

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sığır Tüberkülozunun Farklı Metotlar İle Karşılaştırmalı Teşhisi

Zafer SAYIN

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

KONYA-2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sığırlarda Tüberkülozun Farklı Metotlar İle Karşılaştırmalı Teşhisi

Zafer SAYIN

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 07102007 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2010

ÖNSÖZ

Tüberküloz, insanlarda ve hayvanlarda mikobakterium grubu mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, tüberküloz etkenleri ve konağın yangı hücrelerinin ilişkisine bağlı olarak özellikle solunum sistemi organları ve diğer organlarda tüberküllerin oluşumu ile karakterize kronik seyirli bir enfeksiyondur. Tüberküloz insanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarındandır. Enfeksiyon dünya üzerinde insan ve hayvanlardaki en önemli ölüm sebeplerindendir.

Dünya sağlık örgütü (WHO), verilerine göre 2006 yılında 14,4 milyon insanda tüberküloz vakası bildirilmiş ve 1,5 milyon insan ölmüştür, ayrıca WHO bu yılda enfeksiyon ile mücadele için yaklaşık olarak 2450 milyon dolar finanse etmiştir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'ne (OIE) göre ülkemizde, 2008 yılında 2458 sığırdaki tüberküloz enfeksiyonu belirlenmiştir. Etkenin zoonoz karakterde olması nedeni ile sığır tüberkülozu ile insan tüberkülozu arasında direkt ilişki bulunmaktadır. Sığır tüberkülozunun eradike edildiği ülkelerde insan tüberkülozu ile mücadelede büyük başarılar elde edilmiştir.

Enfeksiyonun sığırlarda önemli ekonomik kayıplara sebep olması ve zoonoz karakteri nedeni ile enfekte sığırların doğru ve güvenilir metotlar ile teşhis edilmesi ve bulaşmasının önlenmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, 5 farklı işletmede, kültür, Ziehl Neelsen boyama metodu ile bakteriyoskopi, PZR, PZR-REA, PPD deri testi, BOVIGAM (IFN- γ) test, PPD B ELISA, *M. bovis* sonikasyon ELISA test sonuçları mukayese edilerek sığırlarda tüberküloz enfeksiyonunun antemortem ve postmortem teşhisinde en iyi metot belirlenmeye çalışıldı.

Doktora tez çalışmam sırasında ilgi ve yardımlarını gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Osman ERGANİŞ'e, S.Ü Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Mehmet ATEŞ, Doç. Dr. U. Sait UÇAN, yakın ilgi ve alakasını gördüğüm Doç. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ'ye, Dr. Kürşat KAV, Arş. Gör. Aslı BALEVİ ve Dr. Zeki ARAS'a, saha çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ'e referans suşların sağlanmasındaki yardımlarından dolayı

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Dr. Erhan AKÇAY ve Dr. İsmail CEYHAN'a, tez çalışmama maddi katkılarından dolayı S.Ü. BAP koordinatörlüğüne, Prof. Dr. Enver YAZAR ve Yrd. Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR'e, çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen eşim Ülkü SAYIN'a, anne ve babama teşekkür ederim.

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR	X

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1. 1. Tanım	1
1. 2. Tarihçe.....	2
1. 3. Etiyoloji.....	4
1. 4. Epidemiyoloji.....	8
1. 5. Epizootiyoloji.....	10
1. 6. Bağışıklık	11
1. 6. 1. Tüberkülozda Doğal İmmünite	11
1. 6. 1. 2. Fagositoz	12
1. 6. 2. Tüberkülozda Kazanılan İmmünite.....	13
1. 6. 3. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu.....	14
1. 6. 4. Granülom Oluşumu	16
1. 7. Aşılama	16
1. 8. Teşhis	19
1. 8. 1. Bakteriyoskopi ve Kültür	19
1. 8. 2. Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi	20
1. 8. 2. 1. PPD Tüberkülin Deri Testi	20
1. 8. 2. 2. Gamma İnterferon (IFN- γ) Testi.....	22
1. 8. 2. 3. Lenfosit Poliferasyon Testi	24
1. 8. 3. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi	25
1. 8. 4. Moleküler Metotlar	27
1. 8. 5. Hayvan Deneyi.....	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2. 1. GEREÇ	30
2. 1. 1. Sığır Materyali	30

2. 1. 2. Referans mikobakterium suşları.....	31
2. 1. 3. Bakteriyoskopi	31
2. 1. 3. 1. Fenollü karbol Fuksin	31
2. 1. 3. 2. Asit-alkol	32
2. 1. 3. 3. Metilen Mavisi	32
2. 1. 4. Kültür	32
2. 1. 4. 1. Dekontaminant-Nötralizer	32
2. 1. 4. 2. Dekontaminat	32
2. 1. 4. 3. Bromcreasol purple solüsyonu.....	32
2. 1. 4. 4. Nötralizer.....	32
2. 1. 4. 5. Besiyerleri	33
2. 1. 4. 6. Gliserol.....	33
2. 1. 5. PPD Deri Testi	33
2. 1. 5. 1. Purifiye Protein Derivatı (PPD)	33
2. 1. 6. Gamma İnterferon Testi (IFN- γ).....	33
2. 1. 6. 1. BOVIGAM, <i>M. bovis</i> Gamma İnterferon Test Kiti	33
2. 1. 6. 2. IFN- γ uyarıcı antijen	34
2. 1. 7. ELISA	34
2. 1. 7. 1. Kaplama Antijeni	34
2. 1. 7. 2. Antijen Kaplama Bufferı.....	34
2. 1. 7. 3. Serum ve Konjugat Diluent: PBS (Fosfat buffer solüsyonu).....	35
2. 1. 7. 4. Yıkama solüsyonu	35
2. 1. 7. 5. Bloklama solüsyonu (% 1 BSA w/v)	35
2. 1. 7. 6. Konjugat.....	35
2. 1. 7. 7. Substrat.....	35
2. 1. 7. 8. Enzim Stop Solüsyonu (0,5 M H ₂ SO ₄)	35

2. 1. 7. 9. FTS (Fizyolojik tuzlu su)	35
2. 1. 7. 10. Pozitif ve negatif serumlar	36
2. 1. 8. PZR analizi.....	36
2. 1. 8. 1. DNA İzolasyonu.....	36
2. 1. 8. 1. 1. Dokudan DNA İzolasyonu	36
2. 1. 8. 1. 1. 1. Lizis Solüsyonu (pH 8)	36
2. 1. 8. 1. 2. Kültürden DNA İzolasyonu	36
2. 1. 8. 1. 2. 1. Tris-EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (TE)	36
2. 1. 8. 1. 2. 2. Lizozim	36
2. 1. 8. 1. 2. 3. SDS (Sodium dodesil sülfat).....	37
2. 1. 8. 1. 2. 4. Proteinaz K.....	37
2. 1. 8. 1. 2. 5. NaCl (5 M)	37
2. 1. 8. 1. 2. 6. N-acetyl-N, N, N-trimethyl amonyom bromür (CTAB)	37
2. 1. 8. 1. 2. 7. Soğuk Ethanol %70 (w/v)	37
2. 1. 8. 2. DNA Amplifikasyonu	37
2. 1. 8. 2. 1. Taq polimeraz	37
2. 1. 8. 2. 2. Deoksi nükleotid trifosfat set	37
2. 1. 8. 2. 3. Primerler.....	37
2. 1. 8. 2. 4. Marker	38
2. 1. 8. 2. 5. PZR Pozitif Kontroller	38
2. 1. 8. 2. 6. Agaroz jel Elektroforezi.....	38
2. 1. 8. 2. 6. 1. Tris asetat (TBE) tamponu (10X)	38
2. 1. 8. 2. 6. 2. Agarozj jel (% 1,5) (w/v)	38
2. 1. 8. 2. 6. 3. Etidyum bromür stok solüsyon	39
2. 1. 8. 2. 7. Yükleme tamponu	39
2. 1. 9. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA).....	39

2. 2. YÖNTEM.....	40
2. 2. 1. Bakteriyoskopi	40
2. 2. 1. 1. Ziehl Neelsen Boyama	40
2. 2. 2. Kültür	40
2. 2. 2. 1. Lowenstein Jensen Besiyerinin Hazırlanışı	40
2. 2. 2. 2. Middlebrook 7H9 Broth Hazırlanması.....	40
2. 2. 2. 3. Klinik Örneklerin Dekontaminasyonu	41
2. 2. 3. PPD Deri Testinin Uygulanışı.....	41
2. 2. 4. Gamma İnterferon Testinin (BOVIGAM) Uygulanması.....	42
2. 2. 4. 1. Kan Kültürünün Duyarlılaştırılması.....	42
2. 2. 5. Humoral Bağışıklığın ELISA İle Belirlenmesi	44
2. 2. 5. 1. PPD B-ELISA	44
2. 2. 5. 1. 1. Mikropleytlere Kaplanmasında Kullanılacak Antijen Titresinin Belirlenmesi	44
2. 2. 5. 1. 3. Konjugat Titresinin Belirlenmesi.....	46
2. 2. 5. 2. <i>M. bovis</i> Sonike ELISA	46
2. 2. 5. 2. 1. Mikropleytlere Kaplanması İçin Antijen Hazırlanması.....	46
2. 2. 5. 2. 2. Mikropleytlere Kaplanmasında Kullanılacak Antijen Titresinin Belirlenmesi	47
2. 2. 5. 2. 3. Serum Titresinin Belirlenmesi	48
2. 2. 5. 2. 4. Konjugat Titresinin Belirlenmesi.....	48
2. 2. 5. 2. 5. Negatif Eşik Değerinin (Cut off) Hesaplanması	49
2. 2. 6. Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PZR).....	49
2. 2. 6. 1. DNA İzolasyonu.....	49
2. 2. 6. 1. 1. Dokudan DNA İzolasyonu.....	49
2. 2. 6. 1. 2. Kültürden DNA İzolasyonu	50
2. 2. 6. 2. Ekstraksiyonu Yapılan DNA'ların Absorbans Tayini	50

2. 2. 6. 3. DNA Amplifikasyonu	51
2. 2. 6. 3. 1. <i>M. tuberculosis</i> kompleks DNA Amplifikasyonu.....	51
2. 2. 6. 3. 2. <i>M. tuberculosis</i> DNA Amplifikasyonu	51
2. 2. 6. 3. 3. <i>M. avium</i> DNA Amplifikasyonu	52
2. 2. 7. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA).....	53
2. 2. 7. 1. <i>M. tuberculosis</i> kompleks REA	53
2. 2. 7. 1. 1. RsaI Restriksiyon Endonükleaz Analizi	53
2. 2. 7. 1. 2. SacII Restriksiyon Endonükleaz Analizi.....	53
3. BULGULAR	55
3. 1. Bakteriyoskopi ve Kültür Sonuçları.....	55
3. 2. PPD Deri Testi Sonuçları	59
3. 3. IFN- γ (BOVIGAM) Testi Sonuçları	59
3. 4. ELISA Sonuçları	60
3. 4. 1. PPD B ELISA Sonuçları	60
3. 4. 2. <i>M. bovis</i> sonikasyon ELISA Sonuçları	61
3. 5. PZR Sonuçları	64
3. 6. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA) Sonuçları	68
4. TARTIŞMA	78
4. 1. Bakteriyoskopi	78
4. 2. Kültür	80
4. 3. PPD Deri Testi	81
4. 4. IFN- γ Testi (BOVIGAM)	82
4. 5. Humoral Bağışıklığın ELISA ile Ölçülmesi	84
4. 6. Moleküler Metotlar	86
4. 6. 1. PZR	86
4. 6. 2. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA).....	90

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	92
6. ÖZET.....	94
7. SUMMARY	96
8. KAYNAKLAR.....	98
9. EKLER.....	113
10. ÖZGEÇMİŞ.....	127

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACLD	Akciğer lenf düğümü
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AraLam	Arabinan terminalinde mannoz olmayan <i>Lipoarabinomannan</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BSL	<i>Biosafety Level</i>
bp	<i>Base pair</i> (Baz çifti)
BSA	‘Bovine’ Sığır Serum Albümini
CD4+TH	CD4 pozitif yardımcı T Lenfosit
CD8+Tc	CD8 sitotoksik T lenfosit
CTAB	N-acetyl-N, N, N-t rimethyl amonyom bromür
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EMVKAİ	Etlik Merkez Veteriner ve Kontrol Araştırma Enstitüsü
GM-CS F	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
HCl	Hidroklorik Asit
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
H₂SO₄	Sülfürik asit
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IS	<i>Insertion Sekans</i>
K₂HPO₄	<i>Dipotassium hydrogen phosphate</i>
KH₂PO₄	<i>Potassium dihydrogen phosphate</i>

LAM	<i>Lipoarabinomannan</i>
ManLAM	Arabinan terminaline mannoz bağlı <i>Lipoarabinomannan</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Doku Uyuřum Antijeni)
MZLD	Mezenteriyel lenf dűęümü
NaAc	Sodyum aseatat
NaCl	Sodyum klorür
NaCO₃	Sodyum karbonat
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NO	Nitrojen
NK	Doğal katil (Natural killer)
OIE	Office International Epizootica (Dűnya Hayvan Saęlıęı Örgütü)
PBS	Fosfat Buffer Solűsyonu
PBS-T	0,005 Twen 20 ięeren Fosfat Buffer Solűsyonu
PLD	Preskapular lenf dűęümü
PPD	Pűrifiye Protein Derivatı
PZA	<i>Pyrazinamide</i>
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	<i>Restriktion Enzyme</i>
REA	<i>Restriction Endonűclease Analysis</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TE	Tris EDTA
TKB	Tarım ve Kűy İřleri Bakanlıęı
TMB	3,3',5,5'- <i>Tetramethylbenzidine</i>

TB

Tüberkül

WHO

World Health Organization (Dünya Sağık Örgütü)

1. GİRİŞ

1. 1. Tanım

Tüberküloz, insanlarda ve hayvanlarda mikobakterium grubu mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, oldukça ciddi sağlık problemlerine ve ekonomik kayıplara sebep olan zoonoz karakterde bir hastalıktır (Öztürk 2003). İnsanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarından olan tüberküloz, tüberküloz etkenleri ve konağın yangı hücrelerinin ilişkisine bağlı olarak gelişen tüberkül adı verilen beyaz-sarı renkli, kalsifiye granülomların oluşumu ile karakterize kronik seyirli bir enfeksiyondur. Granülatöz tüberküloz lezyonları mononükleer hücrelere etkenin infiltrasyonu sonucu şekillenmekte, etken bu granülomların içinde muhafaza edilmektedir (Pollock ve ark 2001). Sığırlarda tüberküllere baş ve göğüs bölgesindeki lenf düğümlerinde, akciğer, karaciğer, dalak gibi organlarda ve vücut boşluklarının yüzeyinde, bazı olgularda dişi genital organlarında da rastlanılmaktadır. Generalize tüberküloz enfeksiyonunda çok sayıda küçük granülom vücut boşluklarının ve organların yüzeyinde, özellikle barsaklar ve mezenteriyumda görülmektedir (Cassidy 2006, Pollock ve ark 2006).

Sığırlar, *M. bovis*'in primer konakçısı olmakla birlikte, etken buffalo, bizon, deve, koyun, domuz, antilop, kedi, köpek, vahşi kediler, mink, rat, yılan, rakun, sincap gibi evcil ve yabani hayvanlardan da izole edilmiştir (OIE 2008 b).

M. bovis'in yabani hayvan rezervuarları sığırlar için enfeksiyon kaynağıdır. Bu hayvanlar İngiltere'de Avrasya porsuğu (*Meles meles*), Yeni Zellanda'da fırça kuyruklu possum (*Trichasurus vulpecula*), Amerika'da beyaz kuyruklu geyik (*Odocoileus virginianus*), Afrika'da vahşi Afrika mandası ve diğer ruminantlardır. Türkiye'de vahşi hayvanlarda tüberkülozun prevalansı, dağılımı ve populasyon yoğunluğu ile bunların evcil hayvanlar ve insanlarla olan ilişkilerine ait bilgiler yok denecek kadar azdır. Bu durum, hastalıkla mücadeleyi büyük ölçüde güçleştirmektedir. Sıcak mevsimlerde yapılan yaylacılık sırasında vahşi domuz ve geyiklerden kalan infeksiyöz materyallerle kirlenmiş otlaklar hastalığın bulaşmasında kaynak oluşturabilmektedir (Özbey ve ark 2008). Türkiye'de bir mink ve kedide

tüberküloz vakası bildirilmiştir (Akay ve ark 1984, 1985, Özbey ve ark 2008). Sezen ve ark (1986), bir güvercin karaciğerinde tüberküloz olgusu rapor etmişlerdir.

1. 2. Tarihçe

İnsanlarda tüberküloz enfeksiyonuna ait ilk bulgulara 3000 yıl öncesine ait Mısır mumyalarının omurgalarında rastlanmıştır (Zimmerman 1979). *Phthisis* (akciğer veremi) ifadesi ilk kez M.Ö. 4. yüzyılda Yunan literatürlerinde görülmektedir. Hipokrat akciğer veremini oldukça bulaşıcı ve genellikle öldürücü bir hastalık olarak tanımlamıştır (Daniel 1997). Tüberkülozlu hastalarda akciğer ve diğer lezyonlu dokulardaki değişiklikler ve tüberkül terimi ilk kez Hollanda'lı bilim adamı Franciscus Sylvius tarafından 1679 yılında Opera Medica'da yayınlanmıştır. 1720 yılında İngiliz fizyolog Benjamin Martin tüberküloza hayret verecek kadar küçük varlıkların sebep olduğunu, hastalığın, hasta insanlar ile aynı ortamda bulunmak, yemek, içmek, konuşmak, nefes alıp vermek ile bulaştığını, 1810 yılında İngiliz fizyolog Carmichael sığırlardaki tüberkülozun enfekte et ve süt ile insanlara bulaşabildiğini bildirmiştir. Fransız askeri Doktor Jean Antonie Villemin, 1865 yılında tüberkülozun insanlardan sığırlara ve tavşanlara bulaşabildiğini açıklamıştır. Ehrlich 1882'de hastalık olaylarından izole edilen etkenin, asido-rezistans bir karakter taşıdığını saptamıştır. Alman doktor Robert Koch, 1882'de tüberküloz basilini boyayarak ortaya koymuştur. Koch izole ettiği patojen tüberküloz suşunun sığır serumunda saf kültürünü elde ederek, deney hayvanlarını enfekte etmiştir. Ayrıca Koch tüberkülozlu bireylerde görülen aşırı duyarlılığı ve bağışıklığı ortaya koymuştur (Akay 1997, Akçay 2000, Reichman 2000, Thoen 2006). Nocard ve Roux 1887'de, %5-7 oranında gliserin katılan agarda kuş tipinin daha iyi ürediğini, sığır tipinin ise daha zayıf üreme gösterdiğini saptamıştır (Akay 1997). Tüberküloz basili 1896 yılında Lehmann ve Neumann tarafından *Mycobacterium tuberculosis* olarak adlandırılmıştır (Akçay 2000, Yardımcı 2006). Smith 1896'da sığır tüberküloz basilini ayrı bir tür olarak ortaya koymuştur (Bilgehan 1990). Fransız bilim adamları Calmette ve Guérin 1908-1919 yılları arasında tüberküloz mastitisli bir sığırdan izole ettikleri *M. bovis* suşunu 230 kez safralı, gliserinli, patates besiyerinde pasajlayarak insan, sığır, at, tavşan ve hamsterlerde apatojen olan ve BCG (Bacillus Calmette-Guérin) olarak adlandırılan attenüe suşu elde etmişlerdir. BCG ilk kez 1921 yılında insanlarda aşı olarak kullanılmıştır. Amerikalı mikrobiyolog Selman A. Waksman,

1943 yılında, *Streptomyces griseus*'dan Streptomisini saflaştırarak tüberküloz tedavisine kullanmıştır (Akay 1997, Akçay 2000, Reichman 2000, Thoen 2006). Runyon, tüberküloz basilini üreme hızı ve pigment formasyonuna göre dört sınıfa ayırmış, basili identifiye etmeye ve mikobakterium türlerini birbirinden ayırt etmeye yarayan testleri açıklamıştır (Runyon 1981, Rogal ve ark 1990).

Türkiye'de tüberkülozun varlığı 1900'lü yıllarda araştırılmaya başlamıştır. İlk sistematik araştırma 1929 yılında Hayvan Sağlık Zabıtası Kanununun kabulü ile başlamıştır. Rıza İsmail 1929 yılında tüberkülin testi ile 7335 sığırdan 676'sını (%9,2) tüberküloz pozitif olarak belirlemiştir (Keskin 1996).

Ülkemizde; 1980-1985 yılları arasında 161.022 adet sığra tüberkülin testi uygulanmış, 50 odakta toplam 82 sığır tüberküloz pozitif belirlenmiştir. 1986 yılında Ulusal Tüberküloz Mücadele Projesi başlatılmış ve Türkiye 5 bölgeye ayrılarak 1. bölgeden başlamak üzere ilk yıl hayvan mevcudunun %20'si, 2. ve 3. yıl %40'ı mücadele kapsamına alınmıştır. Bu projeye göre 1986 yılında 250.000 adet sığra tüberkülin uygulanmış, 153 odakta toplam 1983 sığır tüberküloz pozitif tespit edilmiştir. Ancak bu hastalığın Hayvan Sağlığı Zabıtası Kanununa göre tazminatlı bir hastalık olması nedeniyle finansal sorunlar baş göstermiş ve 1987 yılında programda 591.000 sığra tüberkülin uygulanması planlanırken 64.000 sığra uygulanmış, 96 odakta toplam 252 sığır pozitif bulunmuştur. 1988-1995 yılları arasında 117.500 sığra tüberkülin uygulanmış ve 263 odakta 1474 sığır pozitif bulunmuştur (Akçay 2009).

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (TKB), Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu, Sığır Bovine Tüberküloz Yönetmeliğine (2009) göre; sığır tüberkülozu ihbari mecburi bir hastalıktır. Hastalığın tedavisi, duyarlılığın giderilmesine yönelik uygulamalar ve aşı uygulaması yasaktır. Sığır Tüberkülozu taşıdığı resmi olarak tespit edilen sığırlar kesime kadar izole edilir ve işaretlenir. Tüberkülozlu sığırlar tazminatlı olarak kesime sevk edilir (Resmi Gazete 2009).

