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Kontrol grubundaki hayvanlarda her iki ELISA tekniğiyle elde edilen titreleri, deneme grubundaki hayvanlardan oldukça düşük bulmuşlardır. Araştırmacılar sonuç olarak, sonike ELISA'nın sensitivitesinin ekzotoksin ELISA'dan daha düşük olduğunu, ancak her iki testin sensitivitesinin AHI testinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Koyun ve keçilerdeki *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarından korunmada tüm hücre, hücre duvarı, toksoid ve kombine aşılar kullanılmaktadır. Çeşitli araştırmacılar farklı yöntemlerle hazırlanan aşılardan hayvanları infeksiyonlardan korumadaki başarılarını ELISA ile belirlemeye çalışmışlardır (Leamaster ve ark., 1987; Braithwaite ve ark., 1993; Paton ve ark., 1995).

Piontkowski ve ark. (1998), *Clostridium perfringens* tip D, *Clostridium tetani* toksoidleri ve *C. pseudotuberculosis*'in tüm hücre + toksoidi ile kombine inaktif bir aşıya karşı oluşan antikor titresini ekzotoksin ve sonike ELISA ile araştırmışlardır. Çalışma 20'si deneme, 11'i kontrol amacıyla kullanılan 8-10 aylık kuzularda yapılmıştır. Aşı 2 ml miktarında, aksillar bölgeye, 4 hafta ara ile deri altına uygulanmıştır. Serolojik incelemeler amacıyla hayvanlardan çalışmanın 0, 4, 8, 32. haftalarında ve nekropsisi sırasında kan serumları alınmıştır. Çalışmanın 32. haftasında tüm hayvanlara deri altı yoluyla 2 ml miktarında etken (1.95×10^6 cfu/ml) verilmiş, 20 hafta gözlem altında tutulduktan sonra nekropsileri yapılarak lezyonlar incelenmiştir. İlk haftada kontrol ve deneme grubundaki hayvanlarda her iki ELISA ile antikor tespit edilemezken, 4., 8. ve 32. haftalarda her iki teknikte yüksek oranda antikor titresini tespit edilmiştir. En yüksek titre 8. haftada sonike ELISA ile belirlenmiştir. Testte kullanılan ekzotoksin ve sonike antijenlerin kros-reaksiyon vermedikleri bildirilmiştir. Kombine aşı kullanılarak, koyunlarda yapılan benzer bir çalışmada ekzotoksin ELISA ile yapılan değerlendirilmede, epruvasyondan sonraki 20. haftaya kadar kontrol ve deneme grubundaki hayvanlarda antikor titresinde bir artış tespit edilemezken, titrenin bu süreden sonra yükselmeye başladığı bildirilmiştir (Leamaster ve ark. 1987).

Paton ve ark. (1995), 5 kırkım dönemini kapsayan 40 aylık süreye yaydıkları çalışmalarında, KLA'e karşı aşılanmanın etkinliğini ve kırkım yaralarının bulaşmadaki rolünü araştırmışlardır. Çalışmada 450 adet 5 aylık kuzu kullanılmıştır. Hayvanlar eşit sayıda 3 gruba ayrılarak, her gruptan 50 hayvan 28 gün ara ile kombine enterotoksemi + tetanoz + KLA toksoid aşısı ile aşılanmışlardır. İkinci aşılamadan sonraki 4. haftada aşı yapılan hayvanlara epruvasyon yapılmış ve bu hayvanlar ayrı bir ortamda barındırılmıştır. Gruplardaki 100'er hayvan ise yılda iki

kez yapılan kırkım yaralarına bağlı olarak doğal infekte konumuna getirilmişlerdir. C. pseudotuberculosis'e karşı gelişen antikorlar ekzotoksin ve sonike ELISA ile değerlendirilmiştir. Aşılı hayvanlarda ekzotoksin ELISA sonuçları, aşısız hayvanlardan daha yksek bulunmuş ve bu hayvanların toksoid aşı ile aşılanmış olmasıyla açıklanmıştır. Bu alışma ile ekzotoksin ve sonike ELISA tekniklerinin, koyunların C. pseudotuberculosis infeksiyonlarının teşhisinde kullanışlı birer test olduğu, bulaşmada kırkım yaralarının oldukça önemli roller üstlendiği ve aşılama ile KLA'in prevalensinde önemli derecede azalmaların olduğu bildirilmiştir.

Sutherland ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada, KLA'e karşı aşılanmış koyunlarda C. pseudotuberculosis'e karşı oluşan antikorları, ekzotoksin ve sonike ELISA ile inceleyerek, testlerin spesifite ve sensitiviteleri ile birlikte, infekte ve aşılı hayvanların ELISA tekniği ile ayırımlarının mümkün olup olamayacağını belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma 3 grup hayvanda yapılmıştır. Birinci grup hayvanlar 81 koyundan oluşturulmuş ve ticari C. pseudotuberculosis toksoid aşısı ile 4 hafta arayla iki kez aşılanmışlardır. Hayvanlara 2. aşılamadan 3 ay sonra epruvasyon (1×10^7 cfu/ml), bundan 4 ay sonra da nekropsi yapılmıştır. On hayvandan oluşan 2. grup, 1 yıl önceden aynı toksoid aşı ile aşılanmış hayvanlardan oluşturulmuştur. Bu hayvanlar, araştırmanın başında ekzotoksin ve sonike ELISA ile incelendiğinde, antikor titrelerinin düşük olduğu tespit edilmiş ve 1. gruptaki hayvanlar gibi epruvasyon ve nekropsileri yapılmıştır. Aşısız 42 hayvandan oluşturulan 3. gruba aynı şekilde epruvasyon ve 3 ay sonra da nekropsi yapılmıştır. Çalışmanın farklı dönemlerinde alınan kan serumları ekzotoksin ve sonike ELISA teknikleri ile değerlendirilmiştir. Birinci gruptaki hayvanların nekropsilerinde 27 (% 33.3) hayvanda KLA lezyonları tespit edilmiştir. Bu hayvanların 13 (% 48)'ünün 2. aşılamadan 2 hafta sonra ekzotoksin ELISA ile negatif sonuç verdiği görülmüştür. Nekropsilerinde lezyon görülmeyen 54 hayvandan 35 (% 65)'i, 2. aşılamadan 2 hafta

1. aydan itibaren saptanan antikor titresinin, nekropsiyeye kadar olan dönemde yüksek seviyesini koruduğu görülmüştür. İkinci gruptaki hayvanların nekropsilerinde, 4 hayvanda lezyon tespit edilirken, 6'sında lezyon görülmemiştir. Lezyon görülmeyen hayvanlarda epruvasyondan sonraki 6. haftadan itibaren ekzotoksin ELISA ile yüksek titrede antikor saptanmıştır. Lezyon tespit edilen hayvanlarda ekzotoksin ve sonike ELISA ile belirlenen antikor titreleri arasında önemli bir farkın olmadığı görülmüştür. Grupların tamamı birlikte değerlendirildiğinde ekzotoksin ELISA'nın sensitivitesi aşılı hayvanlarda % 83, aşısızlarda % 97, spesifitesi % 33; sonike ELISA'nın sensitivitesi aşılı hayvanlarda % 77, aşısızlarda % 93, spesifitesi de % 42 olarak tespit edilmiştir.

Pseudotuberculosisin teşhisinde dot-blot ELISA'da kullanılmaktadır. Prodhan ve ark. (1993), *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarının teşhisinde dot-blot ELISA ile SHI testini karşılaştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar, ekzotoksinin antijen olarak kullanıldığı dot-blot ELISA'da sensitivitenin % 94, spesifitesin de % 99 olduğunu ve testin keçilerdeki *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarının teşhisinde oldukça güvenilir bir yöntem olduğunu ifade etmişlerdir.

1.8. Sağaltım

Etken amoksisilin, linkomisin, ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, penisilin G, neomisin ve tetrasiklin gibi çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlı olmasına rağmen, oluşan apselerin kalın kapsulasından dolayı antibiyotik tedavisinden genellikle sonuç alınamadığı bildirilmektedir (Brown ve Olander, 1987; Arda ve ark., 1997; İzgür ve ark., 1999).

1.9. Koruma

C. pseudotuberculosis infeksiyonlarından korunmada istenilen düzeyde koruma sağlayan bir metot henüz mevcut değildir (Pepin ve ark., 1988). İnfeksiyonun kontrolüne yönelik yapılan çalışmalar yaklaşık 50 yıl önce başlamış olmasına rağmen, çoğunlukla başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Brogden ve ark., 1990). Hasta

hayvanların çeşitli kemoterapötik ve operatif müdahalelerle tedavilerinin pratik olmaması, infeksiyondan korunmada ve hastalığın eradikasyonunda serolojik bir yöntemle pozitif hayvanların saptanarak sürüden çıkarılması ve özellikle kuzulardan başlayarak aşılamaı daha önemli kılmaktadır (Eggleton ve ark., 1991b; Ter Laak ve ark., 1992; Dercksen ve ark., 1996). Hastalığın koyun yetiştiriciliğine verdiği zararlar 1970'li yıllardan itibaren daha iyi anlaşılmış; özellikle Avustralya, ABD, Kanada ve Norveç gibi ülkelerde etkin bir aşı geliştirme çalışmalarına daha fazla kaynak aktarılmaya ve daha yoğun aşı programları uygulanmaya başlanmıştır (Eggleton ve ark., 1991a). Korunmada etkenin bir veya birden fazla kombinasyonlarını içeren tüm hücre, hücre duvarı ve toksoid aşilar gibi değişik aşı ve adjuvantlar denenmiştir (Cameron ve Minnaar, 1969; Cameron ve ark., 1972; Brogden ve ark., 1984b; Ellis ve ark., 1995). Son zamanlarda bazı ülkelerde farklı metotlarla hazırlanan toksoid aşilar ticari olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (Pepin ve ark., 1993). Avustralya'da 1989-1990 yılları arasında çoğunluğunu toksoid aşiların oluşturduğu 40 milyon doz aşı kullanılmıştır (Paton ve ark., 1991). Bağışıklık süresinin yaklaşık 6 ay olduğu ifade edilen toksoid aşiların (Holstad, 1986a), damar permeabilitesinin artmasına neden olan PLD'nin nötralize olmasına yardımcı olup, etkenin vücutta generalizasyonunu engelleyerek korunmada görev aldığı bildirilmiştir (Brown ve Olander, 1987; Sutherland ve ark., 1992; Pepin ve ark., 1993; Ellis ve ark., 1995).

Türkiye'de hastalığın değişik yönleri ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Argun (1951), ülkemizde de hastalığın oldukça yaygın olduğunu, daha çok ağılda yetiştirilen ve iyi beslenen koyunlarla kuzularda daha fazla kayıplara neden olduğunu bildirmiştir. Böğrün ve Berker (1973), Marmara bölgesinde hastalığın insidensinin tespiti amacıyla yaşları 3-6 arasında değişen; 10.296 erkek, 11.420 dişi Merinos, İmroz, Kıvırcık ve değişik ırktan koyunlarla; 36.203 erkek ve 4.400 dişi, değişik ırklara ait kuzuları kesim sonrasında KLA yönünden makroskopik olarak incelemişlerdir. Muayene sonrasında 1.746 koyun ve 2 kuzuda KLA lezyonları tespit etmişlerdir. Lezyon saptanan organlardan 382'si submandibular, 259'u supramamal, 253'ü preskapular, 124'ü parotit, 89'u prefemoral ve 22'si mezenterial lenf yumruları olduğunu bildirmişlerdir. Diğer yandan hayvanların 111'inin akciğerinde, 75'inin derisinde, 10'unun karaciğerinde, 3'ünün dalağında, 2'sinin böbreğinde ve

l'inin de baş bölgesinde lezyon tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, Marmara bölgesi için hastalığın insidensinin Merinoslarda % 74, Kıvrıcıklarda % 51.1, İmrozlarda % 3.9 ve diğer ırklarda da % 7 olduğunu ifade etmişlerdir. Keskin-tepe (1976b) aglütinasyon testlerinde yanlış değerlendirmelere neden olan otoaglütinasyonun, antijenin magnezyum klorid ile % 1 Tween 80 içeren fizyolojik tuzlu suda hazırlandığında, 72 saatten fazla süreyle suspansiyon halinde kaldığını ve böylece teşhiste güvenilir bir aglütinasyon antijeni elde edilebileceğini bildirmiştir. Aydın (1977), Türkiye'nin değişik bölgelerine ait materyallerden izole ettiği 77 adet koyun ve keçi orijinli *C. pseudotuberculosis* suşunun yaklaşık hepsinin aynı morfolojik, biyokimyasal ve kültürel özelliklere sahip olduğunu; suşların galaktoz, glukoz, sakkaroz ve maltozu fermente ettiğini; indol, Voges Proscauer, hidrojen sülfid ve jelatini eritme yeteneklerinin negatif olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı bu suşlardan 2 adetinin metil red pozitif olduğunu; ayrıca etkene ait değişik dilusyonlardaki toksinin 0.1 ml'sinin tavşan ve kobaylara deri içi verilmesiyle enjeksiyon bölgesinde kızarıklık, ödem ve kabuklaşmaların oluştuğunu; toksinin kobaylara deri altı verilmesinden 24-48 saat sonra ölüm şekillendiğini ifade etmiştir. Erganiş ve ark. (1990) Konya bölgesinde, kronik apseli 100 adet koyuna ait materyallerin 16 (% 16) adetinden *C. pseudotuberculosis* izole ettiklerini, 386 adet koyun kan serum örneğini lam ve tüp aglütinasyon testleri ile değerlendirerek, 24 (% 6,4) örnekte *C. pseudotuberculosis*'e karşı antikor saptadıklarını bildirmişlerdir. Benzer bir başka çalışmada ise, Elazığ yöresinden toplanan koyunlara ait 107 preskapular lenf yumrusunun 35 (% 63,3)'inden saf olarak *C. pseudotuberculosis* izole edildiği, rastgele seçilen 288 koyun kan serumu lam, tüp aglütinasyon ve agar jel presipitasyon testleri ile değerlendirilerek, 40 (% 13,8) örneğin pozitif olduğu ifade edilmiştir (Muz ve ark., 1995). Uysal ve ark. (1996) ise, koyunlarda pseudotuberkulosis'e karşı bağışıklıkta BCG aşısının etkinliğini değerlendirmişlerdir. Üç yıla yaydıkları çalışma süresince 586 adet deneme ve 130 adet kontrol olmak üzere toplam 716 adet, 1 aylıktan küçük kuzu kullanmışlardır. BCG aşısı uygulanan kuzuların % 97.8'inin 1 yıl süre ile PPD testine karşı duyarlı olduğunu saptamışlar ve hayvanların hiçbirinde KLA semptomları görmemişlerdir. Sonuç olarak, KLA'e karşı BCG aşısı kullanılmasının uygun olacağını bildirmişlerdir. Kahraman ve ark. (1998), *C. pseudotuberculosis*'in 7.8×10^7 bak/ml miktarında kobaylara deri altı yolu

ile verilmesinden sonraki 5., 9., 14. ve 22. günlerde, lezyonlu bölgelerden etkeni yeniden izole ettiklerini ve deri altı yolu ile inoküle edilen *C. pseudotuberculosis*'in en yakın lenf yumrusuna yerleştiğini, üremeye başladığını ve buradan da bazen kana karışarak generalize olduktan sonra çeşitli organlara metastazlar yaparak, etkiledikleri organlardaki yangısal hücrelerde sayı ve aktivite bakımından değişikliklere neden olduklarını bildirmişlerdir. Sayın (1998), koyunların KLA'inde apselerin genellikle mandibular ve mediastinal, daha az olarak da preskapular, femoral ve bronşial lenf yumrularında oluştuğunu bildirmiştir. Koyunlarda yapılan bir başka çalışma da hastalığın allerjik teşhisi ile ilgilidir. Çalışmada farklı metotlarla hazırlanan değişik 2 allerjen (lenfadenin ve sonikadenin), hasta (100 adet), şüpheli (180 adet) ve kontrol (20 adet) gruplarına uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Buna göre hasta grubundaki hayvanlardan 73 (% 73)'ü allerjik deri testi ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. Test ile pozitif bulunan 73 koyunun 61 (% 83.5)'i serum aglütinasyon testi (SAT) ile pozitif bulunurken, 60 (% 82,1)'inin post mortem muayenesinde enfeksiyona ait lezyonlar tespit edilememiş ve bunların bakteriyolojik muayenesinde 38 (% 52)'inden *C. pseudotuberculosis* izole edilmiştir. Şüpheli grubu oluşturan 180 hayvandan 134 (% 74.4)'ü deri testi ile bunların da 114 (% 63,3)'ü SAT ile pozitif bulunmuştur. Kontrol grubundaki hayvanlardan hiç biri deri ve SAT ile pozitif sonuç vermemiştir. Allerjik test için en iyi uygulama bölgesinin koltuk altı olduğu ifade edilen çalışmada sonuç olarak, allerjik deri testinin koyunların pseudotuberkulosisinin teşhisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Kuyucuoğlu, 1995). İzgür ve ark. (1999) ise koyunlarda makroskopik olarak KLA tanısı koydukları toplam 41 adet apseli lenf yumrusunun 19 (% 46.3)'undan *C. pseudotuberculosis*, 8 (% 19.5)'inden de *Micrococcus* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar izolasyon yaptıkları örneklerde *C. pseudotuberculosis*'i en yüksek oranda bulduklarını, ayrıca *Micrococcus* türlerinin de yüksek oranda izole edilmesine dikkat çekerek, KLA olgularında bu etkenlerin de önemli olduğunu ifade etmişlerdir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile koyunlarda *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların saptanmasında ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA teknikleri standardize edildi. Türkiye'de, KLA'in teşhisinde her üç ELISA tekniğinin de ilk kez bu araştırmada kullanılması, projeye orijinal bir nitelik kazandırmaktadır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Serumları

2.1.1. Test Serumları: Çalışmada 100 adeti, *C. pseudotuberculosis* bakterin + toksoid yapıdaki ticari aşı (Case-Bac) ile aşlanmış hayvanlardan olmak üzere toplam 471 adet koyun kan serumu incelendi. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM)'ne bağlı farklı işletmelerin koyunculuk ünitelerinde bulunan ve yaşları 7 ay ile 2-3 yıl arasında değişen hayvanlardan sağlanan serumlar ependorf tüplere alınarak -20°C'de saklandı (Tablo-1).

Tablo-1: Çalışmada kullanılan serum sayıları ve orijinleri.

İŞLETME ADI	SERUM SAYISI
TİGEM-Ceylanpınar*	9
TİGEM-Tahirova**	100
TİGEM-Altınova*	15
TİGEM-Gözlü*	7
TİGEM-Polatlı*	340
Toplam	471

* Aşısız hayvanlar

** Asılı hayvanlar

2.1.2. Kontrol Serumları: Testlerde 12 adet pozitif, 14 adet negatif kontrol serumu kullanıldı. Pozitif serumlar *C. pseudotuberculosis* izole edilen ve kan serumları HIT ile pozitif sonuç veren hayvanlardan, negatif serumlar ise hastalığa ait klinik bulgu göstermeyen ve kan serumları HIT ile negatif sonuç veren hayvanlardan alındı.

2.2. İzolasyon Materyali

Araştırmada uygulanan serolojik testlerin sensitivite ve spesifitelerini belirlemek amacıyla, KLA'in eksternal formuna ait klinik bulgular gösteren hayvanlar ile nekropsilerinde lezyon saptanan toplam 193 hayvandan izolasyon materyali alınarak kısa sürede ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı.

2.3. Besiyerleri

ELISA antijenlerinin hazırlanmasında Brain Heart Infusion (BHI, Difco) agar ve % 0.1 Tween 80 (Merck) içeren Brain Heart Infusion (BHI, Difco) broth kullanıldı.

İzolasyon ve identifikasyon amacıyla % 7 koyun kanlı (Difco) agar, BHI agar, BHI broth ve Nutrient (Difco) broth'dan yararlanıldı.

2.4. Solusyon ve Tampon Sıvılar

Ekzotoksin ve sonike ELISA antijenlerinin hazırlanması ve testlerin gerçekleştirilmesinde fosfat buffer solusyonu (PBS), 0.01 M PBS ve fizyolojik tuzlu su (FTS)'dan yararlanıldı. Yıkama solusyonu olarak % 0.05 Tween 80 içeren PBS (PBS-T) ve serum ile konjugat sulandırma bufferı olarak % 1 bovine serum albumin (BSA, Merck) içeren PBS-T kullanıldı. Substrat hazırlanmasında 0.05 M sitrik asit ile 0.1 M Na₂HPO₄ solusyonları, pH 5.0 olacak şekilde karıştırılarak elde edilen sitrat fosfat buffer ve antijen kaplamak amacıyla da coating buffer kullanıldı. Non-spesifik bağlanmaları önlemek için % 3 BSA içeren PBS'undan yararlanıldı. Serum sulandırmaları U tabanlı, 96 çukurlu mikropeytlerde yapıldı.

Dot-blot ELISA'da, test başlangıcında nitrosetuloz membranın (NCM) sonra da substratın yıkanmasında steril distile su, non-spesifik bağlanmaları önlemek için de % 5 yağsız süt tozu (Pınar) içeren PBS-T kullanıldı. Serum ve konjugatın sulandırılması ile yıkama işlemlerinde % 0.05 Tween 20 içeren PBS-T'den yararlanıldı. Sitrat fosfat buffer ekzotoksin ve sonike ELISA tekniklerinde belirtildiği şekilde hazırlandı.

2.5. Konjugat

Ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinde eşekte hazırlanan, peroksidaz enzimi ile işaretli, anti-koyun IgG (H+L) (Sigma) kullanıldı.

2.6. Substrat

Orto-fenilendiamin (Sigma) % 0.04 oranında, 0.01 M sitrat fosfat bufferda eritildikten sonra, renkli şişelere 25 ml miktarında alınarak, kullanılmıncaya kadar -20°C'de saklandı. Ekzotoksin ve sonike ELISA'larda kullanılmadan önce çözdürülerek, dot-blot ELISA'da ise taze olarak hazırlanan, % 50'lik H₂O₂ (Birpa)'den 12.5 µl ilave edilerek kullanıldı.

2.7. Durdurma Solusyonu

Ekzotoksin ve sonike ELISA'larda reaksiyonları durdurmak amacı ile 1.25 M H₂SO₄ (Merck) kullanıldı.

2.8. Ekzotoksin ve Sonike ELISA Teçhizatı

2.8.1. Pipet ve Mikropleytlar: ELISA'lar düz tabanlı, 96 çukurlu, polystyrene mikropleytlar (Greiner) yapıldı. Testlerde 12 kanallı, ayarlanabilir otomatik pipet (Genex) den yararlanıldı.

2.8.2. ELISA Okuyucusu: Sonuçların değerlendirilmesinde Metertech 960 ELISA okuyucusundan yararlanıldı ve okuyucu 405 nm filtre ile kullanıldı.

2.9. Dot-Blot ELISA Teçhizatı

2.9.1. Nitroseluloz Membran (NCM): Testte katı faz olarak, 0.5 x 0.5 cm ebatlarında kesilen 0.2 µm por çaplı NCM (Sigma) kullanıldı.

2.9.2. Plastik Pleyt, Pipet ve Ependorf Tüp: NCM'nin kullanım aşamalarında 80 çukurlu plastik pleytlardan yararlanıldı. Antijen damlatılması ve ependorflarda yapılan serum sulandırılmaları ayarlanabilir, otomatik pipetle (Genex) yapıldı.

2.10. ELISA Antijenleri

ELISA antijenleri A. Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'ndan sağlanan *C. pseudotuberculosis* P1-4 suşundan hazırlandı. Suş, TİGEM'e bağlı farklı koyunculuk ünitelerindeki, kazeöz lenfadenitisli koyunlardan izole edilen toplam 18 adet *C. pseudotuberculosis* suşu arasından seçildi (İzgür ve ark. 1999). Bu suşlar önce tüm hücre ve hücre duvarı antijenleri bakımından SDS-PAGE ile analiz edilerek (Muckle ve ark. 1992), oluşan bantların molekül ağırlıkları dikkate alındığında, 5 adet *C. pseudotuberculosis* suşunun diğer suşlardan farklı olduğu görüldü. Daha sonra bu suşlara ait ekzotoksinlerin, koyun eritrositleri ile yapılan denemelerde hemolitik titreleri incelenerek (Ellis ve ark. 1991), hemolitik titresini en yüksek olan *C. pseudotuberculosis* P1-4 suşu antijenlerin hazırlanmasında tercih edildi.

Sonike ve ekzotoksin antijenleri Maki ve ark. (1985)'nin bildirdiği yöntemin modifikasyonu ile hazırlandı. Bu amaçla *C. pseudotuberculosis* P1-4 suşu, BHI agarda mikroaerobik ortamda, 37°C'de 36 saat inkube edildi. Buradan alınan saf bir koloni erlenmayerde 250 ml % 0.1 Tween 80 içeren BHI brotta aerobik ortamda çalkalanarak 72 saat üretildi. Kültür 1 gece +4°C'de bekletildikten sonra, 8000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.