1. 3. Etiyoloji

Mikobakteriumlar, *Mycobacteriaceae* familyasındaki tek cinstir. 1-10 µm uzunlukta ve 0,2-0,6 µm çaplı, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz, zorunlu aerob basillerdir. Basilin hücre duvarında, toplam kuru ağırlığının %20-40'ı oranında lipit bulunmaktadır. Lipit hücre duvarına balmumu benzeri bir yapı verir, bu yapı; çevresel şartlara, antiseptiklere, asit ve alkole direnç kazandırmaktadır (Butler 1986, Hensyl 1994). Basilin endotoksini ve ekzotoksini yoktur. Ancak hücre duvarı ve sitoplazmada değişik yapıda antijenler içerdiğinden basil hücresinin parçalanması ile açığa çıkan yapılar toksiktirler ve konakçının yanıtını etkilerler. Mikobakteriumlar, DNA, G+C (%62-70) oranı yönünden; *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Legionella*, gibi aside dirençli diğer bakteriler ile benzerlik gösterir (Butler 1986, Akay 1997). Etken zorunlu hücre içi patojendir ve çoğunlukla mononükleer fagositik hücreleri enfekte etmektedir (Higuchi 2004, Angela 2006).

Mikobakteriumlar, OIE (Office International Epizootica, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü) risk grup III mikroorganizmalar içinde yer almaktadır (OIE 2008 b).

Anilin boyaları ile kolaylıkla boyanamazlar. Hücre duvarının yüksek lipit içeriği (%60) nedeniyle boyanın penetrasyonuna dirençlidir. Gram boyamada çok az mavi boya alarak Gram pozitif boyanırlar. Etkenin boyanmasında Ziehl-Neelsen boyama metodu kullanılmaktadır. Etken, auramin-O boyası ile boyandığında fluoresans mikroskopta görülebilmektedir (Koneman 2006).

Mikobakterium türlerinin identifikasyonu ve ayırt edilmesi için farklı biyokimyasal testler bulunmakla birlikte, Runyon sınıflandırması halen kullanılmaktadır. Runyon mikobakteriumları üreme hızları, üreme sırasında sarı pigment oluşturmaları ve pigment oluşumunun karanlık ya da aydınlıkta ortaya çıkmasına göre, yavaş üreyenler (7 günden daha fazla) ve çabuk üreyenler (7 günden daha az) olarak iki temel sınıfa ayırmıştır. Yavaş üreyen grupta bulunan, Runyon I (*Photochromogens*), ışığa maruz kaldığında sarı-turuncu pigment oluştururlar (*M. kansasii*, *M. marinum*), Runyon II (*Scotochromogens*), karanlıkta ve ışıktaki sarı-turuncu pigment oluştururlar (*M. scrofulaceum*, *M. gordonae*), Runyon III

(*Nonchromogenic*), pigment oluşturmazlar (*M. avium-intracellulare complex*, *M. terrae*). Hızlı üreyen grupta bulunan, Runyon IV pigment oluşturmazlar (*M. fortitum*, *M. chelonae*), (Runyon 1981, Rogall ve ark 1990).

İnsanlarda ve hayvanlarda hastalık yapan patojen mikobakteriumlar temel olarak; *M. tuberculosis* kompleks ve *M. avium-intracellulare* kompleks olarak iki gruba ayrılırlar. *M. tuberculosis* kompleks grubunda, *M. bovis* subsp. *bovis* ve *M. bovis* subsp. *caprae*; ruminantlarda, *M. tuberculosis* ve *M. africanum* (subtype I, II) insanlarda, *M. microti* kemirgen ve insanlarda, *M. canetti* insanlarda, enfeksiyon yaparken, *M. bovis* BCG aşısı suşu olarak kullanılmaktadır (Angela 2006). *M. tuberculosis* kompleks üyeleri DNA homolojisi bakımından %95-100 oranında benzerlik göstermektedirler (Kubika ve ark 2003).

M. tuberculosis, *M. bovis* ayırımında bir seri biyokimyasal test kullanılmaktadır (Butler 1986). Örneğin *M. tuberculosis* Löwenstein-Jensen besiyerinde *eugonic* üreme, nitrat reduksiyon ve niasin üretimi pozitif iken, *M. bovis* *dysgonic* üreme gösterir, nitrat reduksiyon ve niasin üretimi negatiftir. Ayırımda en önemli özelliklerden biriside *M. bovis*'in *pyrazinamid*'e (PZA) dirençli olmasıdır (Butler 1986). Ancak son yıllarda PZA duyarlı *M. bovis* suşları izole ve identifiye edilmiştir. Bu suşlar türe özgü moleküler metotlar ile karakterize edilmiş ve *M. bovis*; *M. bovis* subsp. *bovis* ve *M. bovis* subsp. *caprae* olarak iki alt türe ayrılmıştır (Aranaz ve ark 1999).

Mycobacterium canetti, Van Solingen ve ark (1997), tarafından tarafından tanımlanan ve *M. tuberculosis* kompleks gurubunda bulunan yeni bir türdür. İlk kez 2 yaşında lenfadenitisli bir hastadan izole ve identifiye edilmiştir. *Mycobacterium canetti* insanlarda, *M. tuberculosis*'in oluşturduğuna benzer şekilde tüberküloz enfeksiyonu oluşturmaktadır. Biyokimyasal özellikleri diğer, *M. tuberculosis* kompleks üyeleri ile aynıdır, farklı olarak klinik örneklerden ilk izolasyonu daha kısa sürede gerçekleşmekte, *smooth* tarzda parlak koloniler oluşturmaktadır (Van Solingen ve ark 1997).

M. avium kompleks; *M. avium* ve *M. intracellulare* olmak üzere iki tür içermektedir. *M. avium*; *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ve *M. avium* subsp. *sylvaticum* olarak üç alt türü içermektedir (Cardoso Leao ve ark

1999). *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *sylvaticum*; kanatlılarda tüberküloz, sığırlarda ve insanlarda lenf düğümü (Picardeau 1996) ve özellikle AIDS'li bireylerde akciğer enfeksiyonlarına sebep olurken (Iralu 1993, Allios 1996), *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; ruminant ve diğer memelilerde granülamatöz enteritisle karakterize; *Johne's disease* (paratüberkülozis), insanlarda *Chron's disease* yol açmaktadır. Kanatlılarda *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ile doğal olarak enfeksiyon meydana gelmemektedir. Ancak deneysel olarak enfeksiyon şekillenebilmektedir (OIE 2008 a,b). *M. intracellulare*, ilk kez 1949 yılında sistemik enfekte bir çocuktan izole ve identifiye edilmiştir. İnsanlarda, sığır, domuz ve kanatlılarda enfeksiyon yapabilmekte, genellikle su ve toprakta bulunmaktadır (Hensyl 1994).

Kanatlı tüberkülozunun etiyolojisinde pek çok mikobakterium türü rol alabilmektedir. Ancak enfeksiyon çoğunlukla *M. avium* (Serotip 1, 2, 3) ve *M. sylvaticum* tarafından oluşturulmaktadır. *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. tuberculosis* ve *M. bovis* nadiren kanatlılarda tüberküloza neden olmaktadır. *M. avium* ve *M. sylvaticum* kanatlılar dışında sığır, koyun ve keçilerde, atlarda, domuz, kedi, köpek ve egzotik hayvanlarda enfeksiyona yol açabilmektedir. *M. avium* subsp. *avium* fenotipik ve genotipik özelliklerine göre; *M. avium* subsp. *hominisuis* (insan ve domuz izolatu) ve *M. avium* subsp. *avium* (kanatlı izolatu) olarak iki alt türe ayrılmıştır (Mijs 2002). Kanatlı tüberkülozu özellikle tavuklarda ve yabani kuşlarda görülmektedir. Hindiler oldukça duyarlı iken, ördek ve kazlar daha dirençlidir. Enfekte kanatlılar diyare dışında, çoğunlukla klinik belirti göstermezler, nadiren solunum belirtileri ve ani ölüm görülebilir. Primer lezyon genellikle barsaklarda ülserasyon şeklinde gözlenir. Tipik granülomlara kemik iliği, karaciğer ve dalakta rastlanmaktadır. Kanatlılarda tüberküloz enfeksiyonunun teşhisinde kültür ve Ziehl-Neelsen boyama kullanılmaktadır (OIE 2008 a, b).

Son yıllarda, immunsupresyonlu insan, kanatlı ve köpek gibi hayvanlarda, *M. avium* kompleks ile aynı klinik semptomlar ile seyreden tüberküloz vakalarında nontüberküloz mikobakteri grubunda bulunan ve yakın zamanda tiplendirilen bir tür *M. genavense* izole ve identifiye edilmiştir. Hirschel ve ark (1990), etkeni ilk olarak rapor etmişlerdir. *M. genavense*, besiyerlerinde enfektif mikobakteriumlara göre

oldukça hızlı üremektedir. *M. avium* kompleks ile ayırımında 16S ribosomal RNA gen sekans analizi kullanılmaktadır (Mendenhall 2000).

Mikobakteriumların kültürü amacı ile yumurta bazlı Lowenstein Jensen, Stone Brink's modifiye Middlebrook 7H11, Dorset, Middlebrook 7H9 broth, Herrold' Egg Yolk Agar gibi besiyerleri kültüre edilecek mikobakterium türüne göre serum, gliserin, albumin, *sodium pyruvate*, *mycobactin J*, ile zenginleştirilerek kullanılmaktadır (Bilgehan 1990, Akay 1997).

Mikobakteriumlar, zorunlu aerobturlar ancak %5-10 CO₂ üreme üzerinde olumlu etki yapmaktadır. Optimal üreme ısısı 37 °C'dir. Kanatlı tipi *M. avium* için ideal üreme ısısı 40-42 °C'dir (OIE 2008 a,b).

M. bovis katı besiyerlerinde 4-5 hafta sürede beyaz renkte, kuru, kabarık, kenarları düzensiz, granüllü, rough tipte, *M. tuberculosis*, 3-4 haftada sarı, turuncu renkte kuru, kabarık, üzeri grintili, rough tipte, *M. avium* 2-3 hafta sürede, pigmentsiz, düz, smooth tipte, *M. avium subsp. paratuberculosis*, 8-10 hafta sürede pigmentsiz, rough tipte koloniler oluşturular (Hensyl 1994, Akay 1997, Yardımcı 2006).

Mikobakteriumlar, fiziksel ve kimyasal maddelere oldukça dirençlidirler. Fenol (% 2), krezol (%1), formalin (% 3) ve sodyum hidroksit (NaOH) (% 5) içinde 4 saatte, 70-95 derecelik alkolde 10 saat içerisinde ölürler. Direkt güneş ışınlarına ve ultraviyole ışınlarına karşı duyarlıdır, pastörizasyon ısısında genellikle ölürler (Akay 1997, Yardımcı 2006). *M. bovis* çevre şartlarında özellikle de, ışık görmeyen, nemli ortamlarda, 12-24 °C'de 4-8 hafta boyunca %80 oranında canlı kalabilmekte, enfekte işletmelerde toprak ve çevreden izole edilebilmektedir (Menzies ve Neill 2000).

Son yıllarda, BACTEC gibi etkenin çok kısa sürede izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabildiği, radyometrik ve fluorometrik besiyeri sistemleri hastanelerde ve bazı veteriner laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. BACTEC ile kültürde materyal, C¹⁴ ile işaretlenmiş palmitik asit içeren besiyerine ekilerek, etkenin üremesi sırasında yağ asitini metabolize ederek oluşturduğu, ¹⁴CO₂ miktarının radyometrik yöntemle ölçülmesiyle sonuca gidilmektedir (Koneman 2006). BACTEC sistemi ile insanlarda mikobakterilerin

izolasyonu, identifikasyonu ve ilaç duyarlılıkları diğer konvansiyonel yöntemlere göre iki-üç hafta daha erken yapılabilmekte ve kısa sürede uygun ve etkili tedaviye başlanabilmektedir (İşitez ve ark 2004).

1. 4. Epidemiyoloji

Ülkemizde, 2008 yılında 37 il, 418 işletmede PPD deri testi ile test edilen 6169 sığırdan 2458'inde sığır tüberkülozu pozitif olarak belirlenmiştir (OIE 2009).

OIE 2009'a göre Konya'da 2008 yılında bildirim yapılan 2 işletmede 72 sığırdan, Çorum'da bildirim yapılan 19 işletmede 627 sığırdan 116'sında PPD deri testi pozitif sonuç bildirilmiştir.

OIE 2009 verilerine göre, 2008 yılında sığır tüberkülozu İngiltere'de hiç bildirilmemiştir. Avusturalya, Avusturya, İzlanda, Danimarka, İsveç, İsviçre, Norveç, Finlandiya, Lüksemburg, Slovenya, Litvanya, Estonya, Çek Cumhuriyeti, Kanada, Singapur, Jameika, Japonya, İngiltere, Yeni Zelanda, Meksika, Güney Amerika ve İsrail sığır tüberkülozundan aridir (Anonymous 2009).

Ülkemizde, sığırlarda Avian tuberculosis ile ilgili en yakın tarihli kayıtlar 2005 yılına aittir ve bu dönemde Türkiye'de bildirim yapılmamıştır (OIE 2009).

Dünyada, 2006'yılında 14,4 milyon insanda tüberküloz vakası bildirmiştir. Bunun 9,2 milyonu yeni vaka, 4,1 milyonu balgam sürme froti pozitif, 700 bini HIV pozitif, 500 bini antibiyotik dirençli vakadır. Vakaların %55'i Asya, %31'i Afrika, %6'sı Doğu Akdeniz, %5'i Avrupa, %3'ü Amerika'da tespit edilmiştir. 1,5 milyon insanda tüberküloz nedeni ile ölüm görülmüştür. WHO (World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü), 2007 yılında Türkiye'ninde içinde bulunduğu Avrupa'da tüberküloz mücadelesi için 319 milyon dolar finanse etmiştir ve bu miktar WHO tarafından tüm dünyada tüberküloz mücadelesi için kullanılan paranın %13'ünü oluşturmaktadır (WHO 2008).

Türkiye'de, 2007 yılında insanlarda tüberküloz oranı, yüz binde 29, ölüm oranı yüz binde 5 olarak bildirilmiştir (WHO 2009). Ülkemizde insanlarda tüberküloz kontrol programı ilk kez 1950 yılında başlamıştır. Son 15 yıllık verilere

göre programın enfeksiyonu ortadan kaldıramadığı sadece sınırlayabildiği bildirilmektedir (http://www.euro.who.int/tuberculosis/TBForum/20070703_2).

1. 5. Epizootiyoloji

Enfekte sığırlar solunum sekresyonları, süt, dışkı, idrar, vaginal sekresyonlar ve sperma ile etkeni saçmaktadırlar. Sığırlarda tüberküloz basilini içeren damlacıkların solunum yolu ile alınması bulaşmada en önemli rolü oynamaktadır (Chambers ve ark 2001b). Genellikle büyük damlacıklar, solunum sistemindeki mukosilier hareket ve salgılar aracılığı ile etkin bir şekilde elimine edilmektedir (Neill ve ark 2001, Thoen ve ark 2006). Tüberküloz enfeksiyonunun başlayabilmesi için enfektif mikobakteriumları içeren küçük damlacıkların (~1-2 mm) alveoler yüzeylere ulaşması gerekmektedir. Sindirim yolu ile bulaşmalar buzağılar dışında önemsizdir. Deri yolu ile, genital ve kongenital bulaşmalar olabilmektedir. Sığırlardan kedi ve köpeklere deriden bit ve pireler aracılığı ile bulaşmalar bildirilmiştir (Menzies ve Neill 2000, Cousins 2001).

M. bovis'in insanlara bulaşmasındaki en önemli yol, enfekte süt ve süt ürünlerinin, hayvan etlerinin, enfekte süt, idrar ve gaita ile bulaşık su ve gıdaların tüketilmesi sonucu sindirim yolu ile olmaktadır (OIE 2008 b). Enfekte materyaller ile temas sonucu deri yolu ile, enfekte hayvanlar ile yakın temasta bulunan insanlarda solunum yolu ile bulaşmalar olabilmektedir (Angela 2006). Sığır tüberkülozu eradikasyon programının uygulanmadığı ülkelerde, enfekte sütlerin tüketilmesi sonucu özellikle çocuklarda enfeksiyona sıklıkla rastlanmaktadır. *M. bovis*'in insandan insana bulaşması immün sistemi baskılanmış (özellikle AIDS) insanlar dışında nadir görülmektedir (Grange 2001, Fritsche ve ark 2004, Thoen ve ark 2006).

Tüberküloz basiline maruz kalan bir canlıda enfeksiyonun başlayabilmesi üç önemli faktöre bağlıdır. Bunlar; enfektif bakterinin dozu, konakçıdaki doğal bağışıklığın gücü ve bakterinin virülensidir (Neill ve ark 2001, Thoen ve ark 2006). Bu üç mekanizmanın ortaklaşa etkisi sonucu, alveoller makrofajlar tarafından fagosite edilen tüberküloz basilleri öldürülür ise enfeksiyon meydana gelmemektedir. Fakat fagosite edilen etken makrofajlarda ürer ve makrofajları inaktive eder ise enfeksiyon başlamaktadır (Manabe 2000, Raja 2004).

Diğer solunum sistemi enfeksiyonlarının aksine sığır tüberkülozunda enfektif doz tam olarak bilinmemektedir (Palmer ve ark 2006). Deneysel olarak 1-3 virulent etken içeren tek bir damlacık ile enfekte edilen duyarlı tavşan ve kobaylarda

enfeksiyon şekillenmiş, ancak bu durumun insanlarda ve diğer hayvanlarda benzer olup olmadığı bilinmemektedir (Reichman 2000). Üst solunum yollarındaki mukosilier bariyerden geçerek alveoller boşluklara ulaşabilen etken burada hücresel dejenerasyona veya nekroza neden olurlar (*primer effekt*). Burada bakteriler makrofajlarca fagosit edilecek veya bağımsız olarak bu organlardaki lenf yumrularına giderek tüberkellerin oluşmasına neden olurlar (*primer complex*). Primer kompleks genellikle canlının ilk enfeksiyonunda görülür. Canlının yaşına ve direncine bağlı olarak bu lezyonlar iyileşebileceği veya lokalize kalabileceği gibi (tam olmayan *primer complex*), direncin zayıfladığı durumlarda lokalize olduğu odaklarda yeniden üremeye başlayarak kan yoluyla diğer organ ve dokulara yayılabilmektedir. Bu organlarda çok sayıda küçük tüberkellerin (*milier tuberculosis*) oluşmasına neden olur (Bilgehan 1990, Akay 1997, Palmer ve ark 1999a). Vücutlarında primer kompleks bulunan bireyler yeniden mikroorganizma ile enfekte olabilirler ve kronik organ tüberkülozu şekillenebilir. Vücut direnci zayıf bireylerde şekillenebilen bu tip generalizasyonlarda (geç generalizasyon) hastalık çabuk gelişerek bireyin ölümüne neden olabilmektedir (Bilgehan 1990, Akay 1997, Oğuz 2004, Öztürk 2003).

Sığır tüberkülozunda lezyonlar çoğunlukla baş ve göğüs bölgesindeki lenf düğümlerinde gözlenmektedir. Akciğer, karaciğer, dalak, barsak gibi organlarda ve mezenteriyel lenf düğümlerinde de lezyonlar görülebilmektedir (OIE 2008 b).

1. 6. Bağışıklık

Konağın tüberküloza karşı yanıtında hem doğal hem de kazanılan immünite rol oynamaktadır (Raja 2004).

1. 6. 1. Tüberkülozda Doğal İmmünite

Akciğer alveollerine ulaşan tüberküloz basilleri doğal savunma yolları ile yok edilebilir veya çoğalarak enfeksiyona yol açabilir. Konağın doğal savunmasında; üst solunum yolunun fiziksel engeli, fagositoz, fagositik hücrelerin reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, yangı hücreleri ve salgıladıkları sitokinler, alveoler makrofajların kimyasal yapısını değiştirmesi, apoptozis, genetik faktörler, solunum sisteminin mikrobiyal florası rol almaktadır (Bilgehan 1999, Özbal 2006).

1. 6. 1. 1. Üst Solunum Yolunun Fiziksel Engeli

Lizozim, laktoferrin gibi antibakteriyel sekresyon içeren üst solunum yolunun silia epitelleri basil bulunan büyük molekülleri tutarak doğal savunmaya katkıda bulunur (Diker 1998, Bilgehan 1999, Özbal 2006). Üst solunum sisteminin hava yolları, ince rulo tarzındaki turbinatlardan oluşmaktadır ve bunlar havanın geçişi sırasında bir turbulans oluşturur. Hava turbulansı mikroorganizmaları ve yabancı partikülleri mukozal duvarlara doğru iterek mukusa yapışmasını sağlamaktadır. Solunum sistemi mukozasındaki *Goblet* hücrelerinden salgılanan Ig A yapısındaki antikorlar direkt antimikrobiyal etki göstermektedir (Diker 1998).

1. 6. 1. 2. Fagositoz

Üst solunum yollarının fiziksel bariyerini aşarak alveollere ulaşan mikobakteriler fagositoz yetenekli alveoler makrofajlar tarafından karşılanır. Dendritik hücreler ve monositlerde büyük ölçüde fagositoza katılır (Thoen ve ark 2006). Endositozis yolu ile hücre içine alınan etken fagozom vakuolü içine yerleşir. Fagozom ve lizozom birleşerek fagolizozom oluşur (Feng ve ark 2001). Fagolizozom içerisindeki basiller ortam pH'sının değişmesi düşmesi, lizozomal proteolitik enzimlerin etkisi, fagositik hücrelerde reaktif oksijen (H_2O_2) ve nitrojen (NO) ara ürünlerinin üretilmesi ile yok edilirler (Smith 2003a). Fagosit edilen mikobakteri antijenleri tarafından uyarılan makrofajlardan IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α (tümör nekroz faktör) gibi sitokinler salgılanır (Duarte ve ark 2005). IFN- γ fagositoz hızını artırır. IL-6 hepatositleri etkileyerek mannoz bağlayan protein, fibrinojen, C-reaktif protein, serum amiloid protein gibi akut faz proteinleri sentezlenir. C-reaktif protein; bakteri membranında bulunan fosforikoline, mannoz bağlayan protein, bakteri membranında bulunan mannoza bağlanarak bakteriyi opsonize ve komplemanı aktive ederler (Bilgehan 1999, Palmer ve ark 1999b, Chambers ve ark 2001, Özbal 2006).

Mikobakteri fagositozunda hücre duvarında bulunan lipidlerin önemi büyüktür. Lipoarabinomannan (LAM), sulfolipitler, glikolipitler, 19 kDa lipoprotein bunlardan bazılarıdır (Smith 2003a). ManLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı), AraLAM (arabinan terminalinde mannoz olmayan) ve fosfo-myo-inositol bağlı LAM olmak üzere üç tip LAM vardır. ManLAM virulent mikobakteri türlerinde bulunur ve

makrofaj yanıtını inhibe ederek basilin hücre içinde yaşamasını sağlar (Hamasur ve ark 2001, Yardımcı 2006, Thoen ve ark 2006).