Ekzotoksin ELISA antijeninin hazırlanması: Santrifüjleme işleminden sonra elde edilen supernatant, önce 0.65 µm (Sartorius) sonrada 0.45 µm (Sartorius) por çaplı milipor filtreden süzüldü ve 1/10.000 oranında mertiolat (Lilly) katılarak, 1 ml hacminde ependorf tüplere alınıp kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Sonike ELISA antijeninin hazırlanması: Santrifüjlemeden sonra pelet iki kez 0.01 M PBS ile yıkandı, tortu aynı solusyonla eşit miktarda suspanse edildi. Bu suspansiyon tekrar eşit hacimde, % 0.6 formaldehit (Merck) içeren % 0.9'luk FTS ile suspanse edildi. Oda ısısında 6 saat dietil eter (Merck) ile karıştırılarak lipid tabakası ekstrakte edildikten sonra, 3 dk sonike (Artek, Sonic 300) edildi. Ürünün yoğunluğu

0.01 M PBS ile Mc Farland Standart Tüp No:5 (1.5×10^6 bak/ml)'e ayarlanarak, 1 ml hacminde ependorf tüplere alınıp + 4°C'de saklandı.

Dot-blot ELISA antijeninin hazırlanması: Dot-blot ELISA tekniğinde C. pseudotuberculosis PI-4 suşundan hazırlanan sonike ELISA antijeni kullanıldı.

2.11. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ekzotoksin ve sonike ELISA'lar; antijen, konjugat ve serumun en uygun dilusyonları tespit edildikten sonra, Maki ve ark. (1985)'nin bildirdikleri metot modifiye edilerek yapıldı.

2.11.1. Ekzotoksin ve Sonike ELISA'ların Standardizasyonu: Bunun için konjugat, serum ve antijenlerin optimal sulandırmaları belirlendi. Antijenlerin ve konjugatın sulandırma oranlarını saptamak amacı ile satranç tahtası metodu uygulandı. Sonike ve ekzotoksin antijenleri 1/5'den başlanarak 1/160'a kadar coating buffer ile iki katlı sulandırıldı. Kontrol serumları 1/10'dan 1/160'a, konjugat ise 1/2.500'den 1/20.000'e kadar PBS-T ile iki katlı dilue edildi. Her bir antijen dilusyonu için negatif ve pozitif serum arasındaki farkın en iyi görüldüğü en yüksek antijen, konjugat ve serum sulandırması optimal sulandırma olarak kabul edildi.

Hazırlanan antijenler kullanılmadan önce biüret metodu ile total protein yönünden analiz edilerek ekzotoksin antijenin protein miktarı 2.25 mg/100 ml, sonike antijenin protein miktarı ise 2.37 mg/100 ml olarak tespit edildi (Kaneko, 1980).

2.11.2. Ekzotoksin ve Sonike ELISA'ların Uygulanması: Ekzotoksin ve sonike ELISA, modifiye Maki ve ark. (1985)'nin yöntemine göre yapıldı. Mikropleytin çukurlarına coating bufferda sulandırılan sonike ve ekzotoksin antijenlerinden 100 µl konularak, nemli ortamda +4°C'de 1 gece bekletildi. Çukurlar PBS-T ile 4 kez yıkandıktan sonra % 3'lük BSA'den her çukura 100 µl ilave

edilerek, 37°C'de 1 saat inkube edildi. Yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlandıktan sonra çalışma serumları ile birlikte pozitif ve negatif kontrol serumları sulandırma bufferi ile 1/10 oranında sulandırılarak gözlere 100 µl konuldu ve 37°C'de 1 saat inkube edildi. Tekrar yapılan yıkama işleminden sonra çukurlara konjugat sulandırma sıvısı ile 1/2.500 oranında dilue edilen konjugattan 100 µl konularak oda ısısında 1 saat bekletildi. Son kez yapılan yıkamadan sonra çukurlara 50 µl substrat ilave edilerek 10 dk oda ısısında ve karanlık ortamda bekletildikten sonra, her çukura 50 µl durdurucu konulup absorbans 405 nm'de ELISA okuyucusu ile okundu. Çalışmada her pleyt için 14 adet negatif 12 adet pozitif kontrol serumu kullanıldı. Eşik değerinin üstünde kalan serumlar pozitif olarak kabul edildi.

2.12. Dot-Blot ELISA

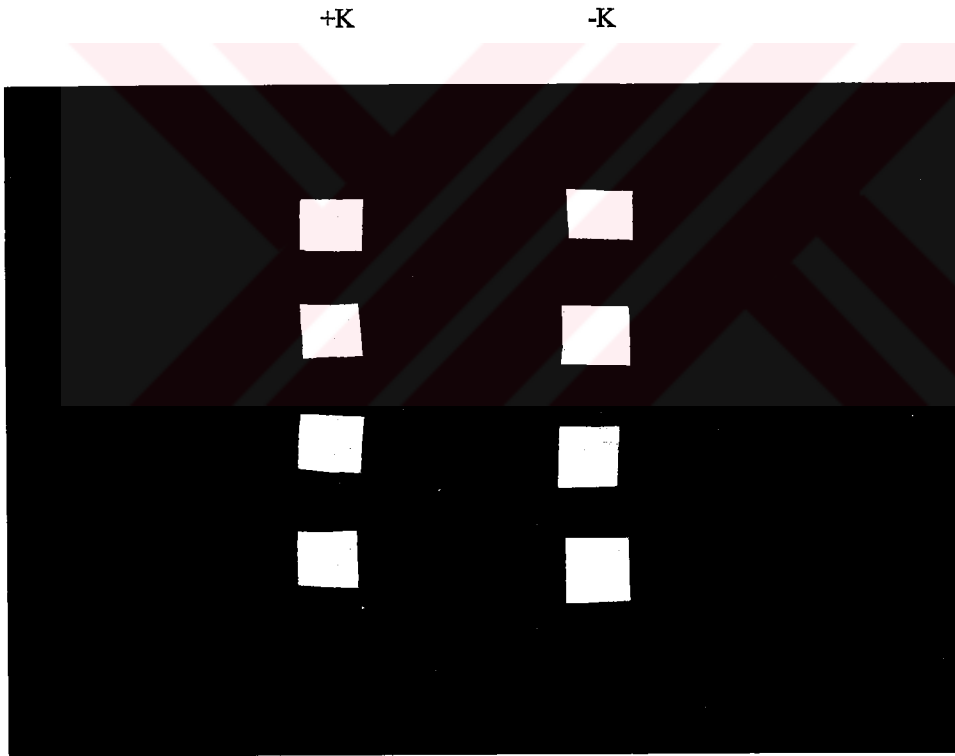
2.12.1. Dot-Blot ELISA'nın Standardizasyonu: Antijen, konjugat ve serum sulandırmalarının belirlenmesi için hazırlanan sonike antijen sulandırılmadan direkt ve PBS-T ile 1/5 den 1/80'e kadar iki katlı sulandırıldı. Kontrol serumları (14 adet negatif, 12 adet pozitif) direkt ve 1/2'den 1/64'e kadar, konjugat ise 1/125'den 1/2.000'e kadar çift katlı sulandırıldı. Pozitif ve negatif serum arasındaki farkın en iyi görüldüğü en yüksek antijen, konjugat ve serum sulandırmaları optimal olarak kabul edildi.

2.12.2. Dot-Blot ELISA'nın Uygulanması: Test, Prodhan ve ark. (1993)'nin bildirdikleri yöntemin modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Testte 80 çukurlu plastik pleytlerden yararlanıldı. NCM, 0.5 x 0.5 cm ebatlarında kesildikten sonra, distile suda yıkanıp oda ısısında kurutuldu. Orta noktalarına 2.5 µl antijen damlatılan NCM'lar, oda ısısında kurutulduktan sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı. NCM'lar plastik pleytin çukurlarına alındıktan sonra, her çukura süt tozu solusyonundan 0.5 ml eklenerek, 37°C'de 45 dk bekletildi. NCM'lar beşer dakika süren aşamalarla 4 kez PBS-T ile yıkandıktan sonra, kontrol ve çalışma serumlarının 1/8'lik dilusyonlarından çukurlara 0.5 ml konularak, 37°C'de 1 saat inkube edildi. Aynı şekilde yapılan yıkama işleminden sonra, her çukura 1/250 konjugat sulandırmasından 0.5 ml ilave edilerek, 37°C'de 45 dk bekletildi. Aynı şekilde

yapılan son yıkamayı takiben, her çukura 0.5 ml taze hazırlanmış substrat konularak, oda ısısında karanlık bir ortamda 10-30 dk bekletildikten sonra NCM'lar, distile su ile 4-5 kez yıkanarak oda ısısında kuruldu. Sonuçlar pozitif (12 adet) ve negatif (14 adet) serumlar da dikkate alınarak, çıplak gözle değerlendirildi ve antijen damlatılan orta bölgedeki koyu renk oluşumu pozitif olarak kabul edildi (**Resim-1**).

2.13. İstatistiksel Değerlendirme

Ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA testlerinin sonuçları, ki-kare testi (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 1997) ile istatistiksel olarak değerlendirildi.



Resim-1: Pozitif ve negatif serumların dot-blot ELISA'da ortofenilendiamin ile göstermiş olduğu reaksiyon (+K, pozitif serum kontrolü; -K, negatif serum kontrolü).

2.14. İzolasyon ve İdentifikasyon

Materyaller kanlı agar ve BHI agara iki seri olarak ekilerek bir serisi % 10 CO₂'li, diğeri ise aerobik şartlarda olmak üzere 37°C'de 5 gün süreyle inkube edildi. Üreyen kolonilerin makroskobik ve mikroskobik morfolojileri incelenerek, biyokimyasal özelliklerine göre identifiye edildi (Arda ve ark.,1997; İzgür ve ark. 1999).



3. BULGULAR

3.1. Ekzotoksin ve Sonike ELISA Sonuçları

3.1.1. Antijen Titrasyonu: Yapılan antijen titrasyonunda her iki antijenin en iyi sonuç verdiği sulandırma 1/20 olarak tespit edildi. Bu sulandırmadaki ekzotoksin antijenin protein miktarı 0.112 mg/100 ml, sonike antijenin ise 0.118 mg/100 ml olarak saptandı.

3.1.2. Optimal Serum Dilusyonu: Satranç tahtası yönteminde pozitif ve negatif kontrol serumları 1/10'dan 1/160'a kadar sulandırılarak, sonike ve ekzotoksin antijenleri ile test edildiğinde, ekzotoksin ve sonike ELISA için sonuçların en iyi okunduğu sulandırma oranı 1/10 olarak saptandı.

3.1.3. Konjugat Titrasyonu: Satranç tahtası yöntemi ile yapılan standardizasyon denemelerinde her iki ELISA'da konjugat için en iyi sulandırmanın 1/2.500 olduğu tespit edildi.

3.1.4. Negatiflik Eşiğinin Belirlenmesi: Negatif ve pozitif kontrol serumları ekzotoksin ve sonike ELISA'da her pleyt için ayrı ayrı değerlendirildi. Bu amaçla negatif kontrol serumlarının ortalamaları hesap edildikten sonra, bu değere 2 SD (standart sapma) değeri de eklenerek eşik değer optik dansite (OD) olarak tespit edildi. Eşik değer, o pleyttteki negatif ortalamasının en az 2 standart sapma üstünde olan serumlarda pozitif kabul edildi.

3.2. Dot-Blot ELISA Sonuçları

3.2.1. Antijen Titrasyonu: Pozitif ve negatif kontrol serumları ile yapılan antijen titrasyonunda, sonike antijenin en iyi sonuç verdiği protein oranı 2.37 mg/100 ml olarak tespit edildi.

3.2.2. Serum Sulandırma: Kontrol serumları 1/2'den 1/64'e kadar iki katlı sulandırılarak sonike antijenle test edildiğinde, ideal sulandırma 1/8 olarak saptandı.

3.2.3. Konjugat Sulandırma: Kontrol serumlarla yapılan standardizasyon denemelerinde, konjugat için ideal sulandırmanın 1/250 olduğu tespit edildi.

3.3. Test Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada toplam 471 adet koyun kan serumu, *C. pseudotuberculosis* antikorları yönünden ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile test edildi. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde serumlardan; ekzotoksin ELISA ile 172 (% 36.5)'si pozitif, 299 (% 63.5)'u negatif, sonike ELISA ile 119 (% 25.2)'u pozitif, 352 (% 74.8)'si negatif, dot-blot ELISA ile 181 (% 38.5)'i pozitif, 290 (% 61.5)'i ise negatif olarak saptandı. Pozitif serum yüzdeleri arasındaki fark toksin ELISA ile dot-blot ELISA arasında istatistiksel olarak önemli bulunmazken ($P>0.05$); toksin ELISA ile sonike ELISA ve sonike ELISA ile dot-blot ELISA arasındaki farklar önemli ($P<0.001$) bulundu (Tablo-2).