Mikobakterium, virülens faktörlerine bağlı olarak makrofaj aktivitesi yetersiz kalırsa veya fagozom-lizozom birleşmesi bozulursa basiller sindirilmekten korunur ve hücre içinde çoğalır. Fagozom-lizozom birleşmesi halinde mikobakteriler, fagolizozomdaki düşük pH'nın nötralize edilmesi, basil duvarında bulunan yüksek molekül ağırlıklı lipitler nedeniyle düşük aktiviteli makrofajların lizozomal hidrolitik enzimlerine direnç geliştirmesi, reaktif oksijen ara ürünlerinin (H_2O_2) makrofaj aktive edici moleküllerin sentezinin önlenmesi, fagolizozomdan sitoplazmaya kaçma yolu ile fagolizozomun öldürücü etkisinden kurtulmaktadırlar. Kurtulan basiller, makrofaj içinde çoğalarak fagositleri parçalar veya latent olarak kalırlar. Parçalanmış fagositlerden saçılan basiller, alveoler boşluklarda çoğalmaya başlar ve komşu lenf bezlerine, lenfo-hemotojen yolla tüm vücuda yayılarak ulaştıkları dokularda yeni enfeksiyon odakları oluştururlar (Cox 1999, Ludwiczak 2002). Alveoler makrofajlar içindeki mikobakteriler, *isocitrate lyase* salgılayarak, bunun yardımı ile alternatif besin kaynağı olarak yağ asitlerini kullanmaya başlarlar. Bu şekilde aylarca, yıllarca makrofajlar içinde persiste olarak kalırlar (Smith 2003b). Apoptozis, mikobakterium ile enfekte alveoler makrofajlar ve diğer hücrelerde bakteri üremesinin sınırlandırılmasında ve enfeksiyonun yayılımının önlenmesinde etkin bir mekanizmadır. Aktive olan makrofajlardan ve dendritik hücrelerden salınan TNF- α aracılı bir mekanizma ile programlı ölüm gerçekleşmektedir. Virulent mikobakteriumlar enfekte alveoler makrofajların apoptozisinden kurtulabilmektedirler (Keane 2000).

1. 6. 2. Tüberkülozda Kazanılan İmmünite

Alveoler makrofaj ve dendritik hücrelerde çoğalan mikobakteriumlara karşı oluşan hücresel immün yanıtla enfeksiyon kontrol altına alınabilir veya az sayıda basil metabolizmalarını durdurarak latent halde kalabilir. Bu basiller, primer enfeksiyondan yıllar sonra çoğalarak sekonder tüberküloza neden olabilirler (Manabe 2000).

Alveoler makrofajlara mikobakteriumların yerleşmesinden birkaç hafta sonra, basil antijenleri, enfekte hücreler tarafından bölgesel lenf bezlerine taşınırlar.

Mikobakteriumlar ile enfekte makrofaj ve dentritik hücreler mikobakterilerin çoğaldığı odağa fagositler ile T lenfositlerin göçünü ve granülomların oluşumunu sağlayan sitokin ve kemokinler üreterek özgül yangısal bir yanıt geliştirirler. Konak, ilk enfeksiyondan sonra basil duvarında bulunan lipit tüberküloproteinler tarafından uyarılan özgül hücrel immün yanıt (hücrel immünite ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu) kazanır (Kobayashi ve ark 2001).

Kazanılan immünite, tüberküloz basillerinin eski veya yeni bir enfeksiyon odağında lokalize kalmasını sağlar. Mikobakteriumlar ile enfekte makrofajlardan, immün koruyucu (TNF- α , IL-12) ve NK (doğal katil) hücreleri aktive edici (IL-2, TNF- α) sitokinler salınmaktadır. TNF- α ile IL-12, CD4+TH (CD4 yardımcı T lenfosit) lenfositleri Th₁ fenotipe farklılaştırır. Th₁ lenfositleri IL-2, TNF- α ve IFN- γ salgılar. IFN- γ ; makrofaj aktivatörü olup fagositoz hızını ve makrofajlardan IL-12 ile TNF- α sentezini artırmaktadır. IL-2 ve TNF- α , NK ve CD8+Tc (CD8 sitotoksik T lenfosit) lenfositleri aktive eder. Aktive olan makrofajlar basilleri sindirirken, NK ve CD8+Tc lenfositleri hücre içi patojeni ile birlikte enfekte makrofajları öldürerek basil sayısını azaltır (Hope ve ark 2000, Fulton ve ark 2000, Feng ve ark 2001). Makrofajlar veya dendritik hücreler tarafından CD4+TH veya CD8+Tc lenfositlerine mikobakteriyel antijenler sunulduktan sonra, hücrel immünite ile birlikte tüberkülin testiyle belirlenebilen tüberkülin tipi gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu da gelişir. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna bağlı olarak granülom ve kazeöz nekroz oluşur (Palmer ve ark 1999a, Flynn 2001).

1. 6. 3. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu

Gecikmiş tip aşırı duyarlılık, konağın antijenlere karşı oluşturduğu yangısal bir yanıt olup, yavaş meydana gelmekte ve uzun süre devam etmektedir. Lokal makrofajlar patojene ait antijenik peptitleri MHC-II molekülleri üzerinden Th₁ lenfositlerine sunarlar. Antijene özgül olarak aktive olan CD4+Th₁ lenfositleri tarafından, ölü veya canlı aynı antijenle tekrar karşılaştığı zaman, INF- γ , TNF- α , GM-CS F (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) gibi yangı mediatörleri salınır. GM-CS F makrofajların kemotaksisini, INF- γ makrofajların aktivasyonunu, TNF- α enfekte makrofajların ölümünü sağlamaktadır. Bu mediatörlerin salınmasıyla gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşmakta, olay

ilerledikçe granümatöz tip reaksiyon gelişmektedir. Pasif olarak aktarılamayan bir reaksiyon olan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, hücrel immün yanıtı takip etmektedir (Diker 1998).

PPD (pürifiye protein derivatı) reaksiyonu, tipik bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonudur (Whelan ve ark 2003). Lenfositlerin aktivasyonu ile salınan lenfokin ve kemotaktik faktörlerin etkisiyle yangı hücrelerin toplanmasına neden olur ve bunun sonucunda doku hasarı ve nekroz gelişir (Vordermeyer 1995). Gecikmiş tip aşırı duyarlılıktan, 10 kDa'lık küçük proteinlerin karışımı olan tüberkülinin başka, CD1 molekülleri üzerinden T lenfositlerine sunulan lipoarabinomannan ve glikolipit (kord faktörü) gibi antijenler de sorumludur (Özbal 2006, Thoen ve ark 2006).

Tüberkülozda gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, konağın doku hasarı yapan bir yanıtı olup, hem kazeöz nekroz hem de erime ve kavite oluşumuna neden olur (Palmer ve ark 1999a, Duarte ve ark 2005). Tüberkülozda gözlenen akciğer hasarı (kazeifikasyon, liquefiksasyon ve kavitasyon), konağın gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtıyla ortaya çıkmaktadır (Flynn 2001). Konakta oluşan hücrel immünite ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtları, tüberküloz basillerinin çoğalmasını eşit düzeylerde baskılar. Bunu hücrel immün yanıt; fagosite ettikleri basilleri öldürmeleri için makrofajları aktive ederek, gecikmiş tip aşırı duyarlılık ise basil içeren aktive olmamış makrofajları ve komşu dokuları harap edip basillerin üremesi için uygun hücre içi ortamı ortadan kaldırarak sağlar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık tarafından oluşturulan yerel nekroz, hücrel immünitenin yerel makrofaj aktivasyonu sağlaması için konağa zaman kazandırır. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sırasında oluşturulan nekrotik bölgeden sızan basiller, yerel makrofajlar tarafından tutulurlar. Yerel makrofajlar aktive olmuş ise fagosite ettikleri basilleri inaktive ederler, aktive edilmemiş ise içlerinde basiller tekrar çoğalmaya başlayacak ve çoğalmayı önlemek için gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı tekrarlanarak kazeöz nekroz alanları genişleyecektir. Tüberkülozda doku nekrozu ve kavite oluşması geç tip aşırı duyarlılıkla ilgilidir (Kobayashi ve ark 2001, Özbal 2006).

1. 6. 4. Granülom Oluşumu

Konakta, enfeksiyonun başlamasından 2-6 hafta sonra hücresel immün yanıt ve lezyon bölgesinde aktif alveoller makrofajlar ile lenfositler (CD4+Th ve CD8 +Tc) toplanarak granülom oluşur. Granülom oluşumunda, mikobakterium lipidlerinin uyarımı ile enfekte makrofajlar tarafından salınan kemokinlerin (IL-8, MCP-1) rolü vardır (Raja 2004, Duarte ve ark 2005). Granülom oluşumu ile alveoller makrofajlar tarafından fagosit edilemeyen mikobakterilerin çoğalması ve enfeksiyonun ilerlemesi durdurulur. Tüberküloz enfeksiyonuna karşı gelişen bu konakçı yanıtı, basilin başlangıçta çoğalmasını ve yayılmasını sınırlar. Konağın bu etkinliğinin başarısı basilin virulens faktörlerine ve sayısına göre değişmektedir. Granülom içinde uzun süre canlı kalabilen basiller, hücresel immün yanıt baskılandığı zaman aktive olmaktadır. Granülom kazeöz nekroz ile sonuçlanmaktadır (Palmer ve ark 1999a, Duarte ve ark 2005, Özbal 2006, Thoen ve ark 2006).

IFN- γ , makrofajlarda mikobakterilerin öldürülmesinde en etkili sitokindir. IFN- γ seviyesi hücresel immüniteye bağlı olarak hızla yükselmektedir (Hope ve ark 2000). Dolayısıyla koruyucu immünitede rol oynayan antijenlerin saptanmasında bir değer olarak bu sitokin artan düzeylerinden yararlanılabilmektedir (Pollock ve ark 1997).

1. 7. Aşılama

M. bovis BCG; *M. tuberculosis* ve *M. bovis* enfeksiyonlarından korunmak amacı ile aşı olarak, diğer enfeksiyöz hastalıklara karşı aşı geliştirme çalışmalarında rekombinant taşıyıcı ve kanser immünoterapisinde kullanılmaktadır (Brosman 1992, Meyer ve ark 2002).

BCG, 1908'den 1921'e uzanan uzun bir geçmişe sahiptir. Sığır sütünden izole edilen virulent *M. bovis* suşları 15 günde bir patatesli safralı Sauton Medium'da pasajlanarak attenüe edilmiştir. Suşun attenüe olduğu belirlendiğinde; patatesli-safralı Sauton buyyon, patatesli Sauton Buyyon, patatesli-gliserinli-sığır etli buyyon da pasaja devam edilmiştir. Patatesli-safralı ve patatesli-safralı-sığır etli buyyon pasajları 1932 yılında terk edilmiştir (Talbot ve ark 1997).

Günümüzde insan ve hayvanlarda tüberküloz enfeksiyonundan korunmak amacıyla kullanılan tek aşı BCG aşısıdır. BCG'nin oluşturduğu bağışıklık ve enfeksiyondan koruma gücü değişken ve net değildir. Bu yüzden yeni aşı geliştirilmesi ihtiyacı doğmaktadır (Buddle ve ark 1999, Gupta ve Katoch 2009).

İnsan ve hayvanlarda uygulanan BCG aşısı, tüberküloz enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan PPD deri testine karşı canlıyı duyarlı hale getirmektedir. Yeni aşı geliştirmesi üzerine yapılan çalışmalarda aşının verdiği bağışıklık gücü kadar teşhis metotlarını etkilememesi üzerinde çalışılmaktadır (Brosman 1992, Buddle ve ark 1999). Son yıllarda, enfektif *M. bovis*'te bulunan, çevresel mikobakteriumlar ve *M. bovis* BCG'de silinmiş olan RD1 geni tarafından kodlanan ESAT-6 ve CFP-10 antijenleri teşhiste kullanılarak aşı ve aşısız hayvanlar ayırt edilebilmektedir (Dillon ve ark 2000, Van Pinxteren ve ark 2000, Vordermier ve ark 2001, Vordermeier ve ark 2002, Mustafa ve ark 2006). BCG aşısına alternatif olarak DNA, subunit protein, attenüe *M. bovis*, ölü non tüberküloz mikobakteri, mutant BCG, viral vektör aşılı ve bunların BCG ile kombinasyonları hayvan ve insanlarda denenmektedir (Talbot ve ark 1997, Mustafa ve ark 2006). Haile (2005), enfektif *M. tuberculosis*'ten izole edilen, *Lipoarabinomannan* ile hazırladığı ve burun yolu ile aşıladığı farelerde, canlı BCG aşısı kadar koruma sağlandığını göstermiştir

Sığırlar ve kobaylar için virülent olmayan, kimyasal mutasyon ile attenüe edilmiş *M. bovis* suşu hayvanlarda hücresel bağışıklığı yeterince uyarabilmiş ve BCG aşılamasında koruma sağlamayan *challenge* denemelerinde koruma sağlayabilmiştir. Ancak suşun zararsızlığı yönündeki çalışmalar yeterli olmadığı için henüz kullanılmamaktadır. Özellikle BCG ile kombine edilen viral vektör aşılardan olumlu sonuçlar alınmaktadır (Vordermeier ve ark 2006, Hope ve ark 2008).

BCG aşısı insanlarda doğumdan sonraki 2-3. ayda 0,01 mg dozunda deri içi uygulanmakta, 5-15 yıl süre ile %50-60 oranında tüberküloz enfeksiyonuna karşı koruma sağlamaktadır. Aşı etkenin bulaşmasını, özellikle de akciğer tüberkülozunu önleyememekte enfeksiyonun daha ılımlı ve sınırlı seyretmesini sağlamaktadır. Özellikle çocuklarda tüberküloz menenjitini önlemesi yönü ile oldukça önemlidir. Yetişkinlerde sağladığı yarar çok net değildir. Aşının bağışıklık oluşturmada 6-12 hafta alabilmektedir. Aşı PPD deri testi (Montoux test) negatif sonuç veren bireylere

uygulanmaktadır (Colditz ve ark. 1994). BCG immün yetmezlik bulunan insanlarda enfeksiyona yol açabilmektedir (Niemann ve ark 2000).

Yeni doğanlarda immün sistem, yaşamlarının ilk haftalarında çevresel mikobakteriumlar ile kolaylıkla duyarlı hale getirilebilmekte ve bu durum BCG aşısının etkinliğini azaltmaktadır (Palmer ve Long 1966, Edwards ve ark 1982, Marchant ve ark 1999, Hussey ve ark 2002, Haile 2005). Black ve ark (2001), PPD pozitif bireylerde yapılan BCG aşılama sırasında, PPD negatif bireylere göre daha düşük oranda BCG spesifik IFN- γ üretimi şekillendiğini ortaya koymuşlardır. Buddle ve ark (2002), PPD pozitif buzağılarda, BCG aşılama sonrası, enfektif *M. bovis* ile *challenge* denemelerinde, PPD negatiflere göre korumanın daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Yeni doğanlarda, BCG aşılama sonrası şekillenen Th₁ hücreleri, Th₂ hücrelere göre mikobakteriumlara karşı korumada daha etkin koruma sağlamaktadır (Fine 1995, Black ve ark 2001, Hanekom 2005, Gebreyohannes 2007).

BCG aşılama sırasında kullanılan dozun, şekillenen bağışıklığın tipini belirlemede oldukça önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir. Düşük doz aşılama Th₁ yardımcı T-lenfositlerin rol aldığı hücresel bağışıklığı uyarırken, humoral bağışıklığı çok düşük düzeyde uyarabilmektedir. Yüksek doz aşılama Th₁ ve Th₂ hücrelerin rol aldığı ancak Th₂ hücrelerin daha baskın olduğu, hücresel bağışıklık ile birlikte düşük doz aşılama göre daha yüksek oranda humoral bağışıklığın şekillendiği ortaya konmuştur (Lowry ve ark 1998, Gebreyohannes 2007, Willem ve ark 2007). Yüksek doz ve düşük doz BCG aşılama sonrası IFN- γ düzeylerinde istatistiksel olarak fark belirlenemez iken, IL-4 düzeyinin yüksek doz aşılama belirgin şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir (Gebreyohannes 2007). BCG oral ve deri içi uygulanabilmektedir, ancak özellikle yüksek doz oral uygulamalar sonrası servikal ve farengeal lenf düğümlerinde reaksiyonlara neden olduğu için kullanımı terk edilmiştir (Lotte ve ark 1984).

1. 8. Teşhis

İnsan ve hayvanlardaki tüberkülozun çevreye bulaşmasının önlenmesinde ve kontrol altına alınmasında erken teşhis önemli bir yer tutmaktadır (Kulshrestha 2005, Raqib ve ark 2003). Bu amaçla direkt mikroskopi, kültür, histopatoloji, in vivo (tüberkülin deri testi), in vitro (IFN- γ testi, lenfosit proliferasyon testi) hücresel bağışıklığın ölçüm testleri, antikor cevabı ölçen serolojik testler (Floresan Antikor, ELISA, Radioimmünasay, Dot-Blot, Komplement Fiksasyon ve moleküler metotlar (PCR, DNA fingerprinting, DNA probları, oligotyping) kullanılabilmektedir (Rua Domanech ve ark 2006).

OIE'ye göre sığırlarda tüberküloz enfeksiyonunun antemortem teşhisinde tüberkülin deri testi, alternatif olarak gamma interferon testi, posmortem teşhisinde; bakteriyoskopi (Ziehl–Neelsen, Floresans boyama, İmmünperoksidaz), histopatolojik muayene, kültür ve moleküler metotlar önerilmektedir (OIE 2008c)

TKB, Sığır Bovine Tüberküloz Yönetmeliğine (2009) göre, bir sürüde ya da bölgede enfekte ve hasta hayvanların maksimum sayısını tespit edebilmek amacı ile Bakanlık, sığır tüberkülozu için tüberkülin testine ek olarak Gamma-interferon (IFN- γ) testinin uygulanmasına izin verebilmektedir (Resmi Gazete 2009).

1. 8. 1. Bakteriyoskopi ve Kültür.

Mikobakteriumların, Ziehl Neelsen boyama ile boyanmasının temeli, hücre duvarlarındaki mikolik asitin, karbol fuksin ile boyanması ve asit alkolle muameleden sonra boyalı kalması esasına dayanmaktadır (Manzano ve ark 2008).

Direkt mikroskopi ile asidorezistans bakterilerin görülmesi ile teşhis Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da önerilen ve yaygın olarak kullanılan bir metot olmakla birlikte klinik örnekteki bakteri sayısının azlığı gibi nedenlere yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir (Hamasur ve ark 2001). Ziehl Neelsen boyama ile direkt bakteriyoskopi özellikle insanlarda pulmoner tüberkülozun teşhisinde kolay uygulanabilir ve ucuz olması sebebi ile referans metottur (Hamasur ve ark 2001, Sevakumar ve ark 2002, Manzano ve ark 2008). Boyamada mikobakteriyel etkenlerin görülebilmesi için klinik numunenin 1 ml'sinde en az 5000-10.000 bakteri

bulunması gerekmektedir, ayrıca farklı mikobakteri türlerinin ayrımı yapılamamaktadır (Mukherje ve ark 2002).

Tüberküloz enfeksiyonunun teşhisinde kültür altın standarttır (Kulshrestha 2005, Raqib ve ark 2003, OIE 2008c). Ancak 4-6 hafta süre alması, Biyogüvenlik Seviyesi 3 (BSL 3) laboratuara ihtiyaç duyulması dezavantajıdır (Hamasur 2001).

Etkenin ilk izolasyonunda Lowenstein Jensen, Coletsos base, Stonebrinks gibi yumurta bazlı ya da Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11 gibi agar bazlı besiyerleri kullanılmaktadır. *M. bovis*, Lowenstein Jensen besiyerinde 3-6 haftada üreme göstermekte, üreme, besiyerlerinin makroskopik muayenesi ve Ziehl-Neelsen boyama ile belirlenmektedir. Karakteristik üreme süreci ve koloni morfolojisi *M. bovis* için ön tanı sağlarken diğer *M. tuberculosis* kompleks türlerinden ayırt edilmesi gerekmektedir (OIE 2008 c).

M. bovis katı besiyerlerinde, beyaz renkte, kuru, kabarık, kenarları düzensiz, granüllü, rough tipte, *M. tuberculosis*, 4-5 hafta sürede sarı, turuncu renkte kuru, kabarık, üzeri grintili, rough tipte, *M. avium* 2-3 hafta sürede, pigmentsiz, düz, smooth tipte, *M. avium subsp. paratuberculosis*, 8-10 hafta sürede pigmentsiz, rough tipte koloniler oluşturmaktadırlar (Hensyl 1994).

1. 8. 2. Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi

1. 8. 2. 1. PPD Tüberkülin Deri Testi

Tüberküloz enfeksiyonu sonucu oluşan geç ve hücresel tipteki bağışıklığı, aşırı duyarlılığı belirlemek için kullanılan bir testtir. Tüberküloz enfeksiyonu, mikobakteriyel antijenlere karşı konakçıda duyarlılık oluşumu ile sonuçlanır. Enfeksiyon sonucu ilk duyarlılaşma bölgesel lenf düğümlerinde gelişip kan dolaşımına giren duyarlı T-lenfositleri ile 6-9 hafta içinde oluşur. Bu lenfositlerin, deri içine tüberkülin enjeksiyonu ile tekrar uyarılması sonucu, aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişir (Vordermeyer 1995, Diker 1998, Bilgehan 1999, Whelan ve ark 2003, Thoen ve ark 2006). PPD'nin deri içi enjeksiyonunu takiben antijen derideki dendritik hücreler (Langerhans hücreleri) tarafından alınarak bölgesel lenf düğümlerine taşınırlar. Lenf düğümlerindeki ve dolaşımdaki duyarlı Th1 hücreleri

antijeni tanır, aktive olur ve enjeksiyon bölgesinde toplanır. Bölgeye toplanan T-lenfositleri IFN- γ , IL-2, IL-8, serotonin, lenfotaktin gibi maddeler salgırlar. Bu sitokinler bölgeye bazofil ve makrofaj göçünü artırır. Tüm bu hücrelerden salınan sitokinler bölgeye daha fazla lenfosit göçüne neden olur. Meydana gelen tüm bu reaksiyonlar sonucu hücresel düzeyde yangı oluşur. Meydana gelen aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu enjeksiyon bölgesinde kızarıklık, ısı artışı ve şişkinlik meydana gelmektedir. Makrofajlar tarafından salınan serbest radikaller ve enzimler doku tahribinin en önemli nedenidir (Diker 1998, Bilgehan 1999, Erganiş ve İstanbulluoğlu 1999).