Tablo-2: Çalışmada incelenen 471 adet koyun kan serumunda *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen toplu sonuç ve oranları (%).

Test	Pozitif serum		Negatif serum		Ki kare değeri	
	N	(%)	n	(%)		
Ekzotoksin ELISA	172	(36.5)	299	(63.5)	Toksin/sonike ELISA	13.96 ^{***}
Sonike ELISA	119	(25.7)	352	(74.8)	Toksin/dot-blot ELISA	0.36 ⁺
Dot-blot ELISA	181	(38.5)	290	(61.5)	Sonike/dot-blot ELISA	18.8 ^{***}

*** $p<0.001$, + $p>0.05$

Ceylanpınar, Altınova, Gözlü ve Polatlı Tarım İşletmeleri'nden sağlanan aşısız toplam 371 adet koyun kan serumundan; ekzotoksin ELISA ile 96 (% 25.8)'si pozitif, 275 (% 74.1)'i negatif, sonike ELISA ile 82 (% 22.2)'si pozitif, 289 (% 77.8)'u negatif bulunurken; dot-blot ELISA ile 122 (% 32.8)'si pozitif, 249 (% 67.2)'u ise negatif bulundu. Pozitif olarak saptanan serum yüzdeleri arasındaki fark dikkate alındığında; ekzotoksin ELISA ile sonike ELISA arasındaki fark istatistiksel olarak

önemli bulunmazken ($P>0.05$), dot-blot ELISA ile ekzotoksin ELISA ($P<0.05$) ve sonike ELISA ($P<0.01$) arasındaki farklar önemli bulundu (**Tablo-3**).

Tablo-3: Aşısız 371 adet koyun kan serumunda *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen sonuç ve oranları (%).

Test	Pozitif serum		Negatif serum		Ki kare değeri	
	n	(%)	n	(%)		
Ekzotoksin ELISA	96	(25.8)	275	(74.1)	Toksin/sonike ELISA	1.44 [†]
Sonike ELISA	82	(22.2)	289	(77.8)	Toksin/dot-blot ELISA	4.39 [*]
Dot-blot ELISA	122	(32.8)	249	(67.2)	Sonike/dot-blot ELISA	10.81 ^{**}

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, + $P>0.05$

Tahirova Tarım İşletmesi Müdürlüğü'ne bağlı koyunculuk ünitesinden sağlanan 100 adet aşılı koyun kan serumundan; toksin ELISA ile 76 (% 76)'sı pozitif, 24 (% 24)'ü negatif; sonike ELISA ile 37 (% 37)'si pozitif, 63 (% 63)'ü negatif; dot-blot ELISA ile 59 (% 59)'u pozitif, 41 (% 41)'i ise negatif olarak saptandı. Pozitif serum yüzdeleri arasındaki fark, toksin ELISA ile dot-blot ELISA arasında ($P<0.05$), toksin ELISA ile sonike ELISA arasında ($P<0.001$) ve sonike ELISA ile dot-blot ELISA arasında önemli ($P<0.01$) bulundu (**Tablo-4**).

Tablo-4: Aşılı 100 adet koyun kan serumunda *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen sonuç ve oranları (%).

Test	Pozitif serum		Negatif serum		Ki kare değeri	
	n	(%)	n	(%)		
Ekzotoksin ELISA	76	(76)	24	(24)	Toksin/sonike ELISA	30.94 ^{***}
Sonike ELISA	37	(37)	63	(63)	Toksin/dot-blot ELISA	6.58 [*]
Dot-blot ELISA	59	(59)	41	(41)	Sonike/dot-blot ELISA	9.69 ^{**}

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Polatlı Tarım İşletmesi'ne ait 340 serum örneğinden ekzotoksin ELISA ile 76 (% 22.3)'sı pozitif, 264 (% 77.7)'ü negatif; sonike ELISA ile 63 (% 18.5)'ü pozitif, 277 (% 81.5)'si negatif; dot-blot ELISA ile 96 (% 28.2)'sı pozitif, 244 (% 71.8)'ü ise negatif olarak değerlendirildi. Ekzotoksin ELISA ile sonike ELISA ve dot-blot

ELISA arasındaki farklar önemli bulunmazken ($P>0.05$), sonike ELISA ile dot-blot ELISA arasında önemli ($P<0.01$) bulundu (Tablo-5).

Tablo-5: Polatlı Tarım İşletmesine ait 340 adet koyun kan serumunda *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen sonuç ve oranları (%).

Test	Pozitif serum		Negatif serum		Ki kare değeri	
	n	(%)	n	(%)		
Ekzotoksin ELISA	76	(22.3)	264	(77.7)	Toksin/sonike ELISA	1.52 ⁺
Sonike ELISA	63	(18.5)	277	(81.5)	Toksin/dot-blot ELISA	3.11 ⁺
Dot-blot ELISA	96	(28.2)	244	(71.8)	Sonike/dot-blot ELISA	8.93 ^{**}

** $P<0.01$, + $P>0.05$

Altınova Tarım İşletmesi'nden sağlanan 15 adet serumdan ekzotoksin ELISA ile 5 (% 33.3)'i pozitif, 10 (% 66.6)'u negatif; sonike ELISA ile 3 (% 20)'ü pozitif, 12 (% 80)'si negatif bulunurken; dot-blot ELISA ile 10 (% 66.6)'u pozitif, 5 (% 33.3)'i negatif olarak saptandı. Ekzotoksin ELISA ile sonike ELISA arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($P>0.05$) bulunurken; dot-blot ELISA ile toksin ELISA ($P<0.05$) ve sonike ELISA arasındaki farklar önemli ($P<0.01$) bulundu (Tablo-6).

Tablo-6: Atınova Tarım İşletmesinden sağlanan 15 adet koyun kan serumunda *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen sonuç ve oranları (%).

Test	Pozitif serum		Negatif serum		Ki kare değeri	
	n	(%)	n	(%)		
Ekzotoksin ELISA	4	(26.6)	11	(73.3)	Toksin/sonike ELISA	0.34 ⁺
Sonike ELISA	3	(20)	12	(80)	Toksin/dot-blot ELISA	4.13 [*]
Dot-blot ELISA	10	(66.6)	5	(33.3)	Sonike/dot-blot ELISA	6.65 ^{**}

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, + $P>0.05$

Ceylanpınar ve Gözlu Tarım İşletmelerinden sağlanan toplam 16 adet serum örneği her üç testle pozitif olarak değerlendirilirken, diğer işletmelere ait sonuçlar tablo-7' de gösterildi.

Tablo-7: Test serumlarının ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile C. pseudotuberculosis antikorları yönünden işletmelere göre pozitif bulunan serum oranları (%).

İşletme	Serum sayısı n	Ekzotoksin ELISA pozitif serum		Sonike ELISA pozitif serum		Dot-blot ELISA pozitif serum	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Ceylanpınar*	9	9	(100)	9	(100)	9	(100)
Tahirova**	100	76	(76)	37	(37)	59	(59)
Altınova*	15	4	(26.6)	3	(20)	10	(66.6)
Gözlü*	7	7	(100)	7	(100)	7	(100)
Polatlı*	340	76	(22.3)	63	(18.5)	96	(28.2)
Toplam	471	172	(36.5)	119	(25.2)	181	(38.4)

* Aşısız hayvanlar

** Aşılı hayvanlar

Her üç testle toplam 471 serum örneğinden 79 (% 16.7)'u pozitif, 215 (% 45.6)'i negatif bulunurken; aşılı hayvanlara ait 100 serumdan 33 (% 33)'ü pozitif, 16 (% 16)'sı negatif; aşısız hayvanlara ait 371 örnekten 46 (% 12.3)'sı pozitif, 325 (% 87.7)'i ise negatif bulundu (**Tablo-8, Tablo-9**).

Tablo-8: Koyun kan serumlarında ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen sonuçların işletmeler açısından toplu olarak değerlendirilmesi.

Test sonucu	Ceylanpınar serum n: 9	Tahirova serum n: 100	Altınova Serum n: 15	Gözlü serum n: 7	Polatlı serum n: 340	Toplam serum n (%)
Üç test pozitif	9	33	3	7	27	79 (16.7)
Üç test negatif	0	16	5	0	194	215 (45.6)
Toksin+sonike ELISA pozitif	9	33	3	7	32	84 (17.8)
Toksin+sonike ELISA negatif	0	18	11	0	228	267 (56.6)
Toksin ELISA pozitif, sonike ELISA negatif	0	44	1	0	35	80 (16.9)
Toksin ELISA negatif, sonike ELISA pozitif	0	4	0	0	20	24 (5)
Dot-blot ELISA pozitif, sonike+toksin ELISA negatif	0	2	6	0	43	51 (10.8)
Dot-blot ELISA negatif, sonike+toksin ELISA pozitif	0	0	0	0	13	13 (2.7)
Dot-blot ELISA negatif, toksin ELISA pozitif	0	22	0	0	31	53 (11.2)
Dot-blot ELISA negatif, sonike ELISA pozitif	0	1	0	0	27	28 (5.9)
Dot-blot ELISA pozitif, toksin ELISA negatif	0	22	7	0	62	91 (19.3)
Dot-blot ELISA pozitif, sonike ELISA negatif	0	3	6	0	48	57 (12.1)

Tablo-9: TİGEM'e bağlı işletmelerden sağlanan, aşı ve aşızsız koyunlarda *C. pseudotuberculosis* antikorlarının tespiti yönünden ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA arasındaki karşılaştırmalı sonuçlar.

Test sonucu	Aşızsız hayvanlar serum n: 371		Aşıllı hayvanlar serum n: 100		Toplam serum n: 471	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Üç test pozitif	46	(12.3)	33	(33)	79	(16.7)
Üç test negatif	199	(53.6)	16	(16)	215	(45.6)
Toksin+sonike ELISA pozitif	51	(13.5)	33	(33)	84	(17.8)
Toksin+sonike ELISA negatif	249	(67.1)	18	(18)	267	(56.6)
Toksin ELISA pozitif, sonike ELISA negatif	36	(9.7)	44	(44)	80	(16.9)
Toksin ELISA negatif, sonike ELISA pozitif	20	(5.3)	4	(4)	24	(5)
Dot-blot ELISA pozitif, sonike+toksin ELISA negatif	49	(13.2)	2	(2)	51	(10.8)
Dot-blot ELISA negatif, sonike+toksin ELISA pozitif	13	(3.5)	0	(0.0)	13	(2.7)
Dot-blot ELISA negatif, toksin ELISA pozitif	31	(8.3)	22	(22)	53	(11.2)
Dot-blot ELISA negatif, sonike ELISA pozitif	27	(7.2)	1	(1)	28	(5.9)
Dot-blot ELISA pozitif, toksin ELISA negatif	69	(18.5)	22	(22)	91	(19.3)
Dot-blot ELISA pozitif, sonike ELISA negatif	54	(14.5)	1	(1)	57	(12.1)

3.4. İzolasyon Sonuçları

İncelenen 193 koyunun 42 (% 21.7)'sinden *C. pseudotuberculosis* izole edildi. Etken 27 (% 64.2) hayvana ait materyallerden saf olarak izole edilirken, 15 (% 35.7) hayvana ait örneklerden ise *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve bazı Gram negatif bakterilerle birlikte üredi.

Bu çalışmada, *C. pseudotuberculosis* izolasyonu yapılan 42 hayvan dikkate alındığında, sensitivite ve spesifite (Thrusfield, 1986) en yüksek olarak ekzotoksin ve sonike ELISA teknikleri birlikte değerlendirildiğinde tespit edildi (Tablo-10).

Tablo-10: Koyunlarda *C. pseudotuberculosis* antikorlarının tespitinde, ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinin sensitivite (SN)/spesifite (SP) ölçüleri.

Serum		Ekzotoksin ELISA		Sonike ELISA		Ekzotoksin+Sonike ELISA		Dot-blot ELISA	
		SN(%)	SP(%)	SN(%)	SP(%)	SN(%)	SP(%)	SN(%)	SP(%)
Aşısız	(n: 131)	86.3	63.7	84.2	60.3	87.7	65.9	81.8	66.6
Aşılı	(n: 62)	84.4	65.7	83.3	64.9	91.6	66.6	84.2	61.7
Toplam	(n: 193)	82.9	65.9	80.0	64.2	93.3	70.8	83.3	65.5

3.5. Doğrulama Çalışması

Ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinin üçü ile de pozitif bulunan aşılı ve aşısız hayvanlara ait serumlardan rastgele seçilen 15'şer adet aşılı ve aşısız serum örneklerinin hepsi, HIT ile pozitif bulundu.

4. TARTIŞMA

Pseudotuberculosis, dünyanın birçok ülkesinde, koyun ve keçilerde görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan kronik seyirli bakteriyel bir enfeksiyondur. Hastalık koyun ve keçilerde yavru atmaya, erken doğumlara, yapağı veriminde miktar ve kalite bakımından düşmeye, deri kalitesinde bozulmaya ve ileri derecede zayıflamaya neden olmasından dolayı da et veriminde azalmaya neden olmaktadır. Genç hayvanlarda daha fazla olmak üzere, nadiren ölümlere de sebep olmaktadır.

KLA'in Avustralya'da 3 yaşın üzerindeki koyunlarda prevalansının % 54 (Sutherland ve ark., 1992), Norveç'te keçiler için % 8-61 (Lund ve ark., 1982a) ve Güney Alberta'da aşlanmamış koyunlarda insidensin % 50-94 (Stanford ve ark., 1998) arasında değiştiği bildirilmiştir. Türkiye'de Böğrün ve Berker (1973), hastalığın insidensinin Marmara bölgesindeki Merinos ırkı koyunlarda % 74, Kıvırcıklarda % 51.1, İmrozlarda % 3.9 ve diğer koyun ırklarında % 7 olduğunu; Aydın (1977), değişik bölgelere ait materyallerden 70 koyun ve 7 keçi orijinli *C. pseudotuberculosis* suşu izole ederek, ayrıca aglütinasyon testleri ile incelediği 86 koyun kan serumundan 60 (% 70.0)'ünün ve 11 keçi serumundan 9 (% 81.8)'ünün pozitif sonuç vermesini dikkate alarak, KLA'in yurdumuzda da yaygın olduğunu bildirmiştir. Erganiş ve ark. (1990) ile Muz ve ark. (1995) Konya ve Elazığ'da mezbahalardan sağladıkları koyun kan serumları ile yaptıkları sörvey çalışmalarında sıra ile % 6.4 ve % 13.8 oranında *C. pseudotuberculosis*'e karşı antikor saptadıklarını; Erganiş ve ark. (1990) bölgelerindeki koyunlarda KLA insidensinin çok düşük olduğunu, Muz ve ark. (1995) ise Türkiye'de enfeksiyonun yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, TİGEM'e bağlı 5 farklı işletmenin koyunculuk ünitelerinden sağlanan toplam 471 adet koyun kan serumu ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA teknikleri incelenerek ve ayrıca alınan izolasyon materyallerinden de *C. pseudotuberculosis* izole edilerek, bu işletmelerde hastalık direkt ve indirekt teşhis yöntemleriyle ortaya konuldu.

KLA'in teşhisi, direkt ve indirekt yöntemlerle yapılmaktadır (Brown ve Olander, 1987; Arda ve ark., 1997). Koyunlardaki *C. pseudotuberculosis* infeksiyonlarının direkt teşhisinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bunlar arasında, özellikle hastalığın visceral formunda lezyonlu lenf yumruları ve organların yeterince palpe edilememesi ve bu mümkün olsa bile bulguların spesifik olmaması, diğer yandan infeksiyonun inkubasyon süresinin uzun olması ve yüzeysel lenf yumrularının apseleşmesine kadar geçen sürede dikkati çekecek önemli bir klinik bulgu olmaması sayılabilir. Ayrıca her hastalık olgusunda infeksiyonun eksternal formuna ait klinik bulgular da oluşmayabilmektedir (Shigidi, 1979; Brown ve ark., 1986). Bunlardan dolayı infekte ve reaktör hayvanların tespitine yönelik güvenilir, pratik bir indirekt teşhis yönteminin geliştirilmesi yönünde bir çok çalışma yapılmıştır. KLA'in indirekt teşhisinde lam ve tüp aglütinasyon, agar jel difüzyon, KF, IHA, HIT, AHI ve SHI testi gibi bir çok test geliştirilmiştir. Bu testlerin çoğu, etkenin ekzotoksinine karşı oluşan antikorları saptamaya yöneliktir. Söz konusu testlerin spesifite ve sensitiviteilerinin düşük olmasının yanında, özellikle hemoliz testlerinin standardizasyonları da güçtür (Ayers, 1977; Brown ve ark., 1986; Ter Laak ve ark., 1992). ELISA teknikleri yaklaşık 20 yıldan beri KLA ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır (Ter Laak ve ark., 1992). Koyun ve keçilerde, *C. pseudotuberculosis*'in ekzotoksin ve somatik antijenlerine karşı oluşan antikorların ekzotoksin ELISA, sonike ELISA, dot-blot ELISA ve çift antikor sandviç ELISA teknikleri ile belirlenebildiği bildirilmektedir (Maki ve ark., 1985; Sutherland ve ark., 1992; Ter Laak ve ark., 1992; Prodhan ve ark., 1993; Serikawa ve ark., 1993; Paton ve ark., 1995).

Koyun ve keçilerde *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların saptanmasında, ELISA tekniğinin kullanımı son yıllarda artış göstermektedir. Bu teknikte kullanılan antijenler farklı olabilmektedir. Genel olarak, sonike ve ekzotoksin olmak üzere iki farklı antijen kullanılmaktadır. Bu antijenlerin kullanıldığı çalışmalarda hazırlama tekniklerinde de farklılıklar bulunmaktadır (Hsu ve ark., 1985; Egen ve ark., 1989; Kuria ve Holstad, 1989a; Pepin ve ark., 1988; Ellis ve ark., 1990; Ter Laak ve ark., 1992; Paton ve ark., 1995).

Maki ve ark. (1985), koyunlarda KLA ile ilgili olarak 5 farklı sonike ELISA antijeni hazırlamışlardır. Araştırmacılar antijenleri, etkeni sıvı kültürde üretilip, santrifüje ettikten sonra oluşan peletten hazırlamışlardır. Bunlar; direkt peletin kullanıldığı tüm hücre antijeni, peletin 3 dk sonike edilmesiyle elde edilen antijen, peletin 6 saat dietil eterle muamelesiyle hazırlanan antijen, peletin 6 saat dietil eterle ekstraksiyonu ve 3 dk sonikasyonla elde edilen antijen ve ekstrakte edilen lipid tabakadır. Araştırmacılar hazırlanan bu antijenler arasında, en iyisinin 6 saat dietil eterle ekstraksiyon ve 3 dk sonikasyon yapılarak hazırlanan antijen olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, ekstrakte edilen lipid tabakası dışındaki 4 farklı sonike antijen benzer şekilde hazırlandıktan sonra, satranç tahtası yöntemi ile denendi. Negatif ve pozitif kontrol serumları ile yapılan denemelerde en iyi sonuç veren antijenin, Maki ve ark. (1985)'nin bulgularında olduğu gibi, 6 saat dietil eterle ekstraksiyon ve 3 dk sonikasyon yapılarak elde edilen antijen olduğu saptandı. Diğer yandan, bu çalışmada ELISA tekniklerinde kullanılan antijenlerin protein miktarlarının, literatür verisiyle yakın değerde olduğu görüldü (Ter Laak ve ark, 1992).

Chikamatsu ve ark. (1989), Japonya'da klinik olarak sağlıklı görünen ve KLA'ye karşı aşılammış 1.186 koyun kan serumunu ekzotoksin ELISA ve ID test ile incelemişlerdir. Araştırmacılar serum örneklerinden 466 (39.3)'sının ELISA, 330 (% 27.8)'unun da ID testle pozitif sonuç verdiğini ve testler arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada pseudotuberculosis klinik bulguları gösteren toplam 52 koyundan 48 (% 92.3)'i ekzotoksin ELISA ile 42 (% 80.7)'si de HIT ile pozitif bulunmuştur (Kuria ve Holstad, 1989a). Ellis ve ark. (1990) C. pseudotuberculosis aşısı ile aşılammış ve hastalığın eksternal formuna ait klinik bulgular gösteren 104 koyundan 63 (60.5)'ünü ekzotoksin ELISA, 78 (% 75.0)'ünü de sonike ELISA ile pozitif bulduklarını bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, aşılammış koyunlara ait 371 adet kan serum örneğinin ekzotoksin ELISA ile 96 (% 25.8)'sı pozitif, 275 (% 74.1)'i negatif; sonike ELISA

ile 82 (% 22.2)'si pozitif, 289 (% 77.8)'u da negatif bulundu. Ekzotoksin ve sonike antijenle yapılan testlerde elde edilen sonuçlar arasındaki farkın, istatistiksel açıdan önemsiz olduğu saptandı. Bu çalışmada elde edilen bulguların, diğer araştırmacıların bulgularından daha düşük olduğu görülmektedir (Chikamatsu ve ark., 1989; Kuria ve Holstad 1989a; Ellis ve ark., 1990). Chikamatsu ve ark. (1989)'nın yaptığı çalışmada elde edilen yüksek pozitiflik oranı, hayvanların yaşı ile ilgili olabilir. Söz konusu araştırmada, süt kuzusu dahil olmak üzere oldukça farklı yaştaki hayvanlar değerlendirilmiştir. Süt kuzuları, annelerinden maternal antikoru alabilmekte ve bu da pozitif hayvan sayısını artırabilmektedir. C. pseudotuberculosis ile doğal infekte koyunların yavrularındaki maternal antikor titresinin, aşılama sonrasındaki maternal antikordardan daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Paton ve ark., 1991). Ayrıca, aynı araştırmada 1 yaşın üzerindeki hayvan sayısının fazla olması, pozitiflik oranını artıracak bir diğer faktördür. Bir ve daha yukarı yaşlardaki hayvanların yılda 1 ya da 2 kez kırkımları yapılmakta, böylece deride oluşan kırkım yaralarıyla hastalık etkeni infekte hayvanlardan diğer hayvanlara bulaşarak sürüdeki infekte hayvan sayısı artabilmektedir. Kuria ve Holstad (1989a) ile Ellis ve ark. (1990) ise materyallerini, klinik olarak KLA semptomları gösteren koyunlardan almışlardır. Bu durumda söz konusu araştırmalarda pozitif hayvan sayısının, bu çalışmaya göre daha yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur.

Chikamatsu ve ark. (1989), örneklerden 329 (% 27.7)'unu ekzotoksin ELISA ve ID test ile pozitif; 719 (% 60.6)'unu her iki testle de negatif; 137 (% 11.6)'sini ELISA ile pozitif, ID testle negatif; 1 (% 0.1)'ini de ID testle pozitif, ELISA ile negatif saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise aşısız hayvanlara ait serum örneklerinin 51 (% 13.5)'i hem ekzotoksin hem de sonike ELISA teknikleri ile pozitif, 249 (% 67.1) örnek ise her iki testle negatif bulundu. Serum örneklerinin 36 (% 9.7)'sı ekzotoksin ELISA ile pozitif, sonike ELISA ile negatif; 20 (% 5.3) serum ise ekzotoksin ELISA ile negatif, sonike ELISA ile pozitif bulundu. Testler birlikte değerlendirildiğinde her iki çalışmada da ekzotoksin ELISA ile pozitiflik oranının daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu bulgu, ekzotoksin ELISA tekniğinin, hem ID test hem de sonike ELISA'ya göre sensitivitesinin daha yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. Diğer yandan serumların infeksiyonun hangi döneminde

alındığının da bu durum üzerine etkisi vardır. İnfekte hayvanlarda *C. pseudotuberculosis* ekzotoksininden daha önce somatik antijenlerine karşı antikor sentezlendiği, ancak daha sonraki dönemlerde somatik antijenlere karşı sentezlenen antikor oranında bir azalma olurken, ekzotoksin antikorlarında yükselme olduğu bildirilmiştir (Paton ve ark., 1995).

KLA'e karşı aşılanan koyunlarda oluşan antikorlar, sonike ve ekzotoksin ELISA ile tespit edilebilmektedir (Sutherland ve ark., 1992). Paton ve ark. (1995) pseudotuberkulose karşı uyguladıkları enterotoksemi + tetanoz + KLA toksoid aşısına ve ayrıca koyunlarda kırkım yaraları oluşturarak meydana gelen doğal infeksiyona karşı oluşan antikor titrelerini, ekzotoksin ve sonike ELISA ile saptamışlardır. Benzer bir çalışmada, *C. perfringens* tip D + *C. tetani* + *C. pseudotuberculosis* tüm hücre + toksoid aşısının korumadaki gücü aynı testlerle belirlenmiştir (Pionkowski ve ark., 1998). Sutherland ve ark. (1992) ise *C. pseudotuberculosis* toksoid aşısının kullanıldığı koyunlarda, antikor titresini ekzotoksin ve sonike ELISA teknikleri ile incelemişlerdir. Her üç çalışmada da, ekzotoksin ELISA ile daha yüksek titrede antikor yanıtı saptanmıştır. Bu çalışmada 100 adet aşılı koyun kan serumundan 76 (% 76.0)'sı ekzotoksin ELISA, 37 (% 37.0)'si de sonike ELISA ile pozitif bulundu. Her iki testle örneklerden 33 (% 33.0)'ü pozitif, 18 (% 18.0)'i negatif olarak değerlendirilirken; 44 (% 44.0) serumun ekzotoksin ELISA ile pozitif, sonike ELISA ile negatif; 4 (% 4.0) serum örneğinin de sonike ELISA ile pozitif, ekzotoksin ELISA ile negatif sonuç verdiği saptandı. Ekzotoksin ELISA ile pozitif saptanan serum sayısının, sonike ELISA ile pozitif bulunan serum sayısından yüksek olması diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlikler göstermektedir. Bu benzerlik hayvanların toksoid aşılarla aşılanmış olması ile açıklanabilir.