Tüberkülin deri testinde antijen olarak tüberküloz basillerinin proteinleri kullanılmaktadır. Old tüberkülin, HSCM (ısı ile konsantre edilmiş sentetik besiyeri) tüberkülin ve PPD tüberkülin olmak üzere üç tipi bulunmaktadır. Ancak günümüzde PPD tüberkülin kullanılmaktadır (Gemicioğlu 1999). Old tüberkülin ilk kez 1890 yılında Robert Koch tarafından üretilmiştir. Koch, gliserinli et suyu besiyerinde ürettiği tüberküloz basillerinin 100 °C’de öldürülmesiyle old tüberkülini hazırlamış ve insanlarda aşı olarak kullanmayı denemiştir (Hueloner ve ark 1993, Rua-Domanech ve ark 2006). 1907 yılında Von Piquet old tüberkülinin bağışıklıkta etkili olmadığını, tanıda kullanılabileceğini bildirmiştir. 1934 yılında Seibert ve Munday tüberküloz basillerinin kültür filtratlarını çökeltip düşük molekül ağırlıklı bir protein izole etmişler ve bunu amonyum sülfat ile çöktürerek PPD’yi elde etmişlerdir (Iseman 2001, Oğuz 2004).

Tüm PPD preparatları için standart tüberkülin PPD lot numarası 49608 veya PPD-S’dir. Tüm tüberkülin preparatlarının gücü “tüberkülin ünitesi (TÜ)” olarak ifade edilmiş ve 1TÜ=0.00002 mg PPD-S içeren birim olarak tanımlanmıştır (0.1 ml’lik solusyonda 5-TÜ dozundaki 0.0001 mg PPD-S bulunmaktadır), (Hueloner ve ark 1993, Oğuz 2004). Sığırlarda tüberküloz teşhisinde kullanılan PPD, *M. bovis* AN5 suşundan, insanlarda, *M. tuberculosis*’den hazırlanmaktadır (OIE 2008b). Sığırlarda deri içi uygulanan Mamalian ve Avian PPD’nin dozu 2000 İU’dan daha az olmamalıdır (OIE 2008 b, Resmi Gazete 2009).

Tüberkülin testi boynun yan orta kısmından (*cervical fold skin test*), ve kuyruk kökünden (*caudal fold skin test*) deri içi uygulanabilmektedir. Ancak

günümüzde kuyruk kökünden uygulama Amerika dışında kullanılmamaktadır (Rua-Domenech ve ark 2006).

Avian ve Bovine PPD'nin uygulandığı karşılaştırmalı tüberkülin test ile, hayvanların *M. bovis* ile enfeksiyonunu ya da *M. avium*, *M. avium subsp. paratüberkülozis* ve çevresel mikobakteriumlar ile duyarlı hale getirildiğinin ayırımı yapılabilmektedir (Chalmers ve ark 1996, Rua-Domanech ve ark 2006).

Bovine tüberkülin deri içine enjekte edildiğinde canlı *M. bovis* ya da çapraz reaksiyon veren antijenler (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, çevresel mikobakteriumlar ile enfeksiyon, *M. avium subsp. paratuberculosis* ile enfeksiyon, *M. bovis* BCG ile aşılama) ile daha önceden duyarlı hale getirilmiş ise enjeksiyondan sonraki 48-72. saate şişlik, kızarıklık, ağrı gibi yangı belirtileri ortaya çıkmaktadır (Katial ve ark 2001, Vordermeir ve ark 2001, Dunn ve ark 2005, Rua-Domenech ve ark 2006). Bu gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun meydana gelebilmesi için reaksiyonu veren T hücrelerinin PPD enjeksiyonundan haftalar önce duyarlı hale gelmiş olması gerekmektedir (Pollock ve ark 2003). Enfekte sığırların PPD enjeksiyonuna cevap verebilmeleri için, enfeksiyon başlangıcından itibaren 6-9 hafta süre geçmesi gerekmektedir (Rua-Domenech ve ark 2006).

1. 8. 2. 2. Gamma İnterferon (IFN- γ) Testi

Tüberküloz enfeksiyonunda, insan ve hayvanlarda etkene karşı gelişen hücresel bağışıklığı in vitro ortaya koymak için kandaki IFN- γ düzeyi ölçülebilmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, tüberküloz enfeksiyonuna karşı bağışıklıkta hücre aracılı immün cevabın esas rol oynadığı ve bu cevapta CD₄⁺ yardımcı T-lenfositleri ve bu hücrelerden salınan IFN- γ 'nın korunmada önemli rol oynadığı, CD₈⁺T hücrelerinin ise daha az rol aldığı gösterilmiştir (Pollock ve ark 1997).

IFN- γ testi, sığır tüberkülozunun teşhisi amacıyla 1980 yılında Avustralya'da geliştirilen, hücresel bağışıklığın ölçüldüğü in vitro, kan temelli bir testtir (Wood ve ark 1991, Wood ve Rothel 1994). Testte, Bovine (B) ve Avian (A) PPD ya da diğer mikobakteriyel antijenler ile uyarılan tam kan ya da mononükleer hücre kültüründe, 16-24 saat süre içinde duyarlı lenfositlerden salınan interferon

gamma düzeyi, monoklonal anti-bovine IFN- γ antikorlar kullanılarak sandwich ELISA ile ölçülmektedir (Rua-Domenech ve ark 2006). Sığırlarda, *M. bovis* ile enfeksiyondan 1-4 hafta sonra, tam kan hücre kültüründeki T-lenfositleri PPD B ile uyarıldığında yüksek düzeyde IFN- γ salınımı şekillenmektedir. Deneysel olarak *M. bovis* ile enfekte edilen sığırlar, 14. günde IFN- γ testi ile teşhis edilebilmektedir (Buddle ve ark 1999). Bu süre PPD deri testinde 6-9 hafta olarak belirlenmiştir (Rua-Domenech ve ark 2006). Canlı, *M. avium* ya da çevresel mikobakteriumlar ile duyarlı hale getirilmiş ise *M. avium* antijeni ile uyarılan kandaki IFN- γ düzeyi daha yüksek belirlenmektedir (Rothel ve ark 1992, Wood ve Rothel 1994).

IFN- γ testi; 2002 yılında OIE tarafından , PPD deri testi uygulanan sürülerde paralel test olarak kabul edilmiştir (OIE 2008c). Test pek çok ülkede PPD deri testi uygulanan tüberküloz prevalansının düşük olduğu sürülerde, PPD negatif hayvanların tekrar test edilmesinde kullanılmaktadır (Buddle ve ark 2001).

Avusturalya, PPD deri testi ve reaktörlerin kesimi ile 1997 yılında tüberkülozdan arılığını ilan etmiştir. Ancak bu durumda IFN- γ testin pay oldukça azdır ve testin yaygın kullanımı bulunmamaktadır (Cousins ve ark 1998). IFN- γ testinin geliştirilmesindeki temel amaç hayvanları PPD gibi mikobakteriyel antijenler ile duyarlı hale getirmeden PPD'ye göre daha yüksek sensitivite ve spesifite ile tüberküloz enfeksiyonunu teşhis edebilmektir (Rua-Domenech ve ark 2006).

Enfekte olmayan genç hayvanlarda (6 aydan küçük), mikobakteriyel antijenler ile uyarılan kandaki doğal katil hücrelerin (NK), IFN- γ salgılaması nedeni ile yanlış pozitiflik görülebilmektedir (Vordermeir ve ark 2001, Olsen ve ark 2005).

Sığırlarda tüberküloz teşhisinde kullanılan IFN- γ test kiti BOVIGAM, koyun ve keçilerde de kullanılabilmektedir. Ancak kitin diğer memeli ve insanlarda kullanımı yoktur. IFN- γ testi, 1994 yılında insanlarda *M. tuberculosis* ve *M. avium* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılmıştır, insan ve primatlarda IFN- γ ölçümü ile tüberküloz teşhisi için QUANTİFERON-TB (Cellestis, Australia) geliştirilmiştir (Van Pinxteren ve ark 2000, Katial ve ark 2001).

IFN- γ testinde duyarlılığı artırmak amacıyla antijen olarak PPD yerine *M. bovis*, *M. tuberculosis* ve *M. africanum* için spesifik antijen olan ESAT-6 (6 kDa

early secretory antigenic target) ve CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein) kullanılabilmektedir (Rua-Domenech ve ark 2006). ESAT-6 ve CFP-10 sentezinden sorumlu gen bölgesi olan RD1, çevresel mikobakteriumlarda, *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. paratuberculosis* ve *M. bovis* BCG'de silinmiştir. *M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. africanum* enfeksiyonunda T-lenfositlerinden IFN- γ salınımına neden olan en önemli antijenin ESAT-6 ve CFP-10 olduğu belirlenmiştir (Pollock ve ark 1997). Waters ve ark (2004), deneysel olarak *M. bovis*, *M. avium* ve *M. avium subsp. paratuberculosis* ile enfekte edilen sığırlarda T-lenfositlerinden salınan IFN- γ düzeyinin, *M. bovis* ile enfekte edilen sığırlarda, belirgin seviyede yüksek olduğunu bildirmiştir. IFN- γ testinde, ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerinin kullanılması testin spesifitesini (%98) artırmıştır (Van Pinxteren ve ark 2000). Mustafa ve ark (1998), *M. tuberculosis* ile enfekte insanlarda, recombinant ESAT-6 (rESAT-6), *M. tuberculosis* hücre duvarı antijenleri ve *M. bovis* BCG ile uyarılan periferik kan mononükleer hücre kültüründe γ -IFN seviyesini ölçmüş ve rESAT-6 ile uyarılan hücre kültüründeki IFN- γ seviyesinin diğer gruplardan yüksek olduğunu bildirmiştir. Buddle ve ark (2001), Van Pinxteren ve ark (2000) ile Vordermier ve ark (2001), tüberküloz teşhisinde, ESAT-6 ve CFP-10'un antijen olarak kullanıldığı IFN- γ testinin sensitivitesinin %76-93, spesifitesinin %92-100 olduğunu bildirmişlerdir.

1. 8. 2. 3. Lenfosit Poliferasyon Testi

Tüberküloz enfekte hayvanların teşhisinde sensitivite ve spesifitesi yüksek olan bir testtir. Bu in-vitro hücresel bağışıklık ölçüm testinde, PPD Bovine ve PPD Avian antijenlerine lenfositlerin reaksiyonu karşılaştırılmaktadır. Test tam kanda ya da purifiye lenfositler ile gerçekleştirilmektedir. Bu testler hayvanların her an maruz kalabileceği çevresel mikobakteriumlardan kaynaklanan çapraz antijenlere lenfositlerin cevabını elimine ederek spesifiteyi artırmaktadır (OIE 2008 b).

Bu in vitro ölçüm tipi, periferik kan lenfositlerinin PPD B ve PPD A antijenlerine cevabın karşılaştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Test tam kan ya da periferik kan örneklerinden saflaştırılan lenfositlerde yapılabilir. Sonuçlar, PPD Bovine (B) cevap sonucunun, PPD Avian (A) cevap sonucundan çıkarılması ile analiz edilmektedir. B-A farkı belirlenen cut-off değerinin üzerinde olmak

zorundadır. Sensitivite ve spesifiteyi artırmak için cut-off değeri değiştirilebilmektedir (OIE 2008 b). Lenfosit proliferasyon testinde de kan örnekleri alındıktan kısa süre sonra laboratuara ulaştırılmalıdır. Yabani ruminantlarda sensitivite ve spesifitesi ELISA testine göre oldukça yüksek olarak belirlenmiştir (OIE 2008 b). Uygun laboratuvar ekipmanı, uzun inkübasyon periyodu ve radyoaktif nükleotidlerin kullanımını gerektirmesi, pahalı olması, laboratuvarlar arası standardize edilememesi nedeni ile bilimsel çalışmalar dışında rutin kullanımı bulunmamaktadır (OIE 2008 b).

1. 8. 3. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi

Tüberküloz enfeksiyonunun serolojik teşhisi amacı ile ilk kez 1898 yılında aglutinasyon testi kullanılmıştır (Daniel ve Debanne 1987). Bundan sonraki yıllarda komplement fiksasyon testi (CFT), pasif hemaglutinasyon, jel presipitasyon, immunelektroforez, immunfloresan gibi yöntemler tanımlanmış ancak sensitivite ve spesifite açısından yetersizlikle karşılaşmıştır. Başta IgG olmak üzere IgM ve IgA tipi antikorların saptanması için ELISA 'nın yüksek derecede sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu ileri süren yayınlar bulunmasına rağmen, kullanılan antijenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Bengisun ve ark 1997).

Mikobakteriumlar, makrofajlar başta olmak üzere mononükleer hücreleri enfekte eden hücre içi bakterilerdir. Pek çok bakteriyel enfeksiyonun teşhisi humoral bağışıklığın ölçülmesi ile gerçekleştirilebilirken, tüberküloz enfeksiyonunda temel immünolojik cevap T-hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Ritacco ve ark 1991). Mikobakteriumlar ile enfekte canlılarda antikor cevap, bakteriyel yükün ve patolojik değişikliklerin arttığı enfeksiyonun geç döneminde artmaktadır (Neill ve ark 2001, Vordermier ve ark 2004). Bu yüzden tüberküloz enfeksiyonunda hücresel bağışıklığı ölçen antemortem testler enfeksiyonu, antikor temelli testlere göre daha erken dönemde ve yüksek sensitivite ve spesifite ile belirleyebilmektedir (Neill ve ark 2001).

Kan veya vücut sıvılarındaki antikor ya da antijenleri belirlemek için kullanılan serolojik testlerde yüksek doğruluk ile sonuç alabilmek için mikobakterium türleri için immünodominant olan antijenlerin kullanılması gerekmektedir (Kulshrestha 2005). Tüberkülozun, ELISA ile teşhisinde,

M. tuberculosis ve *M. bovis* kültür filtratları, sonike ekstraktları, PPD, *M. bovis* BCG'den elde edilen A60 gibi antijenler kullanılmıştır. Ancak bu antijenlerin spesifiteleri çevresel mikobakteriumlar ve diğer asidorezistans bakteriler ile çapraz reaksiyonlar nedeni ile düşük kalmıştır (Julian ve ark 2001). Rekombinant proteinlerin spesifiteleri kısmen yüksek olarak belirlenirken sensitiviteyi düşük bulunmuştur (Bothamley 1995). İnsanlarda, özellikle pulmoner ve ekstra pulmoner vücut sıvılarında mikobakteriyel antijenlerin belirlenmesine yönelik hazırlanan ELISA testlerinde sensitivite ve spesifitenin yüksek olduğu bildirilmiştir (Leite 1990, Srivastava ve ark 1998).

Ritacco ve ark (1987), sığır tüberkülozunun teşhisinde ELISA metodunun sensitivite ve spesivitesinin yüksek olduğunu belirtmelerine rağmen yaptıkları başka bir çalışmada (Ritacco ve ark 1990), sensitiviteyi düşük ve spesifiteyi yüksek olarak bildirmişlerdir. PPD tüberkülin uygulanan enfekte sığırlarda, enjeksiyondan sonraki 15-20 gün içinde mikobakteriumlara karşı şekillenen antikorlarda sağlıklı hayvanlara göre belirgin şekilde artış olmakta ve bu anamnestik cevabın ölçüldüğü ELISA testlerinde sensitivite ve spesifite klasik ELISA testlerine göre daha yüksek olmaktadır (Harboe ve ark 1990). Gutierrez ve ark (1998), Bovine PPD kaplı ELISA pleytleri ile 76 adet keçide, antikor cevabı ölçmüşler ve standart ELISA sensitivitesini %54,9, spesifitesini %88, anamnestik ELISA sensitivitesini %88,6, spesifitesini %95,8 olarak belirlemişlerdir. Lilenbaum ve ark (1999), sığır tüberkülozunun teşhisinde ELISA testinin tek başına uygun olmadığını bildirmişlerdir.

Mikobakterium enfeksiyonlarının serolojik teşhisi ucuz ve basit olmak ile birlikte, düşük sensitivite ve spesifiteleri nedeniyle deri testine ve IFN- γ testine alternatif olamamaktadır (Vordermier ve ark 2001). Ancak, deri testi ve IFN- γ testi negatif sonuç veren anerjik sığırların teşhisi serolojik testler ile mümkün olabilmektedir (Plackett ve ark 1989, Yearsley ve ark 1998).

Sığır tüberkülozunun teşhisinde ELISA metodunun, işletmelerin bir kez ziyaret edilmesi, kan örneklerinin pek çok hastalığın teşhisi için toplanabilecek olması ve serum örneklerinin dondurularak uzun süreler saklanabilmesi, hayvanlara her hangi bir ajan enjekte edilmediği için immün sistemin etkilenmemesi ve testin

tekrar tekrar uygulanabilmesi, ucuz ve basit olması gibi avantajları bulunmaktadır (Lilenbaum ve ark 1999).

1. 8. 4. Moleküler Metotlar

Tüberküloz teşhisinde kullanılan moleküler teknikler (PZR, PZR-REA [restriction endonuclease analysis], RFLP [restriction fragment length polymorphism], oligotyping, spoligotyping, DNA probe), etkenin inkübasyon süresinin uzun olması nedeni ile kısa sürede sonuç verebilmeleri açısından büyük yarar sağlamıştır. Ancak bu tekniklerin pahalı ve karmaşık oluşu eğitilmiş personele ihtiyaç göstermesi dezavantajını oluşturmaktadır. Moleküler metotlar, tüberkülozun özellikle klinik örneklerden kısa sürede teşhisi amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır (Raqib ve ark 2003).

PZR pek çok hastalığın, özellikle de yavaş üreyen patojenlerin yol açtığı enfeksiyonların hızlı teşhisinde oldukça büyük yarar sağlamaktadır (Liebana ve ark 1995). Klinik örnekte 1-10 mikobakterium olduğunda pozitif sonuç alınabilmektedir (Del Portillo ve ark 1991). Mikobakteriumların doku örneklerinden PZR ile direkt teşhisi kültür kadar duyarlı olmamakla beraber, oldukça kısa zamanda (1-2 gün), çok az sayıda mikroorganizma varlığında ve klinik numunedeki etkenin inaktive olduğu durumlarda teşhis yapılabilmektedir (Liebana ve ark 1995). Özellikle insanlarda balgam örneklerinden tüberküloz teşhisinde oldukça faydalı olmaktadır (Nolte ve ark 1993). İnsanlarda tedavi başladığı için kültürde üretilmeyen mikobakteriumların teşhisinde ve etkenin antibiyotiklere dirençliliğinin gösterilmesinde kullanılabilmektedir (Eroğlu 2003).

M. tuberculosis'in klinik örneklerden moleküler teşhisi için; Enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (Gen-Probe), BDProbe Tec ET test (Becton Dickinson) ve Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test (Roche) gibi ticari nükleik asit amplifikasyon kitleri bulunmaktadır (Soini ve Musser 2001).

M. tuberculosis kompleks türlerinin birbirinden ayrımında Spoligotyping (Kamerbeek ve ark 1997), *pncA* ve *oxyR* genlerindeki mutasyonları belirlemeye yönelik PZR (Scorpio ve ark 1996), *mtp* 40 PZR (Del portillo ve ark 1991), farklı gen bölgelerinin amplifikasyonuna yönelik metotlar kullanılabilmektedir. *pncA*,

oxyR, *mtp* 40 PZR, *M. tuberculosis* ve *M. bovis* ayırımını yapabilmektedir, ancak diğer türlerin ayırımında kullanılamamaktadır. Spoligotyping, çok sayıda suşun aynı anda analizini, farklı gen bölgelerinin amplifikasyonuna yönelik metotlar, çok sayıda amplifikasyon basamağı gerektirmektedir (Chimara ve ark 2004).

DNA gyrase (topoisomerase) hücre bölünmesinde önemli rol oynayan bir enzimdir. Tip 1 ve tip 2 olarak, iki tipi bulunmaktadır. Bakteriyel DNA gyrase tip 2 yapısındadır. DNA gyrase iki protein alt ünitesi içermektedir. Bunlar; 100 kDa moleküler ağırlığında protein A (*gyrA*) ve 70-90 kDa ağırlığında protein B (*gyrB*)'dir. *gyrB* gen sekansı, DNA gyrase (topoisomerase) enziminin B alt ünitesini kodlamaktadır. *gyrB* gen sekansı bir çok mikobakterium türünde bulunmaktadır (Chimara ve ark 2004).

M. avium kompleks üyelerinin tür düzeyinde ayırımı için çok sayıda moleküler metot kullanılmaktadır. Tür spesifik, işaretli DNA problemleri (Gen Probe) en yaygın kullanılan metotlar arasındadır, *M. avium* ve *M. intracellulare* identifikasyonu için ticari problemler temin edilebilmektedir. *Acridinium* esterleri ile işaretli problemlerin sensivitesi %95 olarak belirlenmiştir, bu metot *M. avium* kompleks türlerinin ayırımında altın standart olarak kabul edilmektedir (Cardoso Leao ve ark 1999).

Insertion sekansları (IS) prokaryotik ve eukaryotik DNA'sında bulunan 700-2500 bp uzunluğunda kısa, yer değiştirebilen DNA sekanslarıdır. Bakteri DNA'sında rastgele ve birden fazla kopya halinde bulunabilmektedir. Yer değiştirebilen genetik elementlerin genom içinde yer değiştirmeleri fonksiyon bozukluğuna ve fenotipik varyasyonlara yol açabilmektedir. Insertion sekansları bakterilere, türe özgü karakterleri ve konakçı seçiciliği kazandırmaktadır (Puyang ve ark 1999). Kanatlı tüberküloz vakalarından izole edilen *M. avium* subsp. *avium* suşlarında tekrarlayan kopyalar halinde IS901 sekansı bulunmaktadır. Suşlarda IS901 sekansının bulunması patojenite ile ilişkilendirilmektedir (OIE 2008 a). İlk kez AIDS'li hastalardan izole edilen *M. avium* suşlarında ortaya konulmuştur (Kunze ve ark 1991). Kanatlı ve memeliler için diğer serotiplere göre daha patojen olan *M. avium* serotip 1, 2, ve 3'te belirlenmiştir (Pavlik ve ark 2000).