Pionkowski ve ark. (1998) gerçekleştirdikleri çalışmada, en yüksek antikor titresinin ikinci aşı uygulanmasından sonraki 8. haftada sonike ELISA ile elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, aşılama sonrasında hayvanlardan sadece bir kez kan alındığından dolayı, elde edilen sonuçlar ile Pionkowski ve ark. (1998)'nin bulgularını tartışmak mümkün olmadı.

Koyun ve keçilerde *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların saptanmasında, modifiye ELISA tekniklerinden dot-blot ELISA da kullanılmaktadır. Prodhan ve ark. (1993), toplam 145 adet 2 yaşlı keçi kan serumundan 27 (% 18.6)'sini dot-blot ELISA, 36 (% 24.8)'sini da SHI test ile pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar çalışmalarında serum örneklerinden 27 (% 18,6)'sinin her iki testle pozitif; 9 (% 6.2)'unun SHI test ile pozitif, dot-blot ELISA ile negatif sonuç verdiğini; sadece 1 (% 0.6) serumun ise dot-blot ELISA ile pozitif, SHI testle negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Testler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli bulunduğu çalışmada ayrıca, KLA'in teşhisinde dot-blot ELISA'nın SHI testinden daha güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, incelenen toplam 471 serum örneğinden 181 (% 38.5)'i; aşısız 371 örnekten 122 (% 32.8)'si ve aşılı 100 örnekten 59 (% 59)'u dot-blot ELISA ile pozitif bulundu. Test, ekzotoksin ve sonike ELISA ile karşılaştırıldığında, aşısız hayvanlardan 49 (% 13.2)'u, aşılı hayvanlardan da 2 (% 2)'si dot-blot ELISA ile pozitif, toksin ve sonike ELISA ile negatif olarak saptandı. Pozitif bulunan serum yüzdeleri arasındaki fark dikkate alındığında, dot-blot ELISA ile ekzotoksin ELISA ve sonike ELISA arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli bulundu. Bu araştırmada dot-blot ELISA ile pozitif olarak değerlendirilen serum örneklerinin, Prodhan ve ark. (1993)'nin pozitif buldukları serum oranından daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu fark, her iki araştırmada çalışılan serum örneklerinin koyun ve keçi olarak farklı hayvan türlerine ait olması, çalışılan ülkelerdeki KLA prevalansının koyun ve keçilerde muhtemelen farklı oranlarda olması ile açıklanabilir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan antijen ile Prodhan ve ark. (1993)'nin kullandıkları antijen arasında farklılık bulunması, elde edilen bulguların farklılığına neden olabilecek bir başka faktördür. Bu çalışmada, sonike antijen kullanılarak, pozitif ve negatif serumlarla yapılan dot-blot ELISA'nın standardizasyon denemelerinde ekzotoksin antijenle yapılan standardizasyon

ELISA tekniğinin, ilk kez bu çalışmada kullanıldığı görüldü. Bu nedenle, konu ile ilgili çalışmaların daha fazla sayıda örnekle ve diğer testlerle karşılaştırılmalı olarak yapılması sonucunda, KLA'le ilgili çalışmalarda yeni bir teknik olarak dot-blot ELISA kullanılabilir.

Koyun ve keçilerde *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılan indirekt testlerin sensitivite, spesifite ve güvenilirlikleri ile ilgili oldukça farklı görüş ve sonuçlar bildirilmiştir. Awad (1960), koyunlarda hastalığın teşhisinde lam aglütinasyon testinin güvenilirliğinin % 96.5 olduğunu; Zaki (1968), % 4.1 oranında yanlış pozitif sonuç vermesine rağmen, AHI testinin hastalığın teşhisinde güvenilir ve spesifik bir test olduğunu; Holstad (1986b), keçilerde tüp aglütinasyon ve HIT testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin % 96.0 olduğunu bildirmişlerdir. Shigidi (1979) KF, jel difüzyon, AHI, IHA ve tüp aglütinasyon testlerinden hiç birinin koyunların KLA'inin teşhisinde % 100 güvenilir olmadığını; Burrell (1980a, 1980b) ise hastalığın teşhisinde HIT ve ID testlerinin güvenilir birer metot olduklarını ifade etmişlerdir. Bu bulgular aşılı veya infekte koyun ve keçilerdeki antikor titresinin saptanmasında kullanılan ELISA teknikleri için de geçerli bir durumdur. Kuria ve Holstad (1989a), koyunlar için KLA'in teşhisinde ekzotoksin ELISA'nın, HIT'inden daha güvenilir sonuçlar verdiğini; Chikamatsu ve ark. (1989), koyunlarda ID testinin sensitivitesinin ekzotoksin ELISA'dan daha düşük olduğunu, ancak toksin ELISA'nın ID testinden daha fazla non-spesifik reaksiyonlar verdiğini bildirmişlerdir. Ellis ve ark. (1990), koyun kan serumlarında ekzotoksin ELISA'nın % 49.2, sonike ELISA'nın da % 64.7 oranında yanlış pozitif sonuç verdiğini ifade etmişlerdir. Sutherland ve ark. (1992), ekzotoksin ELISA'nın duyarlılığının aşılı hayvanlarda % 83.0, aşısızlarda % 97.0, özgüllüğünün % 33.0; sonike ELISA'nın sensitivitesinin aşılı hayvanlarda % 77.0, aşısızlarda % 93.0, spesifitesinin de % 42.0 olduğunu bildirmişlerdir. Sutherland ve ark. (1987) bir başka çalışmalarında, ekzotoksin ve sonike ELISA tekniklerinden sadece biri kullanıldığında duyarlılığın % 67.0-85.0, her iki testin birlikte yapılması durumunda % 92.0, spesifitenin de % 30.0-77.0 arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Başka bir çalışmada da toksin ELISA'nın duyarlılığının deneysel olarak infekte edilen koyunlarda % 97.0, doğal infekte koyunlarda ise % 81.0 olduğu bildirilmiştir (Paton

ve ark., 1994). Maki ve ark. (1985) ise sonike ELISA'nın sensitivitesinin, ekzotoksin ELISA'dan daha düşük olduğunu, ancak her iki testin sensitivitesinin AHI testinden daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Ter Laak ve ark. (1992), ekzotoksin antijeni kullanıldığında çift antikor sandviç ELISA'nın duyarlılık ve özgüllüğünün yaklaşık % 100 olduğunu ifade etmişlerdir. Dot-blot ELISA ile ilgili olarak ekzotoksin antijeni kullanıldığında testin sensitivitesinin % 94.0, spesifitesinin de % 99.0 olduğu bildirilmiştir (Proadhan ve ark., 1993).

Bu araştırmada, incelenen serum örnekleri toplam olarak değerlendirildiğinde ekzotoksin ELISA'nın sensitivitesi % 82.9, spesifitesi % 65.9; sonike ELISA'nın sensitivitesi % 80.0, spesifitesi % 64.2; her iki test birlikte değerlendirildiğinde duyarlılığın % 93.3, özgüllüğün de % 70.8 olduğu saptandı. Dot-blot ELISA'nın ise sensitivitesi % 83.3, spesifitesi de % 65.5 olarak tespit edildi. Ekzotoksin ve sonike ELISA ile ilgili bu çalışmada elde edilen bulgular, bazı araştırmalarla uyumlu bulunurken (Maki ve ark., 1995; Sutherland ve ark., 1987), sensitivitenin bazı çalışmalardan (Chikamatsu ve ark., 1989; Sutherland ve ark., 1992) daha yüksek olduğu görüldü. Bu yüksek oran, bu çalışmada kullanılan antijenlerin daha ileri düzeyde purifiye edilmesinden kaynaklanmış olabilir. Bu araştırmada dot-blot ELISA ile ilgili sensitivite ve spesifite sonuçlarının, Proadhan ve ark. (1993)'nin bulgularından daha düşük olması, araştırmacıların çalışmalarını farklı hayvan türü ile yapmış olmaları veya hayvanların geçmişte ya da halen subklinik bir *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonu geçiriyor olmaları ile ilişkili olabilir.

KLA'in teşhisinde kullanılan ELISA tekniklerinin duyarlılık ve özgüllükleri ile ilgili olarak oldukça farklı sonuçların elde edilmesinde çeşitli faktörlerin etkisi vardır. Bunlar arasında, *C. pseudotuberculosis*'in somatik ve ekzotoksin antijenlerinin oldukça kompleks bir yapıda olmaları sayılabilir. Etkenin hücre duvarının elektroforetik analizinde 30'dan fazla spesifik protein bantının, ekzotoksinin analizinde de 15 - 31 kDa arasında 7 farklı bantın olduğu saptanmıştır (Ellis ve ark., 1991; Muckle ve ark., 1992). Bu kompleks antijenik yapı diğer korinebakteriyel antijenlerle kros reaksiyon verebilmektedir. *C. pseudotuberculosis*'in fakültatif intraselüler bir bakteri olması bu derece farklı

sonuçların alınmasında etkili olabilecek başka bir faktördür. Aşılı hayvanlarda, kullanılan aşı *C. pseudotuberculosis*'in tüm hücre, ekzotoksin ve diğer bazı antijenlerini de içerdiğinden, bu oldukça farklı antijenlere karşı, değişik titrede ve farklı türde antikorlar sentezlenmektedir. ELISA antikora spesifik bir teknik olduğundan, testle belli antikorlar saptanamamakta ve bu durum ELISA tekniklerinin güvenilirliğini azaltabilmektedir.

Koyun kan serumlarının ekzotoksin, sonike ve dot-blot ELISA teknikleri ile incelendiğı bu çalışmada, her üç testle de yüksek oranda pozitif bulunan serum örneklerinin Ceylanpınar ve Gözlü Tarım İşletmelerinden sağlanan koyunlara ait olduğu görüldü. Bu yüksek pozitiflik oranı, KLA prevalensinin koyun populasyonları arasında oldukça farklı düzeylerde olması ile açıklanabilir.



5. SONUÇ

Bu çalışmada, ekzotoksin ELISA ve sonike ELISA teknikleri için *C. pseudotuberculosis* Pl-4 suşundan ekzotoksin ve sonike antijenler ile dot-blot ELISA tekniği için de aynı suştan sonike antijen hazırlanarak, aşı ve aşızsız koyunlarda etkene karşı oluşan antikorların saptanması amacıyla her üç test standardize edildi. Gerçekleştirilen bu araştırma ile Türkiye’de, pseudotuberkulosisle ilgili olarak her üç teknik, gerek ayrı ayrı ve gerekse birlikte olarak ilk kez kullanılmış oldu.

C. pseudotuberculosis antikorlarının saptanmasında, sonike antijen kullanılarak yapılan dot-blot ELISA tekniği, ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiş oldu. Bundan dolayı, bu teknikle ilgili çalışmaların detaylandırılması ve diğer tekniklerle karşılaştırmalı olarak incelenmesi ile hastalığın teşhisinde dot-blot ELISA tekniğinin uygulanabilirliği gündeme gelebilecektir.

Koyunlarda *C. pseudotuberculosis* infeksiyonunun teşhisinde sonike ve ekzotoksin ELISA tekniklerinin birlikte kullanılması durumunda, testlerin spesifite ve sensitivitelelerinin daha yüksek olduğu ortaya konuldu. Ayrıca ekzotoksin ELISA’nın, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinden daha güvenilir sonuçlar verdiği görüldü. Dot-blot ELISA’nın hastalığın teşhisinde ilave bir teçhizata ihtiyaç duymaması nedeniyle bir çok laboratuvarda yapılabileceği kanısına varıldı.

Aşıllı hayvanlardaki ekzotoksin ELISA sonuçlarının, *C. pseudotuberculosis* bakterin + toksoid aşısı ile aşılanan hayvanlarda, ekzotoksin ELISA ile daha fazla hayvanın pozitif sonuç verdiği hakkındaki görüşlerle desteklendiği görüldü.

Bu araştırma ile Ceylanpınar, Tahirova, Altınova, Gözlü ve Polatlı Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü’ne bağlı koyunculuk ünitelerinde, KLA’in varlığı direkt ve indirekt yöntemlerle ortaya konularak, bu bulguların daha sonra yapılacak çalışmalara bir temel oluşturacağı düşünüldü.