Attenüe BCG aşısı suşu enfektif *M. bovis* ve diğer *M. tuberculosis* kompleks türleri ile genetik ve fenotipik olarak benzerlik göstermektedir. Bu yüzden klasik metotlar ile ayırt etmek oldukça güçtür (Talbot ve ark 1997). Mahairas ve ark (1996), genetik hibridizasyon metodu ile tüm *M. tuberculosis* kompleks türlerinde bulunan, *M. bovis* BCG'de ve nonvirulent mikobakteriumlarda silinmiş olan RD1 gen bölgesini ortaya koymuşlardır. RD1 geni ESAT-6 (6-kDa early secretory antigen) ve CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein) kodlamaktadır (Cockle ve ark 2002). Deneyisel olarak *M. tuberculosis* RD1 geninin çıkarılması etkenin virulensini kaybetmesi ile sonuçlanmaktadır (Lewis ve ark 2003).

1. 8. 5. Hayvan Deneyi

Deneme hayvanı olarak genellikle kobaylar kullanılır. Marazi maddelerden hazırlanan inokulum (0,5 mg bakteri/ml), kobayların inguinal lenf yumruları yakınının aderi altı olarak 0,2-0,3 ml enjekte edilir. 6-8 hafta sonra hayvanlara otopsi yapılarak iliakal ve subiliakal lenf düğümlerinden bakteriyoskopi ve kültür yapılır (Akay 1997, Yardımcı 2006, Koneman 2006).

Bu çalışmada; postmortem klinik örneklerden elde kültür sonuçları altın standart kabul edilerek, sığır tüberkülozunun antemortem ve postmortem teşhisinde kullanılan testler karşılaştırılarak ideal (yüksek sensitivite ve spesifite, kolay ve ucuz uygulanabilirlik) teşhis metodu belirlenmeye çalışıldı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. Sığır Materyali

Bu çalışma, Konya’da 2 (2 yaş ve üzeri inek), Çorum’da 2, (2 yaş ve üzeri inek) ve Aksaray’da 1, (2 yaş altı düve) olmak üzere 5 işletmede toplam 772 adet dişi sığır üzerinde gerçekleştirildi.

Sığırlara PPD deri testi uygulandıktan 30 gün sonra pozitif ve negatif sonuç veren hayvanlardan, IFN- γ ve ELISA testi için; 1 l ithium heparinli ve antikoagülsiz tüplere 10’ar ml kan alındı. Deri testi ve IFN- γ test sonuçlarına göre kesilen hayvanlardan, akciğer lenf düğümü (ACLD), preskapular lenf düğümü (PLD), mezenteriyel lenf düğümü (MLD) ve tüberkül (TB) örnekleri alındı. Lezyonlu dokulardan dekontaminasyon sonrası bakteriyoskopi için preparat hazırlandı, etkenin kültürü amacıyla Lowenstein Jensen besiyerine ekimler yapıldı. Kültüre edilen mikobakterium şüpheli suşlara ve klinik örneklerle PCR analizleri yapıldı.

İşletme 1; 340 sığıra PPD deri testi uygulanırken, bunların 56’sından kan örnekleri alındı ve 56 sığır kesime sevk edildi.

İşletme 2; 11 sığıra PPD deri testi uygulandı ve kan örnekleri alındı, bu işletmede kesim yapılamadı.

İşletme 3; 230 sığıra PPD deri testi uygulandı ve kan örnekleri alındı, 5 sığır kesime sevk edildi. Ancak; bu işletmede, işletme sahiplerinin enfekte hayvanları kestirmekte zorluk çıkarması kesimin belirli dönemlerde işletme sahipleri tarafından bilgi verilmeksizin yaptırılarak numunelerin kargo ile gönderilmesi sebebi ile kültür sonuçları güvenilir bulunmamıştır.

İşletme 4; 151 sığıra PPD deri testi uygulandı ve kan alındı, 74 sığır kesime sevk edildi.

İşletme 5; 40 sığıra PPD deri testi uygulandı, kan örnekleri alınamadı, kesim yapılamadı.

Toplam, 772 sığira PPD bovine ve PPD avian deri testi, 448 sığira γ -IFN testi, PPD Bovine ve *M. avium* sonikasyon ELISA testi uygulandı. PPD deri testi ve IFN- γ pozitif test sonuçlarına ve işletmelerin tutumlarına göre seçilen, 135 sığır kestirilerek incelenmek üzere, bunlara ait 135 ACLD, 135 PLD, 135 MLD ve 18 TB örneği alındı.

2. 1. 2. Referans mikobakterium suşları

Araştırmada, *M. bovis* EMVKAЕ, *M. tuberculosis* H 37 Rv, *M. avium* ATCC 2529 olmak üzere 3 adet referans suş kullanıldı. Referans suşlar; *M. bovis*, Etlik Merkez Veteriner ve Kontrol Araştırma Enstitüsü'nden (EMVKAЕ), *M. tuberculosis* H 37 Rv, Refik Saydam Hıfzıssıha Enstitüsü'nden, *M. avium* ATCC 25291, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'dan (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı) temin edildi.

2. 1. 3. Bakteriyoskopi

2. 1. 3. 1. Fenollü karbol Fuksin

Bazik fuksin	3 gr
Etanol (%95)	100 ml
Fenol	5 gr
Distile su	100 ml

Bazik fuksin bir havan içerisinde, üzerine azar azar alkol ilave edilerek ezildi (Solüsyon 1). Kristal haldeki fenol 45–50 °C'ye ısıtılarak eritildi üzerine distile su eklenerek homojen bir karışım elde edildi (Solüsyon 2). 10 ml solüsyon 1, 90 ml solüsyon 2 ile karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Boya solüsyonu hazırlandıktan sonra koyu renkli kapaklı şişelere aktarıldı, 24 saat bekletildikten ve filtre edildikten sonra kullanıldı.

2. 1. 3. 2. Asit-alkol (%3 w/v)

HCl (%37,5)	3 ml
Etanol (%95)	97 ml

2. 1. 3. 3. Metilen Mavisi

Metilen mavisi	0,3 gr
Distile su	100 ml

Metilen mavisi havanda ezildikten sonra distile su eklenerek eritildi. Boya solüsyonu süzöldükten sonra koyu renkli şişelere aktarıldı.

2. 1. 4. Kültür

2. 1. 4. 1. Dekontaminant-Nötralizer

Költüre edilecek doku örnekleri, havan yardımı ile ezildikten sonra, kontaminasyonları inaktive etmek için dekontaminant ve nötralizer solüsyonları ile muamele edildi (Petrof 1915, Erganiş 1994, Palamino ve Portales 1998, Ambrosio ve ark 2008)).

2. 1. 4. 2. Dekontaminat

NaOH (Sodyum Hidroksit)	20 gr
Steril distile su	917,5 ml
Bromkreasol purple solüsyonu	4,5 ml

2. 1. 4. 3. Bromkreasol purple solüsyonu

Bromkreasol purple	1,2 gr
Etanol (%95)	50 ml
Distile su	50 ml

2. 1. 4. 4. Nötralizer

HCl (%37,5)	82,5 ml
Steril distile su	1000 ml

2. 1. 4. 5. Besiyerleri

Klinik numunelerden mikobakteriumların izolasyonu amacı ile gliserinli ve gliserinsiz Lowenstein Jensen besiyeri (Merck VM614000, Germany), üretilen suşların stoklanması ve fazla miktarda üretilmesi için, Middlebrook ADC Enrichment (Difco, 212352, USA) ile zenginleştirilen, Middlebrook 7H9 broth (Difco, 271310, USA) kullanıldı.

2. 1. 4. 6. Gliserol

M. avium ve *M. tuberculosis*'in kültüre etmek için Lowenstein jensen besiyerine katıldı (Sigma 49781, Germany).

2. 1. 5. PPD Deri Testi

2. 1. 5. 1. Purifiye Protein Derivatı (PPD)

Tüberkülin deri testinde, Etlik Merkez Veteriner ve Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen, protein içeriği 1 mg/ml olan Avian (A) ve Bovine (B) PPD kullanıldı.

2. 1. 6. Gamma İnterferon Testi (IFN- γ)

2. 1. 6. 1. BOVIGAM, *M. bovis* Gamma İnterferon Test Kiti

BOVIGAM, IFN- γ test kiti (Cat: 63316), Prionics AG (İsviçre) firmasından temin edildi.

1) 30 adet (450 numune) monoklonal anti interferon gamma antikorlar ile kaplı 96 gözlü mikropleyt.

2) Bovine IFN- γ negatif kontrol; 3x2 ml liyofilize.

3) Bovine IFN- γ pozitif kontrol; 3x2 ml liyofilize.

4) Green diluent; plazma diluent buffer, 2x175 ml.

5) Blue diluent; konjugat diluent buffer, 2x175 ml.

6) Wash buffer; yıkama solüsyonu, 20 kat yoğunlaştırılmış, 2x500ml.

7) Konjugat; horseradish peroksidase ile işaretli anti-bovine IFN- γ , 2x2 ml liyofilize.

8) Enzim substrate buffer; H₂O₂ içerir, 2x175 ml.

9) Chromogen solüsyonu; dimetil sülfoksit (DMSO) içinde, TMB (3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine*) içerir. 100 kat yoğunlaştırılmış, 2x2 ml.

10) Enzim stop solüsyonu; 0,5 M H₂SO₄ (Sülfirik Asit), 1x75 ml.

2. 1. 6. 2. IFN- γ uyarıcı antijen

1) BOVIGAM Bovine PPD (PPD B, 0,3 mg/ml), 20 ml (Cat: 63313).

2) BOVIGAM Avian PPD (PPD A, 0,3 mg/ml), 20 ml (Cat: 63314).

3) Fosfat bufer solüsyonu (PBS, 0,01 M, pH 7,2), negatif uyarıcı antijen (Nil kontrol).

2. 1. 7. ELISA

2. 1. 7. 1. Kaplama Antijeni

ELISA testinde kullanılacak pleytlerin kaplanması PPD B (EMVKAЕ) ve *M. bovis* (EMVKAЕ) sonikasyon ürünleri kullanıldı.

2. 1. 7. 2. Antijen Kaplama Bufferı

Karbonat-bikarbonat tamponu, pH 9,6

0,2 M NaCO ₃	16 ml
0,2 M NaHCO ₃	34 ml

2. 1. 7. 3. Serum ve Konjugat Diluent: PBS (Fosfat buffer solüsyonu), pH 7,2

NaCl	8,5 gr
K ₂ HPO ₄	1,121 gr
KH ₂ PO ₄	0,34 gr
Distile su	1000 ml

2. 1. 7. 4. Yıkama solüsyonu (%0,05 PBS-T w/v)

Twen 20	0,5 ml
PBS	1000 ml'ye tamamlandı, pH 7,4.

2. 1. 7. 5. Bloklama solüsyonu (% 1 BSA w/v)

BSA (Sigma A21153)	1 gr
PBS	100 ml

2. 1. 7. 6. Konjugat

Tavşanda hazırlanan, anti bovine Ig G (whole moleküle) alkalın fosfataz konjugat (Sigma A7414) kullanıldı.

2. 1. 7. 7. Substrat

Fosfat-sitrat buffer (Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, Sigma P4922, USA)'da taze olarak hazırlanan -Fenildiamin dihidroklorid (δ -phenylenediamine dihydrochloride tablet Sigma P8287, USA) tablet kullanıldı.

2. 1. 7. 8. Enzim Stop Solüsyonu (0,5 M H₂SO₄)

H ₂ SO ₄	26,5 ml
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı

2. 1. 7. 9. FTS (Fizyolojik tuzlu su) %0,85 (w/v)

NaCl	8,5 gr
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı

2. 1. 7. 10. Pozitif ve negatif serumlar

ELISA pleytlerinin standardizasyonunda ve test uygulamasında pozitif serum olarak; PPD deri testi ve IFN- γ testi sonucu tüberkülozlu olduğu belirlenen, Bovine PPD'ye en güçlü reaksiyon veren ve kesim sonrası iç organlarından *M. bovis* izole ve identifiye edilen, sığırdan kesim öncesi alınan kan serumu *M. bovis* pozitif serum olarak kullanıldı. PPD deri testi ve IFN- γ uygulanan işletmelerde tüberküloz negatif sığırlardan doğan yavruardan bir haftalık yaşta alınan kan serumları negatif serum olarak kullanıldı.

2. 1. 8. PZR analizi

Lezyonlu dokulardan ve kültüre edilen mikobakteriumlardan DNA izolasyonu yapılarak PCR ve PCR-REA (Restriksiyon enzim analizi) yapıldı.

2. 1. 8. 1. DNA İzolasyonu

2. 1. 8. 1. 1. Dokudan DNA İzolasyonu

2. 1. 8. 1. 1. 1. Lizis Solüsyonu (pH 8)

100 mM NaCl	5,84 gr
10 mM Tris-HCL	1,57 gr
25 mM EDTA	9,306 gr
Twen 20	%2 w/v
Proteinase K	5 mg/ml

2. 1. 8. 1. 2. Kültürden DNA İzolasyonu

2. 1. 8. 1. 2. 1. Tris-EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (TE) pH 8.0

10 Mm Tris	0,12 gr
1 Mm EDTA	0,37 gr
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı.

2. 1. 8. 1. 2. 2. Lizozim

TE tamponu içinde 20mg/ml hazırlandı, -20 °C'de saklandı.

2. 1. 8. 1. 2. 3. SDS (Sodium dodesil sülfat), %10 (w/v)

SDS	10 gr
Distile su	100 ml'ye tamamlandı

2. 1. 8. 1. 2. 4. Proteinaz K

MERCK (VL558668), TE tamponu içinde 10 mg/ml hazırlandı, -20 °C'de saklandı.

2. 1. 8. 1. 2. 5. NaCl (5 M)

NaCl	105.99 gr
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı.

2. 1. 8. 1. 2. 6. N-acetyl-N, N, N-trimethyl amonyom bromür (CTAB), %10 (w/v)

CTAB	10 gr
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı.

2. 1. 8. 1. 2. 7. Soğuk Ethanol %70 (w/v)

Etanol	70 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlandı, -20 °C'de saklandı.

2. 1. 8. 2. DNA Amplifikasyonu

2. 1. 8. 2. 1. Taq polimeraz

3X1 ml 10XKCl'lü, 3X1 ml 10X(NH₄)₂SO₄'lü TaqBuffer, 3X1 ml 25 Mm MgCl₂ içeren Taq DNA polimeraz (Fermantas 5 U/μl, EP0402) kullanıldı.

2. 1. 8. 2. 2. Deoksi nükleotid trifosfat set

dNTP set (Fermantas 4x10 μlmol, R0185), istenilen molaritede distile su ile sulandırılarak kullanıldı.

2. 1. 8. 2. 3. Primerler

Mycobacterium tuberculosis kompleks türlerinin ayırımı için, *gyrB* gen bölgesine yönelik olarak seçilen primereler:

MTUB_c-gyrBf 5'-TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC-3'

MTUB_c-gyrBr 5'-ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG-3'

MTUB-gyrB-756-Gf 5'-GAA GAC GGG GTC AAC GGT G

MTUB-gyrB-1450-Cr 5'-CCT TGT TCA CAA CGA CTT T CGC-3' (Kasai ve ark 2000, Chimara ve ark 2004).

Kültür sonucunda, *M. avium* şüpheli üreme gösterebilecek suşların ve *M. avium* ATCC 25291 referans suşunun doğrulanması amacı ile, patojen *M. avium* suşlarında bulunan IS901 gen bölgesine yönelik olarak seçilen:

P1-IS901 5'-GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA-3'

P2-IS901 5'-TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT-3' (Kunze ve ark 1992, Pavlik ve ark 2000) oligonükleotid primeleri IDT DNA (USA) sentezletirildi.

2. 1. 8. 2. 4. Marker

100 bp DNA ladder plus (Fermentas 50 µg SM0321) kullanıldı.

2. 1. 8. 2. 5. PZR Pozitif Kontroller

M. bovis EMVKAЕ, *M. tuberculosis* H 37 Rv ve *M. avium* ATCC 2529, suşlarından hazırlanan DNA ekstraksiyonları kullanıldı.

2. 1. 8. 2. 6. Agaroz jel Elektroforezi

2. 1. 8. 2. 6. 1. Tris asetat (TBE) tamponu (10X)

Tris base	60,5 gr
Borik asit	30,85 gr
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,72 gr
Distile su	1000 ml tamamlandı.

2. 1. 8. 2. 6. 2. Agaroz jel (% 1,5) (w/v)

Agaroz	3 gr
TBE	200 ml

2. 1. 8. 2. 6. 3. Etidyum bromür stok solüsyon (10 mg/ml)

Etidyum Bromür	20 mg
Distile su	1.98 ml

Karanlıkta muhafaza edildi, agaroz jele 0,5 µg/ml oranında katıldı.

2. 1. 8. 2. 7. Yükleme tamponu

Çoğaltılan DNA'ların boyanması amacı ile, 6X loading dye solüsyonu (Fermentas, R0411) kullanıldı.

Örneklerin jele yüklenmesi için 18 göze sahip (20x0.1x8) taraklar ile agaroz jelde çukurlar açılarak, 1,4 µl (6x) yükleme tamponu ile 7 µl PCR ürünü karıştırılarak jele yüklenmiştir.

2. 1. 9. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA)

PCR ürünlerinin REA için; RsaI (Fermentas 10 U/µl, ER1121), SacII (Cfr42I) (Fermentas 10 U/µl, ER0201) enzimleri kullanıldı.

2. 2. YÖNTEM

2. 2. 1. Bakteriyoskopi

2. 2. 1. 1. Ziehl-Neelsen Boyama

- a) Hazırlanan preparatlar 10 dakika Etil alkol ile tespit edildi.
- b) Lam üzerine 10 ml karbol fuksin solüsyonu konularak alttan 4-5 dakika ısıtıldı.
- c) Boya dökülerek asit-alkolde 30 sn renksizleştirildi.
- d) Su ile yıkandı.
- e) Preparat üzerine metilen mavisi dökülerek 10-15 sn boyandı.
- f) Preparat yıkanarak kurutuldu, mikroskopta (LEITZ, Laborlux 12 Bioküler ışık mikroskobu) immersiyon objektifte incelendi. Mikobakteriumlar pembe, diğer mikroorganizmalar ve zemin mavi renkte gözlendi (Arda 1997).

2. 2. 2. Kültür

2. 2. 2. 1. Lowenstein Jensen Besiyerinin Hazırlanışı

Toz besiyerinden, 37,5 gr 600 ml distile suda eritilerek otoklav edildi. *M. avium* ve *M. tuberculosis* kültürü için besiyerine otoklavlamadan önce 12 ml gliserol eklendi. 1 litre günlük tavuk yumurtası steril şartlarda mikserde homojenize edilerek, 50 °C'ye soğutulan besiyerine eklendi. On ml besiyeri steril vida kapaklı tüplere dağıtılarak, yumurtanın koagule olması için yatık vaziyette 24 saat ara ile iki kez, 85-90 °C'de 45 dakika tutuldu. Besiyerleri +4 °C'de muhafaza edildi.

2. 2. 2. 2. Middlebrook 7H9 Broth Hazırlanması

Toz besiyerinden, 4,7 gr 900 ml distile suda eritilerek otoklav edildi. Daha sonra 45°C'ye soğutulan besiyerine 100 ml Middlebrook ADC Enrichment katıldı (pH 6,6). Gliserin ihtiyacı gösteren mikobakteriumların üretilmesi için besiyerine otoklavlama öncesi 2 ml gliserin katıldı.

2. 2. 2. 3. Klinik Örneklerin Dekontaminasyonu

Lezyonlu dokulardan ekim yapılmadan önce diğer kontaminant mikroorganizmaları inaktive etmek için, 10-20 gr numune cam homojenizatör içinde ezildi, eşit miktarda dekontaminant ile 5-10 saniye karıştırılarak oda ısısında 10 dakika tutuldu. Üzerine eşit miktarda nötralizer ilave edilerek 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi, sedimentin bir kısmı direkt mikroskopi için preparat hazırlamada kullanılırken, bir kısmı da Lowenstein Jensen besiyerine (*M. bovis* için gliserin içermeyen, *M. tuberculosis* ve *M. avium* için gliserinli) ekilerek 37°C’de 6 –8 hafta inkübasyona bırakıldı. Tüplerin kapakları haftada 2-3 kez açılarak oksijenlenmesi sağlandı (Petrof 1915, Erganiş 1994, Palamino ve Portales 1998, Ambrosio ve ark 2008). Tüm bu işlemler *Class II* Biyogüvenlik Kabini altında gerçekleştirildi.

2. 2. 3. PPD Deri Testinin Uygulanışı

Sığırlara OIE (2008 b) ve TKB, Sığır Bovine Tüberküloz Yönetmeliği’nde (Resmi Gazete 2009), belirtildiği şekilde PPD deri testi uygulandı. Tüberkülin deri testi için boynun orta üçte birlik bölgesinde, iki enjeksiyon bölgesi arasında 12-13 cm mesafe olacak şekilde derinin kılları traş edildikten sonra, deri kalınlığı kumpas (Aesculap VA 110, Germany) ile ölçüldü. Üste Bovine, alta Avian PPD, 0,1 ml dozunda deri içi insülin iğnesi ile (Medaset, China) enjekte edildi. Enjeksiyonun deri içi yapıldığı, enjeksiyon bölgesinde bezelye büyüklüğünde bir şişlik oluşması ile belirlendi (Resim 9. 5). Enjeksiyondan sonraki 72. saatte enjeksiyon bölgelerindeki deri kalınlığı kumpas ile tekrar ölçüldü. Test sonuçları aşağıdaki gibi değerlendirildi.

a) Pozitif reaksiyon: Uygulama yerinde, diffüz ya da yaygın ödem, eksüdasyon, nekroz, ağrı, lenf kanalları ya da lenf yumrularının yangısı gibi klinik belirtilerin tespit edilmesi veya sığır tüberkülinin uygulama yerindeki deri kıvrımı kalınlığının 4 mm ve üzerinde olması ve avian tüberkülinin uygulama yerindeki deri kıvrımının kalınlığından, 4 mm’den daha fazla kalınlaşma göstermesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

b) Şüpheli reaksiyon: Uygulama yerinde, pozitif reaksiyonda açıklanan klinik belirtiler bulunmuyorsa veya sığır tüberkülinin uygulama yerindeki deri kıvrımı kalınlığının 2 mm’den fazla olması ve avian tüberkülinin uygulama yerindeki deri

kıvrımının kalınlığından 1-4 mm daha fazla kalınlaşma göstermesi şüpheli reaksiyon olarak değerlendirildi.

c) Negatif reaksiyon: Uygulama yerinde, pozitif reaksiyonda açıklanan klinik belirtiler bulunmadığında veya sığır tüberkülinin uygulama yerindeki deri kıvrımı kalınlığı 2 mm'den fazla değilse veya pozitif ya da şüpheli avian reaksiyonuna eşit ya da daha az kalınlaşma oluşturan pozitif ya da şüpheli sığır reaksiyonu görüldüğünde negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

İntradermal karşılaştırmalı testte şüpheli reaksiyon veren hayvanlar en az 42 gün sonra tekrar test edilir. İkinci testte negatif reaksiyon vermeyen hayvanlar, teste pozitif reaksiyon vermiş kabul edilir (Resmi Gazete 2009).