Koyunların pseudotuberkulosisi ile ilgili olarak, ekonomik ve pratik olan ELISA tekniklerinin hastalığın rutin teşhisinde ve ayrıca bir tarama testi olarak da laboratuvar çalışmalarında kullanılabileceği sonucuna varıldı.

ÖZET

Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in ELISA ve Dot-blot ELISA ile Teşhisi

Bu çalışmada, koyun kan serumlarında *C. pseudotuberculosis* antikorlarının saptanması için; ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA teknikleri standardize edilerek, infeksiyonun rutin teşhisinde ve bir tarama testi olarak da laboratuvar çalışmalarında kullanılabilirliklerinin ortaya konulması amaçlandı.

Araştırmada, Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne bağlı Ceylanpınar, Tahirova, Altınova, Gözlü ve Polatlı Tarım İşletmelerinden sağlanan, 100 adeti aşıllı hayvanlardan olmak üzere toplam 471 adet koyun kan serumu incelendi. ELISA antijenleri A. Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'ndan sağlanan *C. pseudotuberculosis* PI-4 suşundan hazırlandı.

Çalışmada, toplam 471 serum örneğinden 172 (% 36.5)'si ekzotoksin ELISA ile pozitif, 299 (% 63.5)'u negatif; 119 (% 25.2)'u sonike ELISA ile pozitif, 352 (% 74.8)'si negatif; 181 (% 38.5)'i dot-blot ELISA ile pozitif, 290 (% 61.5)'i ise negatif olarak saptandı. Aşısız hayvanlara ait serumlardan ekzotoksin ELISA ile 96 (% 25.8)'si pozitif, 275 (% 74.1)'i negatif, sonike ELISA ile 82 (% 22.2)'si pozitif, 289 (% 77.8)'u negatif bulunurken; dot-blot ELISA ile 122 (% 32.8)'si pozitif, 249 (% 67.2)'u negatif bulundu. Aşıllı koyun serumlarından 76 (% 76)'sı ekzotoksin ELISA, 37 (% 37)'si sonike ELISA ve 59 (% 59)'u da dot-blot ELISA ile pozitif olarak değerlendirildi.

Test serumları toplam olarak değerlendirildiğinde, ekzotoksin ELISA'nın sensitivitesi % 82.9, spesifitesi % 65.9; sonike ELISA'nın sensitivitesi % 80.0, spesifitesi % 64.2; her iki test birlikte değerlendirildiğinde ise sensitivite % 93.3, spesifite de % 70.8 olarak tespit edildi. Dot-blot ELISA'nın sensitivitesinin % 83.3, spesifitesinin ise % 65.5 olduğu saptandı. Ekzotoksin ve sonike ELISA tekniklerinin birlikte kullanılması durumunda, testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin daha yüksek olduğu ortaya konuldu. Ayrıca ekzotoksin ELISA'nın, sonike ve dot-blot ELISA tekniklerinden daha güvenilir sonuçlar verdiği görüldü.

Bu araştırmada elde edilen sonuçlar, koyunların kazeöz lenfadenitisinde ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinin, hastalığın rutin teşhisinde ve bir tarama testi olarak da laboratuvar çalışmalarında uygulanabileceğini gösterdi.

Anahtar Sözcükler: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Dot-blot ELISA, Ekzotoksin ELISA, Koyun, Sonike ELISA

SUMMARY

Diagnosis of Ovine *Corynebacterium pseudotuberculosis* by ELISA and Dot-blot ELISA

The aim of this study was to standardize the three techniques designated as exotoxin ELISA, sonicated ELISA and dot-blot ELISA in the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep sera and to evaluate the usefulness of these techniques in the routine diagnosis and screening of *C. pseudotuberculosis* infection.

A total of 471 sheep sera, 100 of which were from vaccinated animals, obtained from Ceylanpınar, Tahirova, Altınova, Gözlü and Polatlı agriculture administrations subordinating Agriculture Administrations Directory were examined. ELISA antigens were prepared from *C. pseudotuberculosis* PI-4 strain provided from the culture collection of the Department of Microbiology of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Ankara.

Among 471 serum samples, 172 (36.5 %), 119 (25.2 %) and 181 (38.5 %) sera were positive and 299 (63.5 %), 352 (74.8 %) and 290 (61.5 %) sera were negative by exotoxin ELISA, sonicated ELISA and dot-blot ELISA techniques, respectively. In the examination of serum samples obtained from non-vaccinated animals, 96 (25.8 %), 82 (22.2 %) and 122 (32.8 %) were positive and 275 (74.1 %), 289 (77.8 %) and 249 (67.2 %) serum samples were negative by the same techniques, respectively. Concerning the sera taken from vaccinated sheep, 76 (76 %), 37 (37 %) and 59 (59 %) were found to be positive by exotoxin ELISA, sonicated ELISA and dot-blot ELISA, respectively.

When the evaluation of total test sera was made, sensitivities and specificities of the three techniques were found as follows, respectively: Exotoxin ELISA, 82.9 %, 65.9 %; sonicated ELISA, 80.0 %, 64.2 %; dot-blot ELISA, 83.3 %, 66.5 %. When the exotoxin and sonicated ELISA were evaluated together, sensitivity and specificity were estimated as 93.3 % and 70.8 %, respectively. According to the results of these evaluations, when exotoxin and sonicated ELISA techniques were performed together, sensitivities and specificities of the tests were found to be higher and exotoxin ELISA was observed to give more reliable results than the other two techniques.

The results obtained in this research showed that, exotoxin ELISA, sonicated ELISA and dot-blot ELISA techniques could be performed as screening tests for the routine diagnosis of the caseous lymphadenitis disease of sheep.

Key Words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Dot-blot ELISA, Exotoxin ELISA, sheep, sonicated ELISA

KAYNAKLAR

- AFZAL, M., SAKIR, M., HUSSAIN, M. H. (1996). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection and lymphadenitis (taoia or mala) in the camel. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, **28**: 158-162.
- ALANSO, J. L., SIMON, M. C., GIRONES, O., MUZQUIZ, J. L., ORTEGA, C., GARCIA, J. (1992). The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. *Res. Vet. Sci.*, **52**: 267-272.
- ALEMAN, M., SPIER, S. J., WILSON, W. D., DOHERR, M. (1996). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982-1993). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **209**: 804-809.
- Al-RAWASHDEH, O. F., Al-QUDAH, K. M. (2000). Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan. *J. Vet. Med. (B)*, **47**: 287-293.
- AUGUSTINE, J. L., RENSCHAW, H. W. (1986). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common baryyard fomites. *Am. J. Vet. Res.*, **47**: 713-715.
- ARDA, M., MİNBAŞ, A., LELOĞLU, N., AYDIN, N., KAHRAMAN, M., AKAY, Ö., ILGAZ, A., İZGÜR, M., DİKER, K. S. (1997). Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı. s. 167-175. Medisan Yay., No: 26. Ankara.
- ARGUN, T. (1951). Hayvanlarda Salgın ve Parazitli Hastalıklar Kitabı. s.157-159. Pulhan Matbaası. İstanbul.
- AYERS, J. L. (1977). Caseous lymphadenitis in goats and sheep: A review of diagnosis, pathogenesis and immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **171**: 1251-1254.
- AYDIN, N. (1977). Corynebacterium pseudotuberculosis ovis Suşlarının ve Ekzotoksinlerinin Antijenik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yay. 331. Çalışmalar 231. Doktora Tezi. Ankara.
- AWAD, F. I. (1960). Serologic investigation of pseudotuberculosis in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **21**: 251-253.
- BATEY, R. G. (1986a). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. *Aust. Vet. J.*, **63**: 269-272.
- BATEY, R. G. (1986b). The effect of caseous lymphadenitis on body condition and weight of Merinos mutton carcasses. *Aust. Vet. J.*, **63**: 268.
- BATEY, R. G., SPEED, C. M., KOBES, C. J. (1986). Prevalence and distribution of caseous lymphadenitis in Feral goats. *Aust. Vet. J.*, **63**: 33-36.

- BÖĞRÜN, Ö., BERKER, R. (1973). Marmara bölgesi koyunlarında psödotuberkülozis insidensi ve etken izolasyonu. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg.*, **2**: 35-49.
- BRAITHWAITE, C. E., SMITH, E. E., SONGER, J. G., REINE, A. H. (1993). Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, **38**: 59-70.
- BRAVERMAN, Y., CHIZOV-GINZBURG, A., SARAN, A., WINKLER, M. (1998). The role of houseflies (*Musca domestica*) in transmitting the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Israeli dairy herds. *Israel J. Vet. Med.*, **53**: 7-10.
- BROGDEN, K. A., CHEDID, L., CUTLIP, R. C., LEHMKUHL, H. D., SACKS, J. (1990). Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. *Am. J. Vet. Res.*, **51**: 200-202.
- BROGDEN, K. A., CUTLIP, R. C., LEHMKUHL, H. D. (1984a). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Am. J. Vet. Res.*, **45**: 1532-1535.
- BROGDEN, K. A., CUTLIP, R. C., LEHMKUHL, H. D. (1984b). Comparison of protection induced in lambs by *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell and cell wall vaccines. *Am. J. Vet. Res.*, **45**: 2393-2395.
- BROWN, C. C., OLANDER, H. J., BIBERSTEIN, E. L., MORSE, S. M. (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, **47**: 1116-1119.
- BROWN, C. C., OLANDER, H. J. (1987). Caseous lymphadenitis of goats and sheep: A Review. *Vet. Bull.*, **57**: 1-11.
- BURRELL, D. H. (1980a). A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Res. Vet. Sci.*, **28**: 190-194.
- BURRELL, D. H. (1980b). A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. *Res. Vet. Sci.*, **28**: 234-237.
- CAMERON, C. M., MINNAAR, J. L. (1969). Immunization of mice against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **36**: 207-210.
- CAMERON, C. M., MINNAAR, J. L., ENGELBRECHT, M. M., PURDOM, M. R. (1972). Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **39**: 11-24.
- CHIKAMATSU, S., ZHAO, H. K., KIKUCHI, N., HIRAMUNE, T. (1989). Seroepidemiological survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep in Japan using enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **51**: 887-890.

- DERCKSEN, D. P., TER LAAK, E. A., SCHREUDER, B. E. C. (1996). Eradication programme for caseous lymphadenitis in goats in the Netherlands. *Vet. Rec.*, **138**: 237.
- DOTY, R. B., DUNNE, H. W., HOKANSON, J. F., REID, J. J. (1964). A comparison of toxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the development of a diagnostic skin test for caseous lymphadenitis of sheep and goats. *Am. J. Vet. Res.*, **25**: 1679-1684.
- EGEN, N. B., CUEVAS, W. A., McNAMARA, P. J., SAMMONS, D. W., HUMPHREYS, R., SONGER, J. G. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.*, **50**: 1319-1322.
- EGGLETON, D. G., DOIDGE, C. V., MIDDLETON, H. D., MINTY, D. W. (1991a). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Aus. Vet. J.*, **68**: 320-322.
- EGGLETON, D. G., HAYNES, J. A., MIDDLETON, H. D., COX, J. C. (1991b). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Aust. Vet. J.*, **68**: 322-325.
- EGGLETON, D. G., MIDDLETON, H. D., DOIDGE, C. V., MINTY, D. W. (1991c). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J.*, **68**: 317-320.
- ELLIS, J. A. (1988). Immunophenotype of pulmonary cellular infiltrates in sheep with visceral caseous lymphadenitis. *Vet. Pathol.*, **25**: 362-368.
- ELLIS, J. A., CAMPOS, M., SNYDER, M., CHELAK, B., HAINES, D. M. (1995). Local production of tumor necrosis factor- α in corynebacterial pulmonary lesions in sheep. *Vet. Pathol.*, **32**: 68-71.
- ELLIS, J. A., HAWK, D. H., HOLLER, L. D., MILLS, K. W., PRATT, D. L. (1990). Differential antibody response to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **196**: 1609-1613.
- ELLIS, J. A., HAWK, D. A., MILLS, K. W., PRATT, D. L. (1991). Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **28**: 303-316.
- ERGANIŞ, O., KAYA, O., ATEŞ, M., İSTANBULLUOĞLU, E. (1990). Konya EBK kombinasyonunda kesilen koyunlardaki apseli lenf yumruları üzerine mikrobiyolojik ve serolojik incelemeler. *Veterinarium*, **1**: 8-11.
- GATES, N. L., EVERSON, D. O., HULET, C. V. (1977). Effects of thin ewe syndrome on reproductive efficiency. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **171**: 1266-1267.

- HARD, G. C. (1975). Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, **12**: 1439-1449.
- HODGSON, A. L. M., KRYWULT, J., CORNER, L. A., ROTHEL, J. S., RADFORD, A. J. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.*, **60**: 1900-1905.
- HOLSTAD, G. (1986a). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats V. Relationship between the infection and lesions resulting from vaccination against pseudotuberculosis. *Acta Vet. Scand.*, **27**: 617-622.
- HOLSTAD, G. (1986b). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats I. Evaluation of two serological diagnostic tests. *Acta Vet. Scand.*, **27**: 575-583.
- HSU, T. Y., RENSHAW, H. W., LIVINGSTON, C. W., AUGUSTINE, J. L., ZINK, D. L., GAUER, B. B. (1985). *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxin: Fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, **46**: 1206-1211.
- İZGÜR, M., AKAN, M., İLHAN, Z. (1999). Koyunlarda kazeöz lenfadenitis olgularından izole edilen etkenler. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, **46**: 43-50.
- JONES, D., COLLINS, M. D. (1986). Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, Sec. 15, Ed: MURRAY, R. G. E., BRENNER, D. J., BRYANT, M. R., HOLT, J. H., KRIEG, N. R., MOULDER, J. W., PFENNING, N., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T. Williams and Wilkins Com. Baltimore.
- KAHRAMAN, M., MERT, N., ÇETİN, C., ÖZFİLİZ, N., MISIRLIOĞLU, D., SÖNMEZ, G., ÇARLI, K. T., ÖZBİLGİN, S., ÜLGEN, M., YAKIŞIK, M., GÜNDÜZ, H. (1998). Kobaylarda *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*)'in deneysel enfeksiyonu üzerinde araştırmalar. *Veterinarium*, **9**: 46-50.
- KANEKO, J. J. (1980). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 3 rd Ed., p. 97-119. Academic Press, Orlando-Florida.
- KESKİNTEPE, H. (1976a). Growth improvement and biochemical studies of *Corynebacterium ovis* strains. *F. Ü. Vet. Fak. Derg.*, **3**: 45-55.
- KESKİNTEPE, H. (1976b). Stabilization of *Corynebacterium ovis* antigens for serum agglutination test. *F. Ü. Vet. Fak. Derg.*, **3**: 84-93.
- KNIGHT, H. D. (1978). A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Cornell Vet.*, **68**: 220-237.

- KURIA, J. N. K., HOLSTAD, G. (1989a). Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep-correlation between the hemolysis inhibition test and the ELISA test. *Acta Vet. Scand.*, **30**: 109-110.
- KURIA, J. K. N., HOLSTAD, G. (1989b). A seroepidemiological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks in Southern Norway. *Acta Vet. Scand.*, **30**: 107-108.
- KUYUCUOĞLU, Y. (1995). Koyun Pseudotuberkülozunun Allerjik Deri Testi ile Teshisi Üzerinde Çalışmalar. S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Konya.
- KWAPINSKI, J. B. G. (1969). Analytical serology of *Corynebacterium* and *Erysipelothrix*. In: Analytical Serology of Microorganism. Ed: KWAPINSKI, J. B. G. Inter Science Publishers a Division of John Wiley-Sons. Newyork, London, Sydney, Toronto.
- LEAMASTER, B. R., SHEN, D. T., GORHAM, J. R., LEATHERS, C. W., WELLS, H. D. (1987). Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. *Am. J. Vet. Res.*, **48**: 869-872.
- LLOYD, S. (1994). Caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Practice*, **16**: 24-29.
- LLOYD, S., LINDSAY, H. J., SLATER, J. D., JACKSON, P. G. G. (1990). Caseous lymphadenitis in goats in England. *Vet. Rec.*, **127**: 478.
- LOVELL, R., ZAKI, M. M. (1966a). Studies on growth products of *Corynebacterium ovis*. I. The exotoxin and its lethal action on white mice. *Res. Vet. Sci.*, **7**: 302-306.
- LOVELL, R., ZAKI, M. M. (1966b). Studies on growth products of *Corynebacterium ovis*. II. Other activites and their relationship. *Res. Vet. Sci.*, **7**: 307-311.
- LUND, A., ALMLID, T., LARSEN, H. J., STEINE, T. (1982a). Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. *Acta Vet. Scand.*, **23**: 473-482.
- LUND, A., ALMLID, T., STEINE, T., LARSEN, H. J. (1982b). Colostral transfer in the goat of antibodies against *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the antibody status of kids during the first 10 months of life. *Acta Vet. Scand.*, **23**: 483-489.
- MADDY, K. T. (1953). Caseous lymphadenitis of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **122**: 257-259.
- MAKI, L. R., SHEN, S. H., BERGSTROM, R. C., STETZENBACH, L. D. (1985). Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, **46**: 212-214.

- MENZIES, P. I., MUCKLE, C. A., BROGDEN, K. A., ROBINSON, L. (1991). A field trial to evaluate a whole cell vaccine for the prevention of caseous lymphadenitis in sheep and goat flocks. *Can. J. Vet. Res.*, **55**: 362-366.
- MUCKLE, C. A., GYLES, C. L. (1982). Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Can. J. Comp. Med.*, **46**: 206-208.
- MUCKLE, C. A., MENZIES, P. I., LI Y., HWANG, Y. T., WESENBEECK, M. V. (1992). Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, **30**: 47-58.
- MUZ, A., ERÖKSÜZ, H., ÖNGÖR, H., ERTAŞ, H. B., KAYA, A., KALENDER, H. (1995). Elazığ Et ve Balık Kurumu mezbahasında kesilen koyunlardaki apseli preskapular lenf yumruları üzerinde mikrobiyolojik, serolojik ve patolojik incelemeler. *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.*, **9**: 204-211.
- PATON, M. W., MERCY, A. R., SUTHERLAND, S. S., ELLIS, T. M., DUDA, S. R. (1991). The effect of antibody to caseous lymphadenitis in ewes on the efficacy of vaccination in lambs. *Aust. Vet. J.*, **68**: 143-146.
- PATON, M. W., MERCY, A. R., WILKINSON, F. C., GARDNER, J. J., SUTHERLAND, S. S., ELLIS, T. M. (1988). The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. *Aust. Vet. J.*, **65**: 117-119.
- PATON, M. W., ROSE, I. R., HART, R. A., SUTHERLAND, S. S., MERCY, A. R., ELLIS, T. M., DHALIWAL, J. A. (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust. Vet. J.*, **71**: 47-49.
- PATON, M. W., SUTHERLAND, S. S., ROSE, I. R., HART, R. A., MERCY, A. R., ELLIS, T. M. (1995). The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. *Aust. Vet. J.*, **72**: 266-269.
- PEEL, M. M., PALMER, G. G., STACPOOLE, A. M., KEER, T. G. (1997). Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infec. Dis.*, **24**: 185-191.
- PEPIN, M., PARDON, P., LANTIER, F., MARLY, J., LEWIEUX, D., LAMAND, M. (1991). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: Kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet. Microbiol.*, **26**: 381-392.
- PEPIN, M., PARDON, P., MARLY, J., LANTIER, F. (1988). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. *Am. J. Vet. Res.*, **49**: 459-463.
- PEPIN, M., PARDON, P., MARLY, J., LANTIER, F., ARRIGO, J. L. (1993). Acquired immunity after primary caseous lymphadenitis in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **54**: 873-877.

- PEPIN, M., SEOW, H. F., CORNER, L., ROTHEL, J. S., HODSON, A. L. M., WOOD, P.R. (1997). Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.*, **28**: 149-163.
- PIONTKOWSKI, M. D., SHIVVERS, D. W. (1998). Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **212**: 1765-1768.
- PRODHAN, M. A. M., OLANDER, H. J., GARDNER, I. A. (1993). A comparison of dot-blot assay with the synergistic haemolytic inhibition test in goats naturally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Res. Comm.*, **17**: 193-196.
- RIZVI, S., GREEN, L. E., GLOVER, M. J. (1997). Caseous lymphadenitis: An increasing cause for concern. *Vet. Rec.*, **140**: 586.
- SAYIN, F. (1998). Pathological studies on ovine caseous lymphadenitis in Turkey. The 9TH Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology. p. 30. June 5-6. Zagreb, Croatia.
- SCOTT, P. R., COLLIE, D. D. S., HUME, L. H. (1997). Caseous lymphadenitis in a commercial ram stud in Scotland. *Vet. Rec.*, **141**: 548-549.
- SCHREUDER, B. E. C., TER LAAK, E. A., DERCKSEN, D. P. (1994). Eradication of caseous lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed ELISA technique. *Vet. Rec.*, **135**: 174-176.
- SERIKAWA, S., ITO, S., HATTA, T., KUSAKARI, N., SENNA, K., HIRAMUNE, T., KIKUCHI, N., YANAGAWA, R. (1994). Protection from caseous lymphadenitis in sheep by spraying iodine tincture on shearing wounds. *J. Vet. Med. Sci.*, **56**: 411-412.
- SERIKAWA, S., ITO, S., HATTA, T., KUSAKARI, N., SENNA, K., SAWARA, S., HIRAMUNE, T., KIKUCHI, N., YANAGAWA, R. (1993). Seroepidemiological evidence that shearing wounds are mainly responsible for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *J. Vet. Med. Sci.*, **55**: 691-692.
- SHIGIDI, M. T. A. (1979). A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Br. Vet. J.*, **135**: 172-177.
- SIMMONS, C. P., HODGSON, A. L. M., STRUGNELL, R. A. (1997). Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, **65**: 3048-3056.

- STANFORD, K., BROGDEN, K. A., McCLELLAND, L. A., KOZUB, G.C., AUDIBERT, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.*, **62**: 38-43.
- STEINMAN, A., ELAD, D., SHPIGEL, N. Y. (1999). Ulcerative lymphadenitis and coronet lesions in an Israeli dairy herd infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Rec.*, **145**: 604-606.
- STOOPS, S. G., RENSHAW, H. W., THILSTED, J. P. (1984). Ovine caseous lymphadenitis: Disease prevalence, lesion distribution and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from Western United States. *Am. J. Vet. Res.*, **45**: 557-561.
- SUTHERLAND, S. S., ELLIS, T. M., MERCY, A. R. (1987). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Aust. Vet. J.*, **64**: 263-266.
- SUTHERLAND, S. S., ELLIS, T. M., PATON, M. J., MERCY, A. R. (1992). Serological response of vaccinated sheep after challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Aust. Vet. J.*, **69**: 168-169.
- SUTHERLAND, S. S., HARD, R. A., BULLER, N. B. (1993). Ribotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. *Aust. Vet. J.*, **70**: 454-456.
- SUTHERLAND, S. S., HARD, R. A., BULLER, N. B. (1996). Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.*, **49**: 1-9.
- SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU, V. (1997). Biyoistatistik. 7. Baskı. s. 156-159. Hatiboğlu Yay., Ankara.
- TER LAAK, E. A., BOSCH, J., BIJL, G. C., SCREUDER, B. E. C. (1992). Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **53**: 1125-1132.
- THRUSFIELD, M. (1986). Serological Epidemiology. In: Veterinary Epidemiology. p. 175-185. Butterworth Co. London, Boston, Durban, Singapore, Sydney, Toronto.
- UYSAL, A., AK, S., TAN, H., BAKIREL, U. (1996). Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis*'e karşı bağışıklıkta BCG aşısının etkisi üzerine bir araştırma. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg.*, **27**: 207-213.
- UYSAL, A., AK, S., BEŞE, M. (1993). BCG aşısı kullanılarak koyunların yalancı tüberkülozuna (caseous lymphadenitis) karşı bağışıklığın sağlanması üzerine araştırmalar. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg.*, **24**: 95-106.

- WISECUP, W. G., BLANCHARD, D. D., NEIL, C. M. (1964). *Corynebacterium pseudotuberculosis* associated with rapidly occurring equine abscesses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **144**:152-154.
- YERUHAM, I., ELAD, D., VAN-HAM, M., SHPIGEL, N. Y., PERL, S. (1997). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: Clinical and epidemiological studies. *Vet. Rec.*, **140**: 423-427.
- YOZWIAK, M. L., SONGER, J. G. (1993). Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, **54** :392-397.
- ZAKI, M. M. (1968). The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium pseudotuberculosis* *Corynebacterium ovis* infection. *Res. Vet. Sci.*, **9**: 489-493.
- ZAKI, M. M., ABDEL-HAMID, Y. M. (1974). A comparative study of in vitro and in vivo tests for caseous lymphadenitis. *Res. Vet. Sci.*, **16**: 167-170.
- ZAITOUN, A. M. BAYOUMI, A. H. (1994). Some epidemiological studies on ovine pseudotuberculosis. *Assiut Vet. Med. J.*, **31**: 238-250.
- ZHAO, H. K., YONEKAWA, K., TAKAHASHI, T., KIKUCHI, N., HIRAMUNE, T., YANAGAWA, R. (1995). Isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from the cervical canal of clinically normal sows. *Res. Vet. Sci.*, **55**: 356-359.