2. 2. 4. Gamma İnterferon Testinin (BOVIGAM) Uygulanması

Test, Rothel ve ark (1990); belirttiği metoda göre uygulandı.

2. 2. 4. 1. Kan Kültürünün Duyarlılaştırılması

PPD deri testi uygulanan, sığırlardan test uygulanmasından 30 gün sonra Lithium heparinli tüplere 10 ml venöz kan alındı. Kan örnekleri alındıktan sonra 22 °C muhafaza edilerek, 12 saat içerisinde kültüre edildi. 24 gözlü hücre kültür pleytinin (Greiner Bio-one Cat:662 160) üç gözüne 1,5 ml kan alındı (Resim 9. 9). Birinci sıradaki kan örneği üzerine 100µl steril PBS (negatif kontrol, Nil antijen), ikinci göze PPD B, üçüncü göze PPD A eklenerek kan numuneleri ve antijenlerin homojen bir şekilde karışması için pleytler 1 dakika süre ile mikropleyt karıştırıcıda karıştırıldı. Mikropleytler 16-24 saat süre ile 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kan kültürleri steril ependorf tüplerine alınarak 22 °C'de 10 dakika süre ile, 500 g'de santrifüj (Hettich 32 R Germany) edildi. Plazmalar steril ependorf tüplerine aktararak, test edilinceye kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

2. 2. 4. 2. IFN- γ Sandviç ELISA

Anti IFN- γ antikorla ile kaplı mikroplyetler ve test solüsyonları çalışma öncesi oda ısısına getirildi. *Nil* antijen, *Bovine* PPD ve *Avian* PPD ile uyarılan her bir plazma numunesi, ikişer çukurda çalışıldı. Test çukurlarına 50 μ l *Green Diluent* dağıtıldıktan sonra üzerine Şekil 2. 1’de belirtildiği şekilde 50 μ l plazma örnekleri ve kontrol serumları konuldu. Mikroplyetler 1 dak. süre ile mikroplyet karıştırıcıda karıştırılarak, oda ısısında (22 °C) 60 dakika süre ile inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda; pleytler 6 kez, yıkama solüsyonu (distile su ile 20 kat sulandırıldı) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra çukurlara 100 μ l taze hazırlanan konjugat (100 kat *Blue diluent* ile sulandırıldı) eklenerek oda ısısında 60 dak. inkübe edildi. İnkübasyondan sonra yıkama işlemi tekrarlandı. Pleytlere 100 μ l taze hazırlanan substrat solüsyonu eklenerek (Chromogen, 100 kat Enzim substrat buffer ile sulandırıldı) oda ısısında, karanlıkta 30 dak. inkübe edildi. 50 μ l enzim stop solüsyonu eklenen pleytler, ELISA okuyucuda (BIOTEK *ELx800*, USA) 450 nm’de okundu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1B	1A	2N	2B	2A	3N	3B	3A	4N	4B	4A
B	5N	5B	5A	6N	6B	6A	7N	7B	7A	8N	8B	8A
C	9N	9B	9A	(+)Kontrol	(+)Kontrol	(+)Kontrol	10N	10B	10A	11N	11B	11A
D	12N	12B	12A	13N	13B	13A	14N	14B	14A	15N	15BN	15A
E	16N	16B	16A	17N	17B	17A	18N	18B	18A	19N	19B	19A
F	20N	20B	20A	21N	21B	21A	22N	22B	22A	23N	23B	23A
G	24N	24B	24A	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	25N	25B	25A	26N	26B	26A
H	27N	27B	27A	28N	28B	28A	29N	29B	29A	30N	30B	30A

Şekil 2. 1. IFN- γ Sandwich ELISA testinde plazma örneklerinin mikroplyetlere dağıtılması.

N: Negatif kontrol (PBS), **B:** PPD B, **A:** PPD A ile uyarılan plazma örnekleri

Testin Değerlendirilmesi; negatif bovine IFN- γ , OD (Optik Dansite) değerlerinin ortalaması, 0.130'dan küçük ve pozitif bovine γ -IFN OD değerlerinin ortalaması, 0.70'den büyük ise test geçerli olarak değerlendirildi.

Pozitif= OD Bovine PPD – OD Nil antijen $\geq 0,1$ ve

OD Bovine PPD – OD Avian PPD $\geq 0,1$

Negatif= OD Bovine PPD – OD Nil antijen $< 0,1$ ve

OD Bovine PPD – OD Avian PPD $< 0,1$

2. 2. 5. Humoral Bağışıklığın ELISA İle Belirlenmesi

2. 2. 5. 1. PPD B-ELISA

Tüberküloz enfeksiyonunun seyri sırasında konakçıda ortaya çıkan humoral bağışıklığın serolojik olarak belirlenmesi amacı ile Gutierrez ve ark (1998) ve Lilenbaum ve ark (1999), belirttikleri metotlar modifiye edildi.

2. 2. 5. 1. 1. Mikropleytlerin Kaplanması Kullanılacak Antijen Titresinin Belirlenmesi

Pleytlerin kaplanmasında kullanılacak PPD B (EMVKA), (1 mg/ml); protein oranı 640 μ g/ml olacak şekilde karbonat-bikarbonat solüsyonu (pH 9,6) içinde sulandırıldı. Bu antijenler 96 gözlü mikropleytlere (Greiner Bio-one Cat: 665 180) yatay ilk çukurlarına 200 μ l aktarıldı. Mikropleytlere diğer çukurlarına 100 μ l karbonat-bikarbonat solüsyonu eklenerek antijenler yukarıdan aşağıya doğru ikişer katlı olarak 1/128'e (0,5 μ g/çukur) kadar sulandırıldı. Onikinci dikey sütun kör olarak boş bırakıldı (Şekil 2. 2). Pleytlere, 37 °C'de 1 saat, +4 °C'de 1 gece inkübe edilerek antijen ile kaplandı, süre sonunda PBS-T ile üç kez yıkandı. Özgül olmayan bağlanmaları engellemek için antijen yapışmayan polystyren yüzeylerin bloklanması amacı ile 100 μ l, %1 BSA eklenerek, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlandı.

2. 2. 5. 1. 2. Serum Titresinin Belirlenmesi

Antijenle kaplanan mikropleytin tüm çukurlarına 100 µl PBS eklenerek, dikey sütundaki ilk çukurlara 100 µl *M. bovis* pozitif serum eklendi. Serumlar soldan sağa doğru 100 µl aktararak ikişer katlı olarak 1/2048'e kadar sulandırıldı (Şekil 2. 2.). Pleytler 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. PBS-T ile üç kez yıkandıktan sonra, çukurlara; 1/6000 oranında sulandırılan 100 µl *rabbit anti bovine* Ig G alkalın fosfataz konjugat (Sigma A7414) ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlanarak, 100 µl fosfat-sitrat buffer (*Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules*, Sigma P4922, USA)'da taze olarak hazırlanan - fenildiamin (*δ-phenylenediamine dihydrochloride* tablet Sigma P8287, USA) substrat eklendi. Pleytler oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için 50 µl, (0,5 M), H₂SO₄ eklenerek vakit geçirmeksizin ELISA okuyucuda 450 nm'de okundu (Resim 9. 11). Pleytlerin kaplanması en uygun antijen konsantrasyonu 1 µg/çukur, serum sulandırması 1/128 olarak belirlendi.

Serum Sul.→ Antijen Sul.↓	1 1/2	2 1/4	3 1/8	4 1/16	5 1/32	6 1/64	7 1/128	8 1/256	9 1/512	10 1/1024	11 1/2048	12
A 1 64 µg												Blank
B 1/2 32 µg												Blank
C 1/4 16 µg												Blank
D 1/8 8 µg												Blank
E 1/16 4 µg												Blank
F 1/32 2 µg												Blank
G 1/64 1 µg												Blank
H 1/128 0,5µg												Blank

Şekil 2. 2. PPD B ELISA testinde antijen ve serum sulandırmasının standardize edilmesi.

2. 2. 5. 1. 3. Konjugat Titresinin Belirlenmesi

1 µg PPD B ile kaplanan mikropleytlerin A ve B sütunundaki çukurlara 100 µl, 1/128 oranında sulandırılan pozitif serum, C ve D sütunundaki çukurlara negatif serum konuldu. Pleytler 37 °C’de 1 saat inkübe edilerek, 3 kez PBS-T ile yıkandı. Konjugat, tüplerde 1/1000’den 1/10000’e kadar PBS ile sulandırıldı. Serum inkübe edilen çukurlara 100 µl konjugat küçük sulandırmadan büyük sulandırmaya doğru eklenerek 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. 3 kez PBS-T ile yıkanarak, 100 µl substrat eklendi. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon 50 µl (0,5 M) H₂SO₄ ile durdurularak 450 nm’de okundu (Resim 9. 13). En uygun konjugat sulandırması 1/8000 olarak tespit edildi.

2. 2. 5. 2. *M. bovis* Sonike ELISA

Tüberküloz enfeksiyonunun seyri sırasında konakçıda ortaya çıkan humoral bağışıklığın serolojik olarak belirlenmesi amacı ile Speer ve ark (2006) ve Arias-Bouda ve ark (2003) belirttikleri metotlar modifiye edildi.

2. 2. 5. 2. 1. Mikropleytlerin Kaplanması İçin Antijen Hazırlanması

ELISA testinde pleytlerin kaplanmasında kullanılacak *M. bovis* (EMVKA), Lowenstein Jensen besiyerinde üretildikten sonra buradan, 200 ml, Middlebrook ADC Enrichment ile zenginleştirilen Middlebrook 7H9 broth’a ekim yapıldı. 37 °C’de 30-35 gün inkubasyon sonunda besiyerlerine % 0,5 formol ilave edilerek bir gece inaktive edildi. Bakteriler +4°C’de 12.000 g’de santrifüj edilerek toplandı. Pelet 3 kez FTS (Fizyolojik tuzlu su) ile yıkandı.

Bakteri sonikasyonunun hazırlanması için; Lowenstein-Jensen besiyerinde üretilen ve santrifüj ile toplanan yaklaşık 50-100 mg bakteri 10 ml ekstraksiyon bufferında (%0,5 Triton X-100, 10mM Tris-HCl, pH=8) süspanse edildi. Örnekler 56 °C’de 1 saat inkübe edilerek inaktive edildikten sonra, tüpler buz içerisine yerleştirilerek 80 amplitude, 4 saniye aralık, 20 dakika süre sonikasyon (Ultrasonic Processor GA 130) ile bakteriler parçalandı. 8000 g’de 30 dakika +4 °C’de santrifüj edilerek süpernatant antijen kaynağı olarak kullanıldı (Speer ve ark 2006, Arias-Bouda ve ark 2003).

Kaplama antijenlerinin protein oranları Lowry ve ark (1951)' nın önerdiği metoda dayanan BIO-RAD DC Protein Assay (Cat No. 500-0116, Bio-Rad Lab. USA) ile 4,2 mg/ml olarak ölçüldü.

2. 2. 5. 2. 2. Mikropleytlerin Kaplanmasında Kullanılacak Antijen Titresinin Belirlenmesi

Pleytlerin kaplanmasında kullanılacak *M. bovis* (4,2 mg/ml) sonikasyon ürünü protein oranı 720 µg/ml olacak şekilde karbonat-bikarbonat solüsyonu (pH 9,6) içinde sulandırıldı. Antijen 96 gözlü mikropleytlin yatay ilk çukurlarına 200 µl aktarıldı. Mikropleytlin diğer çukurlarına 100 µl karbonat-bikarbonat solüsyonu eklenerek antijenler yukarıdan aşağıya doğru ikişer katlı olarak 1/128'e (0,75 µg/çukur) kadar sulandırıldı. 12. dikey sütun kör olarak boş bırakıldı (Şekil 2. 3). 37 °C'de 1 saat, +4 °C'de 1 gece inkübe edilerek pleytlar antijen ile kaplandı, süre sonunda PBS-T ile üç kez yıkandı. Özgül olmayan bağlanmaları engellemek için antijen yapışmayan polystyren yüzeylerin bloklanması için, 100 µl, %1 BSA eklenerek, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlandı.

Antijen Sul.↓	1 1/2	2 1/4	3 1/8	4 1/16	5 1/32	6 1/64	7 1/128	8 1/256	9 1/512	10 1/1024	11 1/2048	12
A 1 72 µg												Blank
B 1/2 36 µg												Blank
C 1/4 18 µg												Blank
D 1/8 9 µg												Blank
E 1/16 6 µg												Blank
F 1/32 3 µg												Blank
G 1/64 1,5 µg												Blank
H 1/128 0,75µg												Blank

Şekil 2. 3. *M. bovis* sonike ELISA testinde antijen ve serum sulandırmasının standardize edilmesi.

2. 2. 5. 2. 3. Serum Titresinin Belirlenmesi

Antijenle kaplanan mikropleytin tüm çukurlarına 100 µl PBS eklenerek, dikey sütundaki ilk çukurlara 100 µl *M. bovis* pozitif serum eklendi. Serumlar soldan sağa doğru 100 µl aktararak ikişer katlı olarak 1/2048'e kadar sulandırıldı. Pleytler 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. PBS-T ile üç kez yıkandıktan sonra, çukurlara; 1/6000 oranında sulandırılan 100 µl rabbit anti bovine Ig G alkalın fosfataz konjugat (Sigma A7414) ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlanarak, 100 µl fosfat-sitrat buffer (*Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules*, Sigma P4922, USA)'da taze olarak hazırlanan δ -fenildiamin (*δ -phenylenediamine dihydrochloride* tablet Sigma P8287, USA) substrat eklendi. Pleytler oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için 50 µl, 0,5 M, H₂SO₄ eklenerek vakit geçirmeksizin ELISA okuyucuda 450 nm'de okundu (Resim 9. 12). Pleytlerin kaplanması en uygun antijen konsantrasyonu 3 µg/çukur, serum sulandırması 1/256 olarak belirlendi.

2. 2. 5. 2. 4. Konjugat Titresinin Belirlenmesi

3 µg, *M. bovis*, sonikasyon ürünleri ile kaplanan mikropleytlerin A ve B sütunundaki çukurlara 100 µl, 1/256 oranında sulandırılan pozitif serum, C ve D sütunundaki çukurlara negatif serum konuldu. Pleytler 37 °C'de 1 saat inkübe edilerek, 3 kez PBS-T ile yıkandı. Konjugat tüplerde 1/1000'den 1/10000'e kadar PBS ile sulandırıldı. Serum inkübe edilen çukurlara 100 µl konjugat küçük sulandırmadan büyük sulandırmaya doğru eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Üç kez PBS-T ile yıkanarak, 100 µl substrat eklendi. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon H₂SO₄ ile durdurularak 450 nm'de okundu (Resim 9. 14). En uygun konjugat sulandırması 1/8000 olarak tespit edildi.

2. 2. 5. 2. 5. Negatif Eşik Değerinin (Cut off) Hesaplanması

Negatif / Şüpheli eşik değeri, 20 adet negatif kontrol serumun aritmetik ortalamasına +3 kat standart sapma değeri ($NK_{ORT} + 3 SD$) eklenerek elde edilen optik dansite (OD) eşik değeri olarak hesaplandı (Resim 9. 15), (Amadori ve ark. 2002a).

PPD B ELISA testi için negatif eşik değeri; $0,17695 + 3 \times 0,08671 = 0,437$

M. bovis sonike ELISA negatif eşik değeri; $0,20515 + 3 \times 0,10358 = 0,515$ olarak hesaplandı.

2. 2. 6. Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PZR)

2. 2. 6. 1. DNA İzolasyonu

2. 2. 6. 1. 1. Dokudan DNA İzolasyonu

Parçalanmış doku örnekleri dekontaminasyon ve nötralizasyondan sonra 2 ml steril ependorf tüplerine alınarak üzerine 1,2 ml lizis solüsyonu (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, %2 Twen 20, 5 mg/ml Proteinase K, pH=8) eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 50 °C'de 4-6 saat süre ile termal blokta (VWR 460-3208, USA) inkübe edildi. Süre sonunda 200 µl SDS (%10 w/v) eklenerek 65°C'de 1 saat inkübe edildi. 100 µl 5 M NaCl eklenerek 15 dakika daha inkübasyona devam edildi. Süre sonunda 100 °C'de 1 saat inkübasyon yapıldı. Tüplere 1 ml Fenol: Kloroform: İzomil alkol (25:24:1), (Sigma P2069, Germany) eklenerek 30 sn karıştırıldı, 13.000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. Fenol: Kloroform: İzomil alkol basamağı tekrarlanarak 750 µl Etil Alkol (%96) ve son konsantrasyon 1/10 olacak şekilde Sodium Asetat (Merck K36523968, Germany) eklenerek 3 saat -20 °C'de inkübe edildi. Tüpler 13.000 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilerek, DNA peleti %70 soğuk Etil Alkol ile yıkandı. DNA kurutulularak 100 µl TE ile sulandırıldı (Wilsher ve ark 1998, Çataloluk ve ark 2003).

2. 2. 6. 1. 2. Kültürden DNA  zolasyonu

Lowenstein Jensen besiyerinde üretilen mikobakterium, referans ve saha su larından bir öze dolusu alınarak 500  l TE tamponu içinde homojenize edildi. 80  C’de 1 saat tutularak bakteriler inaktive edildi.  naktive edilen bakteri süspansiyonu üzerine 50  l lizozim (20 mg/ml, TE tamponu içinde) eklenerek, 37  C’de bir gece kar  tırılarak inkübe edildi. 70  l, % 10 SDS (w/v) ve 12  l Proteinaz K (10 mg/ml, TE tamponu içinde) eklenerek, termal blokta 65  C’de 30 dakika her 10 dakikada bir kar  tırılarak inkübe edildi. 100  l 5 M NaCl eklenerek kar  tırıldı. 80  l önceden ısıtılmış, %10 (w/v) N-acetyl-N, N, N-trimethyl amonyom bromür (CTAB) eklenerek sütlü bir görünüm alıncaya kadar kar  tırılarak 65  C’de 10 dakika inkübe edildi. 750  l Fenol:Kloroform: zoamil alkol (25:24:1) eklenerek 10 saniye kar  tırıldı Oda ısısında 12.000 g’de 5 dakika santrifüj edilerek, üst faz mikropipet ile yeni bir tüpe aktarıldı. 500  l isopropanol (Merck 37160895) eklenerek bir gece -20  C’de beklenerek DNA’nın presipite olması sağlandı. Oda ısısında 12.000 g’de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. DNA peleti 1 ml soğuk %70’lik etanol ile yıkanarak oda ısısında 12.000 g’de 10 dakika santrifüj edildi. DNA peleti oda ısısında kurutularak, 20  l TE tomponu ile homojenize edilerek 37  C’de 1 saat inkübe edildi. DNA, PZR analizinde kullanılıncaya kadar -20  C’de muhafaza edildi (Del Portillo ve ark 1991, Barouni ve ark 2004).

2. 2. 6. 2. Ekstraksiyonu Yapılan DNA’ların Absorbans Tayini

Ekstraksiyonu yapılan DNA  rneklerinin saflık ve miktar tayinlerini hesaplamak için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansiteleri (OD) spektrofotometre (Eppendorf, Model 6131) kullanılarak saptandı. Distile su blank olarak kullanıldı. 50  l DNA  rne i distile su ile 100  l’ye tamamlandı. 260 nm (OD260) ve 280 nm (OD280) dalga boylarında ölçümleri yapıldı. DNA  rneklerinin konsantrasyonları ng/ml cinsinden elde edildi.

OD260 ve OD280 değerlerine göre hesaplanan DNA miktarları birbiri ile oranlanarak (OD260/OD280), 1,8-2,0 arasında bulunanlar PCR’da kullanıldı. DNA miktarı düşük çıkan örneklerde ekstraksiyon tekrarlandı.

2. 2. 6. 3. DNA Amplifikasyonu

2. 2. 6. 3. 1. *M. tuberculosis* kompleks DNA Amplifikasyonu

Dokudan ve Lowenstein Jensen besiyerinde üreyen bakterilerden izole edilen mikobakterium şüpheli DNA ların, öncelikli olarak *M. tuberculosis* kompleks yönünden PZR analizleri yapıldı.

Bu amaçla *M. tuberculosis* kompleks türlerinde *gyrB* gen bölgesi, 1020 bp (baz pair) fargmenti kodlayan; **MTUB_c-gyrBf**-5'-TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC-3' ve **MTUB_c-gyrBr**-5'-ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG-3 primerleri ile PZR uygulandı (Chimara ve ark 2004, Kasai ve ark 2000).

Amplifikasyon, 50 µl PZR tamponunda gerçekleştirildi. PZR tamponu; 5 µl PCR buffer (KCl'li), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP set (10 mM), 1 µl (1 µM) her bir primer, 0,25 µl (1,25 U) Taq DNA polimeraz, 33,75 µl steril ultra saf su ve 5 µl hedef DNA içerdi. Hedef DNA, PZR-*termal cycler* cihazında (Ependorf, Matercyclers *gradient* 5331 000.010, Germany) 95 °C'de 10 dakika ön denatürasyon, 35 siklus 94 °C'de 1 dak, 65 °C 1 dak, 72 °C 1 dak ve 72 °C 10 dak son zincir uzaması ile çoğaltıldı. 5 µl DNA, 1 µl loading dye solüsyonu ile boyanadı, 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Marker olarak 1000 bp DNA ladder kullanıldı. Pozitif kontrol olarak *M. tuberculosis* H 37 Rv, negatif kontrol olarak *M. avium* ATCC 25291 referans suşlarının DNA ekstraksiyonları kullanıldı. 1020 bp büyüklüğünde bant veren DNA örnekleri *M. tuberculosis* kompleks yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Chimara ve ark 2004, Kasai ve ark 2000).

2. 2. 6. 3. 2. *M. tuberculosis* DNA Amplifikasyonu

M. tuberculosis kompleks türlerinde bulunan *gyrB* gen bölgesi üzerinde *M. tuberculosis* için spesifik 734 bp fragmenti kodlayan **MTUB-gyrB**-756-Gf 5'-GAA GAC GGG GTC AAC GGT G ve **MTUB-gyrB**-1450-Cr 5'-CCT TGT TCA CAA CGA CTT T CGC-3' primerleri ile *M. tuberculosis* H 37 Rv referans suşuna PZR uygulanadı (Kasai ve ark 2000).

Amplifikasyon, 50 µl PZR tamponunda gerçekleştirildi. PZR tamponu; 5 µl PCR buffer (KCl'li), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP set (10 mM), 1 µl (1 µM) her bir primer (MTUB-gyrB-756-Gf ve MTUB-gyrB-1450-Cr), 0,25 µl (1,25 U) Taq DNA polimeraz, 33,75 µl steril ultra saf su ve 5 µl hedef DNA içerdi. Hedef DNA, PZR-*termal cycler* cihazında 95 °C'de 10 dakika ön denatürasyon, 35 siklus 94 °C'de 1 dak, 65 °C 1 dak, 72 °C 1 dak ve 72 °C 10 dak son zincir uzaması ile çoğaltıldı. 5 µl DNA, 1 µl loading dye solüsyonu ile boyanadı, 5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1,5 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Marker olarak 100 bp DNA ladder, negatif kontrol olarak *M. bovis* EMVKA suşu kullanıldı (Chimara ve ark 2004, Kasai ve ark 2000). 734 bp büyüklüğünde bant veren DNA örnekleri *M. tuberculosis* yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Kasai ve ark 2000).

2. 2. 6. 3. 3. *M. avium* DNA Amplifikasyonu

M. avium subsp. avium türlerinde bulunan IS 901 gen bölgesi üzerinde 1108 bp fragmenti kodlayan **P1-IS901** 5'-GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA-3' ve **P2-IS901** 5'-TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT-3' primerleri ile *M. avium* ATCC 25291 referans suşuna PZR uygulandı (Kunze ve ark 1991, Pavlik ve ark 2000).

Amplifikasyon, 50 µl PZR tamponunda gerçekleştirildi. PZR tamponu; 5 µl PCR buffer (KCl'li), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP set (10 mM), 1 µl (1 µM) her bir primer (Tb11, Tb12), 0,25 µl (1,25 U) Taq DNA polimeraz, 33,75 µl steril ultra saf su ve 5 µl hedef DNA içerdi. Hedef DNA, PZR-*termal cycler* cihazında 94 °C'de 1 dakika ön denatürasyon, 30 siklus 94 °C'de 30 sn, 65 °C 2 dak, 72 °C 1,5 dak ve 72 °C 5 dak son zincir uzaması ile çoğaltıldı (Kunze ve ark 1991). 5 µl DNA, 1 µl loading dye solüsyonu ile boyanadı, 5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1,5 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Marker olarak 1000 bp DNA ladder, negatif kontrol olarak *M. tuberculosis* H 37 Rv referans suşunun DNA ekstraksiyonu kullanıldı (Kunze ve ark 1991, Pavlik ve ark 2000).

2. 2. 7. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA)

2. 2. 7. 1. *M. tuberculosis* kompleks REA

M. tuberculosis kompleks PZR pozitif suşların tür düzeyinde ayırımı için, 1020 bp'lik PZR ürünlerine Chimara ve ark (2004), Kasai ve ark (2000), Nieman ve ark (2000) belirttikleri metoda göre RsaI ve SacII enzimleri ile restriksiyon enzim analizi yapıldı.

2. 2. 7. 1. 1. RsaI Restriksiyon Endonükleaz Analizi

Enzim analizi üretici firmanın (Fermantas) belirttiği metoda göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

PZR reaksiyon karışımı	10 µl (~0,1-0,5 µg DNA)
Distile su (nuclease free)	18 µl
10X Buffer Tango	2 µl
RsaI	1 µl

Karışım birkaç dakika vorteksenerek, 37 °C'de 16 saat inkübe edildi.

2. 2. 7. 1. 2. SacII Restriksiyon Endonükleaz Analizi

Enzim analizi üretici firmanın (Fermantas) belirttiği metoda göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

PZR reaksiyon karışımı	10 µl (~0,1-0,5 µg DNA)
Distile su (nuclease free)	18 µl
10X Buffer B	2 µl
SacII	1 µl

Karışım birkaç dakika vorteksenerek, 37 °C'de 16 saat inkübe edildi.

Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA'lar; 0,5 µg/ml etidyum bromidli, %2 agaroz jelde elektroforez edildi ve bantlar UV ışık kaynağında, Chimara ve ark (2004), Nieman ve ark (2000) bildirdiği metoda göre aşağıdaki şekilde değerlendirildi. Marker olarak 100 bp'lık bant oluşturan marker kullanıldı, değerlendirme aşağıdaki şekilde yapıldı.

RsaI (5'...GT↓AC...3'), (3'...CA↑TG...5')

M. tuberculosis

360/560 bp

M. africanum subtype II

M. africanum subtype I

360/480 bp

M. bovis, (Pyrazinamid (PZA) dirençli)

M. bovis subsp. *caprae* (PZA duyarlı)

360/660 bp

M. microti

SacII (5'...CCGC↓GG...3'), (3'...GG↑CGCC...5')

Kesim Yok

M. bovis (PZA dirençli)

M. bovis BCG

280/740 bp

M. bovis subsp. *caprae* (PZA duyarlı)

3. BULGULAR

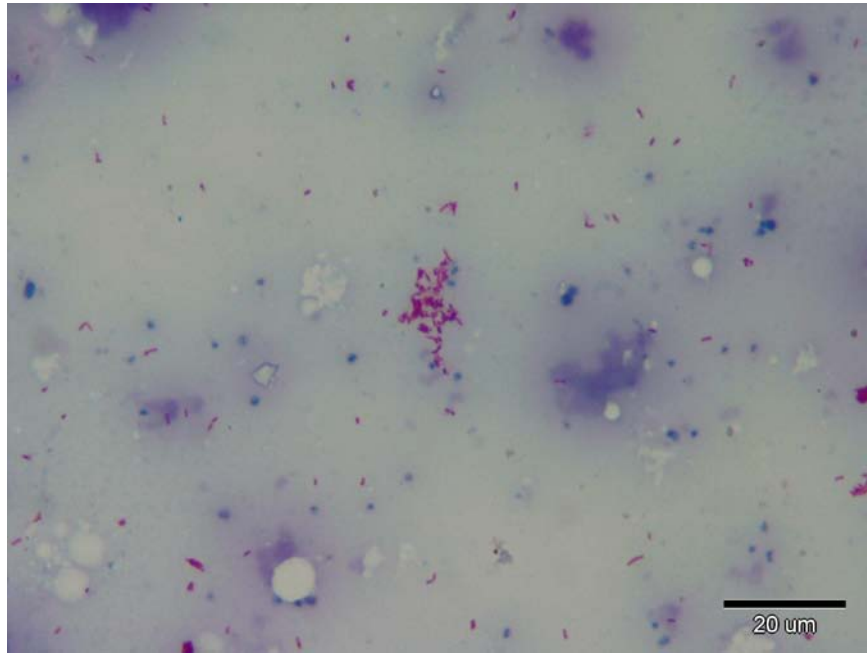
3. 1. Bakteriyoskopi ve Kùltür Sonuçları

İşletme 1, 3 ve 4'te kesimi yapılan 135 sığırdan alınan 405 lenf düğümü ve 18 tüberkülün Ziehl Neelsen boyama ile bakteriyoskopisi sonucu, **60 sığırdan alınan**, 60 akciğer lenf düğümü (ACLD), 13 preskepular lenf düğümü (PLD), 4 mezenteriyel lenf düğümü (MLD) ve 18 tüberküle (TB), (Çizelge 3. 2, Çizelge 3. 11) mikobakterium şüpheli pembe renkte, küçük basiller görüldü (Resim 3. 1).

135 sığırdan alınan 405 lenf düğümü ve 18 tüberkülün Lowenstein Jensen besiyerinde kùltürü sonucunda, **77 sığırdan alınan**, 77 ACLD, 18 PLD, 4 MLD ve 18 TB örneğinde (Çizelge 3. 2, Çizelge 3. 11), gliserinsiz Lowenstein Jensen besiyerlerinde, 6-8 hafta sürede R kolonili (Resim 3. 3) mikobakterium şüpheli üremeler görüldü.

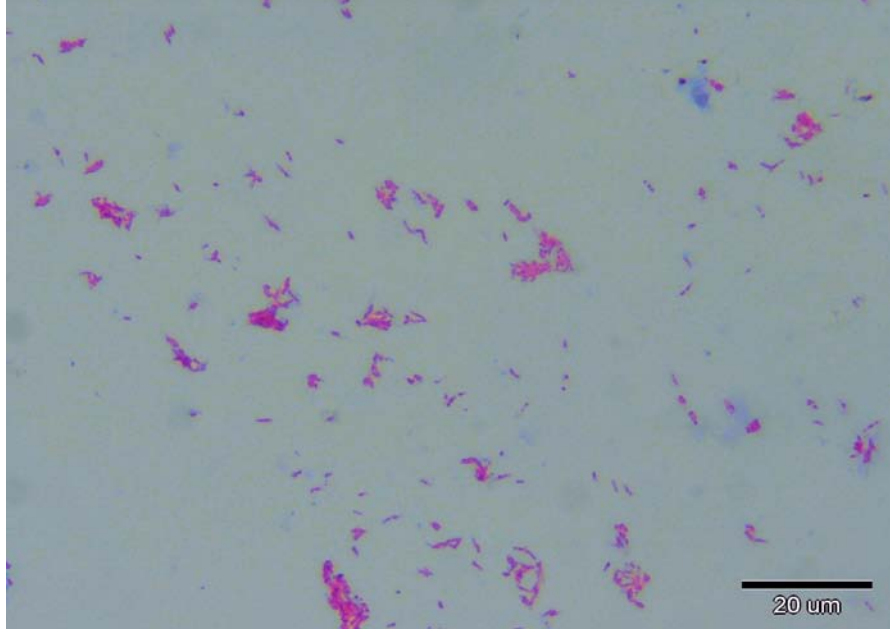
Lowenstein jensen besiyerinde mikobakterium şüpheli üreme gösteren 117 izolatın Ziehl Neelsen boyama ile bakteriyoskopisi sonucu izolatların tamamında pembe renkli küçük basiller gözlemlendi (Resim 3. 2).

Resim 3. 1. Doku örneklerinde Ziehl Neelsen boyama ile mikobakteriumlar.

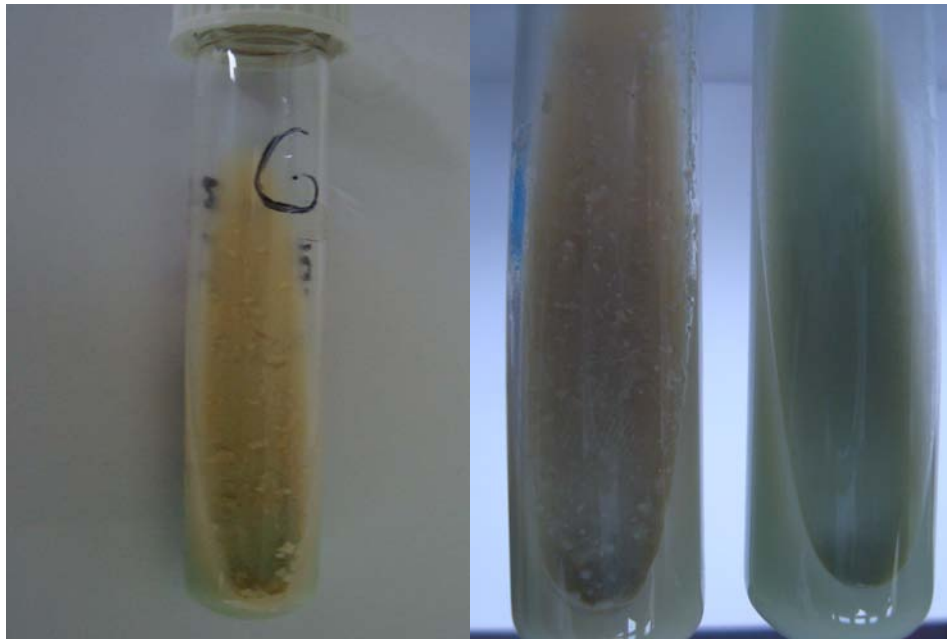


Kültür pozitif 117 doku örneğinin, 96'sında kültür öncesi bakteriyoskopi ile etken görülürken (**sensitivite**, %82,5), kültür negatif doku örneklerinin bakteriyoskopisinde etken gözlenmedi (**spesifite**, %100), (Çizelge 3. 1).

Resim 3. 2. Kültüre edilen mikobakteriumların Ziehl Neelsen boyama ile bakteriyoskopik görünümü.



Resim 3. 3. A: *M. tuberculosis* H 37 RV, **B:** *M. bovis* EMVKA suşunun Lowenstein Jensen besiyerindeki kolonileri, **C:** Ekim yapılmayan Lowenstein Jensen besiyeri.



A

B

C

İşletme 1; 340 sığırdan kesimi yapılan 56'sından alınan 171 doku örneğinin bakteriyoskopi ve kültürü sonucunda, 22 hayvana ait; 19 ACLD, 2 PLD ve 3 TB örneğinde etken görülürken, 22 ACLD, 3 PLD ve 3 TB örneğinde mikobakterium şüpheli üreme görüldü. Bu işletmede doku örneklerinde bakteriyoskopi **sensitivitesi** %85,7, **spesifitesi** %100 olarak hesaplandı.

İşletme 3; 230 sığırdan kesimi yapılan 5'inden alınan 16 doku örneğinde, 1 hayvana ait 1 ACLD, 1 PLD ve 1 TB'de bakteriyoskopi ve kültür pozitif sonuç alınmıştır.

İşletme 4; 151 sığırdan kesimi yapılan 74 hayvandan alınan 236 doku örneğinde, 54 hayvana ait, 40 ACLD, 11 PLD ve 14 TB örneğinde Ziehl Neelsen boyama ile etken görülürken, 54 ACLD, 14 PLD, 4 MLD ve 14 TB örneğinde mikobakterium şüpheli üreme görülmüştür. Bu işletmede doku örneklerinde Ziehl Neelsen boyama metodunun **sensitivitesi** %80,2, **spesifitesi** %100 olarak tespit edildi.

Çizelge 3. 1. Tüberküloz enfeksiyonunun antemortem ve postmortem teşhisinde kullanılan testlerin sensitivite ve spesifiteleri.

Test	Sensitivite	Spesifite
PPD B Deri Testi	%69,8	%98
IFN-γ (BOVIGAM)	%91,5	%93,4
PPD B ELISA	%48,2	%55,2
M. bovis sonikasyon ELISA	%31,28	%44,5
Doku Ziehl Neelsen Boyama	%82,5	%100
Doku M. tuberculosis kompleks (1020 bp) PZR	%90,5	%100
Kültür M. tuberculosis kompleks (1020 bp) PZR	%100	%100

Çizelge 3. 2. İşletmelere göre Ziehl-Neelsen boyama ve Kültür Sonuçlar

İşletme No	Kesilen Sığır Sayısı	Bakteriyoskopi Pozitif Hayvan Sayısı	Bakteriyoskopi Pozitif Numune Sayısı				Kültür Pozitif Hayvan Sayısı	Kültür Pozitif Numune Sayısı			
			PLD	ACLD	MLD	TB		PLD	ACLD	MLD	TB
1	56/340 (%16,4)	19/56 (%33,9)	2/56 (%3,5)	19/56 (%33,9)	0/56	3/3 (%100)	22/56 (%39,2)	3/56 (%5,3)	22/56 (%39,2)	0/56	3/3 (%100)
2	0/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	5/230 (%2,1)	1/5 (%20)	1/5 (%20)	1/5 (%20)	0/5	1/1 (%100)	1/5 (%20)	1/5 (%20)	1/5 (%20)	0/5	1/1 (%100)
4	74/151 (%49)	40/74 (%5,4)	10/74 (%1,3)	40/74 (%5,4)	4/74 (%5,4)	14/14 (%100)	54/74 (%72,9)	14/74 (%%18,9)	54/74 (%72,9)	4/74 (%5,4)	14/14 (%100)
5	0/40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPLAM	135*/772** (%17,4)	60/135 (%4,4)	13/135 (%9,6)	60/135 (%44,4)	4/135 (%2,9)	18/18 (%100)	77/135 (%57)	18/135 (%13,3)	77/135 (%57)	4/135 (%2,9)	18/18 (%100)

PLD: Preskapular lenf düğümü, **ACLD:** Akciğer lenf düğümü, **MLD:** Mezenteriyel lenf düğümü, **TB:** Tüberkül

** Test edilen sığır sayısı, * Kesilen sığır sayısı

3. 2. PPD Deri Testi Sonuçları

PPD-B ve PPD-A deri testi uygulanan 772 sığırdan, 169'u (%21,8) PPD-B deri testi pozitif sonuç verirken, 17'si (%2,2) hem PPD-B hem de PPD-A deri testi pozitif reaksiyon verdi (Çizelge 3. 4).

İşletme 1; 340 sığırdan 30'u (%8,82) PPD B deri testi pozitif, 310'u negatif (%91,17), 340'ı PPD A deri testi negatif sonuç verdi. Kültür sonuçları altın standart kabul edilerek PPD B deri testinin **sensitivitesi**, %70, **spesifitesi**, %96,15 olarak hesaplandı.

İşletme 2; 11 sığırdan 6'sı (%54,54) PPD B deri testi pozitif, 5'i (%45,46) negatif, 11'i PPD A deri testi negatif olarak belirlendi.

İşletme 3; 230 sığırdan 18'i (%7,8) PPD B deri testi pozitif, 1'i (%0,43) PPD A deri testi pozitif sonuç vermiştir. PPD A deri testi pozitif sonuç veren hayvanda PPD B deri kalınlaşması PPD A deri kalınlaşmasından 8 mm fazla ölçüldü.

İşletme 4; 151 sığırdan 76'sı (%50,33) PPD B deri testi pozitif, 16'si (%10,59) PPD A deri testi pozitif reaksiyon verdi. PPD A deri testi pozitif reaksiyon veren hayvanlarda PPD B deri kalınlaşması PPD A deri kalınlaşmasına göre 4 mm ve daha fazla ölçülmüştür. PPD B deri testinin **sensitivitesi** %69,73, **spesifitesi** %100 olarak belirlendi.

İşletme 5; 40 sığırın tamamı (%100) PPD B deri testi pozitif, PPD A deri testi negatif sonuç verdi.

3. 3. IFN- γ (BOVIGAM) Testi Sonuçları

İşletme 1, 2, 3 ve 4'te, IFN- γ testi uygulanan 448 sığırdan 92'si (%20,5) pozitif, 356'sı (%79,5) negatif sonuç elde edildi.

İşletme 1; 56 sığırdan 22' si (%39,28) pozitif, 34'ü (%60,71) IFN- γ testinde negatif olarak tespit edildi. Bu işletmede IFN- γ testinin **sensitivitesi** %90,9, **spesifitesi** %94,11 olarak hesaplandı. PPD B deri testi pozitif 30, serumun 23'ü (%76,6) IFN- γ testinde pozitif, 7'si (%23,3) negatif sonuç bulundu.

İşletme 2; 11 adet sığırdan 5'i (% 45,45) IFN- γ testinde pozitif sonuç verirken 6'sı (%54,55) negatif olarak belirlendi. PPD B deri testi pozitif 6, serumun 3'ü (%50) IFN- γ testinde pozitif, 3'ü (%50) negatif sonuç verdi.

İşletme 3; 230 adet sığırdan 13'ü (%5,6) IFN- γ testi pozitif sonuç verirken 217'si (%94,34) negatif olarak bulundu. PPD B deri testi pozitif 18, serumun 14'ü (%77,7) IFN- γ testinde pozitif, 4'ü (%22,2) negatif sonuç verdi.

İşletme 4; 151 sığırdan 52'si (%34,43) IFN- γ testi pozitif, 99'u (%65,57) negatif olarak tespit edildi. IFN- γ testinin **sensitivitesi** %92,3, **spesifitesi** %92,8 olarak hesaplandı. PPD B deri testi pozitif 76, serumun 52'si (%68,4) IFN- γ testinde pozitif, 24'ü (%31,6) negatif sonuç verdi.

Toplamda PPD B deri testi pozitif 130 sığırın, 94'ü (%72,3) IFN- γ testinde pozitif, 36'sı (%27,7) negatif sonuç vermiştir (Çizelge 3. 3).

3. 4. ELISA Sonuçları

3. 4. 1. PPD B ELISA Sonuçları

İşletme 1 , 2 , 3 v e 4 'te PPD B ELISA ile test edilen 448 serumun, 168'i (%37,5) pozitif, 280'i (%62,5) negatif sonuç verdi (Çizelge 3. 4).

İşletme 1; 56 serumun 32'si pozitif, (%57,1), 24'ü (%42,8) negatif sonuç verdi. Metodun **sensitivitesi**, %54,54, **spesifitesi**, %58,3 olarak hesaplandı. PPD B deri testi pozitif 30 serumun 14'ü (%46,6), PPD B ELISA testinde pozitif, 16'sı (%53,4) negatif olarak belirlendi. IFN- γ pozitif 22 serumun, 10'u (%45,4), PPD B ELISA testinde pozitif, 12'si (%54,6) negatif olarak tespit edildi.

İşletme 2; 11 serumun 5'i (%45,4) pozitif, 6'sı (%54,6) negatif sonuç verdi. PPD B deri testi pozitif 6 serumun 3'ü (%50), PPD B ELISA testinde pozitif, 3'ü (%50) negatif bulundu. IFN- γ pozitif 5 serumun 2'si (%40), PPD B ELISA testinde pozitif, 3'ü (%60) negatif olarak belirlendi.

İşletme 3; 230 serumun, 70'i PPD B ELISA pozitif (% 30,43), 150'si negatif % 65,21) sonuç verdi. PPD B deri testi pozitif 18 serumun 5'i (%27,7), PPD B

ELISA testinde pozitif, 13'ü (%72,3) negatif olarak tespit edildi. IFN- γ pozitif 14 serumun 3'ü (%21), PPD B ELISA testinde pozitif, 11'i (%79) negatif sonuç verdi.

İşletme 4; 151 serum örneğinin 61'i (%40,39) PPD B ELISA pozitif, 90'ı (%59,6) negatif sonuç verdi. Bu işletmede PPD B ELISA testinin **sensitivitesi**, %41,5, **spesifitesi**, %52,17 olarak hesaplandı. PPD B deri testi pozitif 76 serumun 33'ü (%43,4), PPD B ELISA testinde pozitif, 43'ü (%56,6) negatif sonuç verdi. IFN- γ pozitif 52 serumun, 21'i (%40,3), PPD B ELISA testinde pozitif, 31'i (%59,7) negatif olarak belirlendi.

Toplamda PPD B deri testi pozitif 130 sığira ait kan serumlarının, 55'i (%42,3) PPD B ELISA testinde pozitif, 75'i (%57,7) negatif, IFN- γ testi pozitif 92 sığira ait kan serumlarının 36'sı PPD B ELISA testinde pozitif, 57'sinde (%42,3) negatif sonuç elde edilmiştir (Çizelge 3. 3).

3. 4. 2. *M. bovis* sonikasyon ELISA Sonuçları

İşletme 1, 2, 3 ve 4'te *M. bovis* sonikasyon ELISA ile test edilen 448 serumun, 159'u (%35,4) pozitif, 289'u (%64,5) negatif olarak tespit edildi (Çizelge 3. 4).

İşletme 1; 56 serum örneğinin 19'u (%33,9) *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif, 37'si (%66) negatif sonuç verdi. Metodun, **sensitivitesi** %31,8, **spesifitesi** %50 olarak hesaplandı. PPD B deri testi pozitif 30 serumun 8'i (%26,6), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 22'si (%73,4) negatif sonuç elde edildi. IFN- γ pozitif 22 serumun 7'si (%31,8), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 15'i (%68,2) negatif olarak bulundu. *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif 19 serumun, 15'i (%78,9), PPD-B ELISA testinde pozitif, 4'ü (%21,1) negatif sonuç verdi.

İşletme 2; 11 serum örneğinin 3'ü (%27,27) *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif, 8'i (%72,7) negatif olarak belirlendi. PPD B deri testi pozitif sonuç veren 6 serumun, 2'si (%33,3), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 4'ü (%66,7) negatif sonuç verdi. IFN- γ pozitif 22 serumun 7'si (%31,8), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 15'i (%68,2) negatif sonuç elde edildi. IFN- γ pozitif 5 serumun 1'i (%20), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 4'ü (%80) negatif

olarak bulundu. *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif 3 serumun, 3'ü (%100), PPD-B ELISA pozitif sonuç elde edildi.

İşletme 3; 230 serum örneğinin 85'i (%36,9) *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif, 145'i (%63) negatif olarak belirlendi. PPD B deri testi pozitif 18 serumun, 8'i (%44,4), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 10'u (%55,6) negatif sonuç verdi. IFN- γ pozitif 14 serumun 6'sı (%42,8), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 8'i (%57,2) negatif olarak bulundu. *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif 85 serumun, 52'si (%61,17), PPD-B ELISA testinde pozitif, 33'ü (%38,8) negatif olarak tespit edildi.

Toplamda PPD B deri testi pozitif 130 sığra ait kan serumlarının, 43'ü (%42,3) PPD B ELISA testinde pozitif, 75'i (%57,7) negatif, IFN- γ testi pozitif 93 sığra ait kan serumlarının 36'sı PPD B ELISA testinde pozitif, 57'sinde (%42,3) negatif sonuç elde edilmiştir (Çizelge 3. 3).

İşletme 4; 151 serumun 52'si (%34,4) *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif , 99'u (%65,5) negatif sonuç verdi. Metodun, **sensitivitesi**, %30,76, **spesifitesi**, %39,13 olarak hesaplandı. PPD B deri testi pozitif 76 serumun, 25'i (%32,8), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 51'i (%67,2) negatif sonuç verdi. IFN- γ pozitif 52 serumun 18'i (%34,6), *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 34'ü (%65,4) negatif sonuç verdi. *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif 52 serumun 33'ü (%63,4), PPD-B ELISA testinde pozitif, 19'u (%36,6) negatif sonuç verdi. ELISA test sonuçları, PPD deri testi ve IFN- γ testi sonuçlarının birbirlerine göre durumları Çizelge 3. 3'de belirtilmiştir.

Toplamda PPD B deri testi pozitif 130 sığra ait kan serumlarının, 43'ü (%33) *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 87'si (%77) negatif, IFN- γ testi pozitif 92 sığra ait kan serumlarının 32'si (%34,7) *M. bovis* sonikasyon ELISA testinde pozitif, 60'ı (% 65,3) negatif sonuç vermiştir. (Çizelge 3. 3).

Çizelge 3. 3. PPD B deri testi, IFN- γ test, ELISA test sonuçları arasındaki ilişki.

Uygulanan Test	İşletme No				Toplam
	n=56	n=11	n=230	n=151	
	1	2	3	4	
PPD B (+) / IFN- γ (+)	30/23 (%76,6)	6/3 (%50)	18/14 (%77,7)	76/52 (%68,4)	130/94 (%72,3)
PPD B (+) / IFN- γ (-)	30/7 (%23,3)	6/3 (%50)	18/4 (%22,3)	76/24 (%31,6)	130/36 (%27,7)
PPD B (+) / PPD B ELISA (+)	30/14 (%46,6)	6/3 (%50)	18/5 (%27,7)	76/33 (%43,4)	130/55 (%42,3)
PPD B (+) / PPD B ELISA (-)	30/16 (%53,4)	6/3 (%50)	18/13 (%72,3)	76/43 (%56,6)	130/75 (%57,7)
PPD B (+) / <i>M.bovis</i> Sonikasyon ELISA (+)	30/8 (%26,6)	6/2 (%33,3)	18/8 (%44,4)	76/25 (%32,8)	130/43 (%33)
PPD B (+) / <i>M.bovis</i> Sonikasyon ELISA (-)	30/22 (%73,4)	6/4 (%66,7)	18/10 (%55,6)	76/51 (%67,2)	130/87 (%77)
IFN- γ (+) / PPD B ELISA (+)	22/10/ (%45,4)	5/3 (%40)	14/3 (%21,4)	52/21 (%40,3)	92/36 (%39,1)
IFN- γ (+) / PPD B ELISA (-)	22/12 (%54,6)	5/2 (%60)	14/11 (%78,6)	52/31 (%59,7)	92/57 (%61,9)
IFN- γ (+) / <i>M.bovis</i> Sonikasyon ELISA (+)	22/7 (%31,8)	5/1 (%20)	14/6 (%42,8)	52/18 (%34,6)	92/32 (%34,7)
IFN- γ (+) / <i>M.bovis</i> Sonikasyon ELISA (-)	15/22 (%68,2)	5/4 (%40)	14/8 (%57,2)	52/34 (%65,4)	92/61 (%66,3)
<i>M.bovis</i> Sonikasyon ELISA (+) / PPD B ELISA (+)	19/15 (%78,9)	3/3 (%100)	85/52 (%61,1)	52/33 (%63,4)	159/103 (%64,7)
<i>M.bovis</i> Sonikasyon ELISA (+) / PPD B ELISA(-)	19/4 (%21,1)	3/0	85/33 (%38,9)	52/19 (%36,6)	159/56 (%35,3)

3. 5. PZR Sonuçları

Çalışmada, kesimi yapılan 135 sığırdan alınan 405 lenf düğümü, 18 tüberkül ve bunların kültürü sonucu, mikobakterium şüpheli üreme gösteren 77 sığıra ait, 117 izolatın, *M. tuberculosis* kompleks, **MTUB_c-gyrBf'** ve **MTUB_c-gyrBr** primerleri ile PZR analizleri ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucu, **66 sığıra ait**, 66 ACLD, 18 PLD, 4 MLD, 18 TB örneği ve 117 saha izolatında, 1020 bp *M. tuberculosis* kompleks PZR ile pozitiflik elde edildi (Resim 3. 4). PZR sonuçlarının işletmelere göre durumu Çizelge 3. 4, Çizelge 3. 7-Çizelge 3. 11'de belirtilmiştir.

Kültür pozitif 117 doku örneğinin 106'sında, *M. tuberculosis* kompleks PZR ile pozitif sonuç elde edildi. Kültür sonuçları altın standart kabul edildiğinde klinik örneklerde *M. tuberculosis* kompleks türlerini belirlemeye yönelik olarak uygulanan 1020 bp PZR **sensitivitesi** % 90,5, **spesifitesi** %100 olarak belirlendi.

M. bovis EMVKAЕ ve *M. tuberculosis* H 37 Rv referans suşlarının *M. tuberculosis* kompleks PZR analizinde 1020 bp'de bantlar belirlendi.

M. tuberculosis H 37 Rv suşundan izole edilen DNA örneğine, *M. tuberculosis* için spesifik *gyrB* gen bölgesi üzerinde bulunan , **MTUB-gyrB-756-Gf** ve **MTUB-gyrB-1450-Cr** primerleri ile ve *M. avium* ATCC 25291suşundan izole edilen DNA örneğine, *M. avium subsp. avium* için spesifik, IS 901 gen bölgesi üzerinde bulunan, **P1-IS901** ve **P2-IS901** primerleri ile uygulanan PZR ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucu *M. tuberculosis* H 37 Rv, 734 bp (Resim 3. 5), *M. avium* ATCC 25291, 1018 bp (Resim 3. 6) büyüklüğünde DNA bantları oluşturdu.

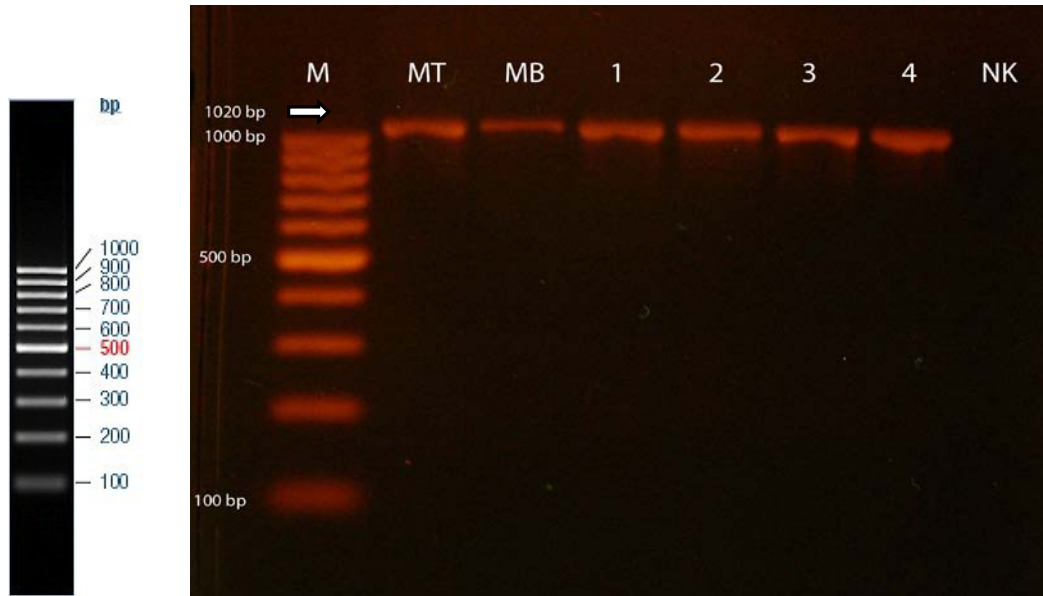
İşletme 1; 56 sığırdan alınan 171 doku örneği ve 22 sığırdan izole edilen 28 mikobakterium şüpheli saha izolatının, *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) PZR analizinde, 18 hayvana ait 18 ACLD, 3 PLD, 3 TB ve 28 saha izolatında PZR ile pozitif sonuç elde edildi..

İşletme 3; 5 sığırdan alınan 16 doku örneği ve 1 sığırdan izole edilen 3 mikobakterium şüpheli saha izolatının, *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) PZR

analizinde 1 sığıra ait 1 ACLD, 1 PLD, 1 TB ve 3 saha izolatında PZR ile pozitif sonuç belirlendi.

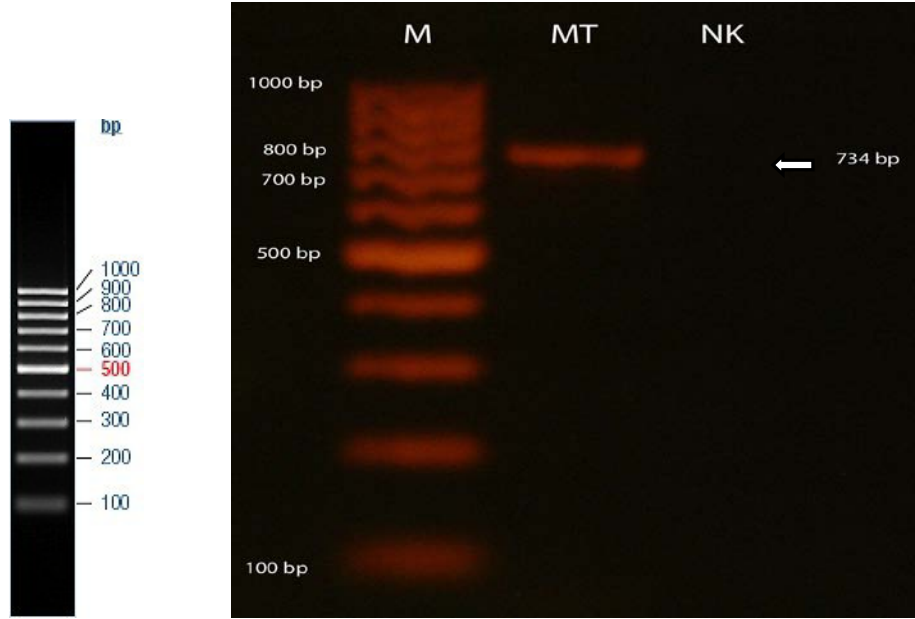
İşletme 4; 74 sığırdan alınan 236 doku örneği ve 54 sığıra ait 86 mikobakterium şüpheli saha izolatının, *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) PZR analizinde, 47 hayvana ait, 47 ACLD, 14 PLD, 4 MLD, 14 TB ve 86 saha izolatında PZR ile pozitif sonuç tespit edildi.

Resim 3. 4. *M. tuberculosis* H 37 Rv, *M. bovis* EMVKAЕ, *M. bovis* BCG ve saha izolatlarının *M. tuberculosis* kompleks PZR ile 1020 bp spesifik PZR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.



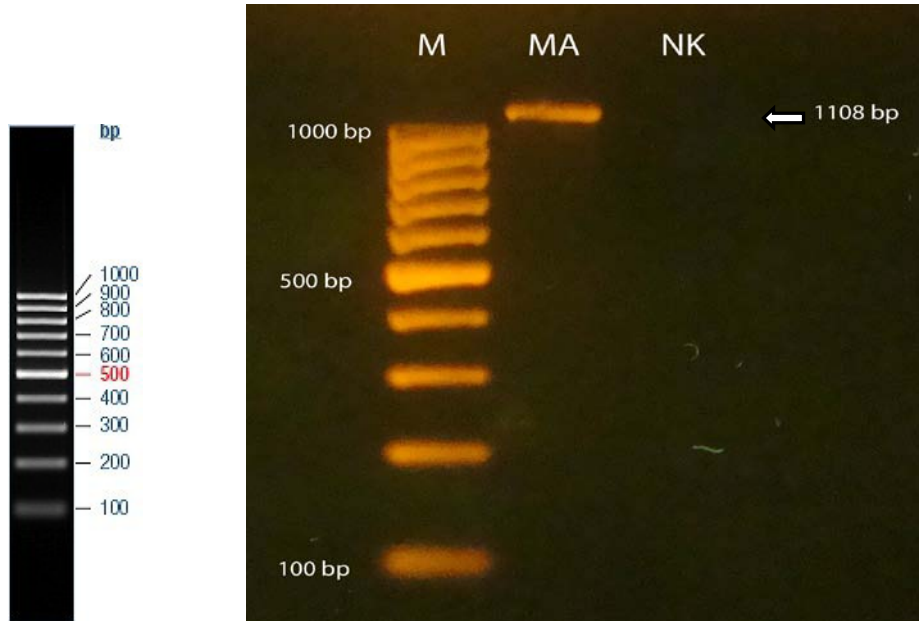
M: 100 bp marker (Fermantas), **MT:** *M. tuberculosis* H 37 Rv, **MB:** *M. bovis* EMVKAЕ, **1, 2, 3, 4:** *M. bovis* saha izolatları, **NK:** Negatif kontrol (*M. avium* ATCC 25291).

Resim 3. 5. *M. tuberculosis* H 37 Rv referans suşunun, 734 bp spesifik PZR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.



M: 100 bp marker (Fermantas), **MT:** *M. tuberculosis* H 37 Rv, **NK:** Negatif kontrol (*M. bovis* EMVKAЕ)

Resim 3. 6. *M. avium* ATCC 25291 referans suşunun, 1108 bp spesifik PZR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.



M: 100 bp marker (Fermantas), **MA:** *M. avium* ATCC 25291, **NK:** Negatif kontrol (*M. tuberculosis* H 37 Rv).

Çizelge 3. 4. İşletmelere göre PPD deri testi, IFN- γ testi, ELISA, *M. tuberculosis* kompleks PZR sonuçları.

İşletme No	Sığır Sayısı	Yaş	IFN- γ Pozitif	PPD Bovine Pozitif	PPD Avian Pozitif	Kültür <i>M. tuberculosis</i> kompleks PZR pozitif	Numune Sayısı	Doku örneği <i>M. tuberculosis</i> kompleks PZR pozitif	PPD B ELISA pozitif	<i>M bovis</i> sonikasyon ELISA pozitif
1	340	2 ↑	22/56* (%39,2)	30/340 (%8,8)	0/340	28/28 (%100)	171	24/171 (%14)	32/56 (%57,1)	19/56 (%33,9)
2	11	2 ↑	5/11 (%45,4)	6/11 (%54,5)	0/11	-	-	-	5/11 (%45,4)	3/11 (%27,2)
3	230	2 ↓	13/230 (%5,6)	18/230 (%7,8)	1/230 (%0,4)	3/3 (%100)	16	3/16 (%18,7)	70/230 (%30,4)	85/230 (%36,9)
4	151	2 ↑	52/151 (%34,4)	76/151 (%50,3)	16/151 (%10,5)	86/86 (%100)	236	79/236 (%33,4)	61/151 (%40,3)	52/151 (%34,4)
5	40	2 ↑	-	40/40 (%100)	0/40	-	-	-	-	-
TOPLAM	772		92/448 (%20,5)	170/772 (%22,02)	17/772 (%2,2)	117/117 (%100)	423	106/423 (%25)	168/448 (%37,5)	159/448 (%35,4)

* Test edilen numune sayısı.

3. 6. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA) Sonuçları

M. tuberculosis kompleks PZR pozitif 106 doku örneği ve 117 saha izolatına ait 1020 bp PZR ürünleri, *RsaI* enzimi ile 360 ve 480 bp büyüklüğünde (Resim 3. 7), DNA bantları oluşturarak *M. bovis/M. bovis subsp. caprae* olarak belirlendi.

Saha izolatlarından; 58 hayvana ait, 93'ü (%79,5), doku örneklerinden; 47 hayvana ait, 88'i (%83) *SacII* enzimi ile kesim yapılarak *M. bovis*, (PZA dirençli), saha izolatlarından 19 hayvana ait 24'ü (%20,5), doku örneklerinden 19 hayvana ait 18'i (%17) 280 ve bp büyüklüğünde DNA bantları oluşturarak (Resim 3. 8), *M. bovis ssp. caprae* (PZA duyarlı) identifiye edildi.

İşletme 1; 18 hayvana ait 24 doku örneği ve 22 hayvana ait 28 saha izolatına ait 1020 bp PZR ürünlerinin REA sonucu tüm örnekler, *M. bovis* (PZA dirençli) olarak belirlendi.

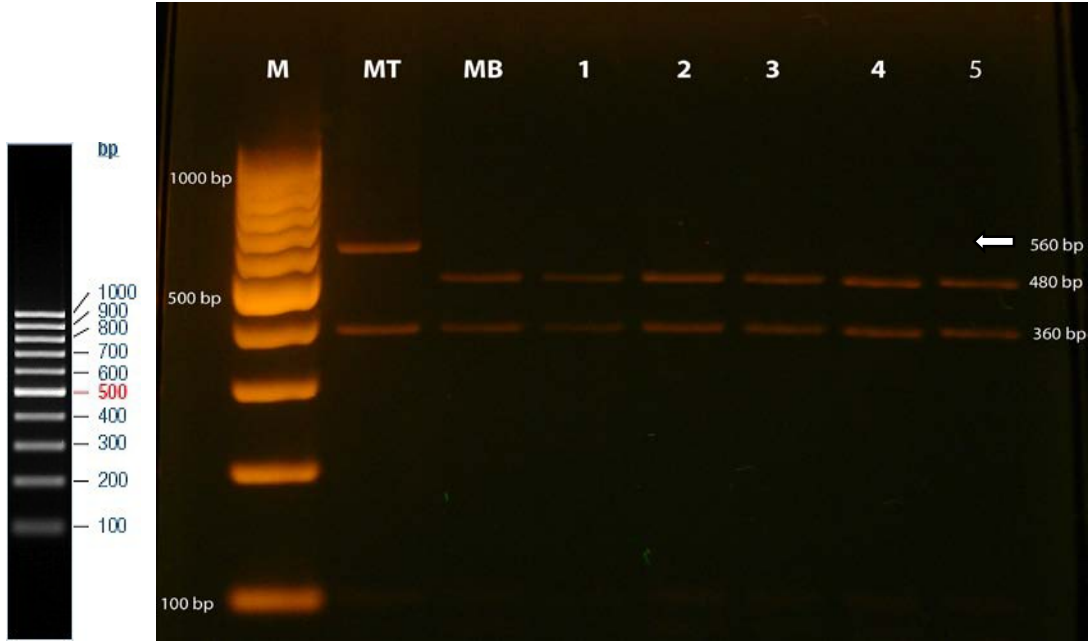
İşletme 3; 1 hayvana ait 3 doku örneği ve 3 saha izolatına ait 1020 bp PZR ürünlerinin REA sonucu tüm örnekler *M. bovis* (PZA dirençli) olarak tespit edildi.

İşletme 4; 47 hayvana ait 79 doku örneği ve 54 hayvana 86 saha izolatına ait 1020 bp PZR ürünlerinin REA sonucu, 28 hayvana ait 61 doku örneği (%77,2) ve 35 hayvana ait 62 saha izolatu (%72,1) *M. bovis* (PZA dirençli), 19 hayvana ait 14 ACLD, 2 PLD, 2 TB örneği (%22,8) ve 24 saha izolatu (%27,9) *M. bovis ssp. caprae* (PZA duyarlı) olarak belirlendi.

M. tuberculosis H 37 Rv suşuna ait 1020 bp PZR ürünleri *RsaI* enzimi ile 360 ve 560 bp büyüklüğünde DNA bantları oluşturdu (Resim 3. 7).

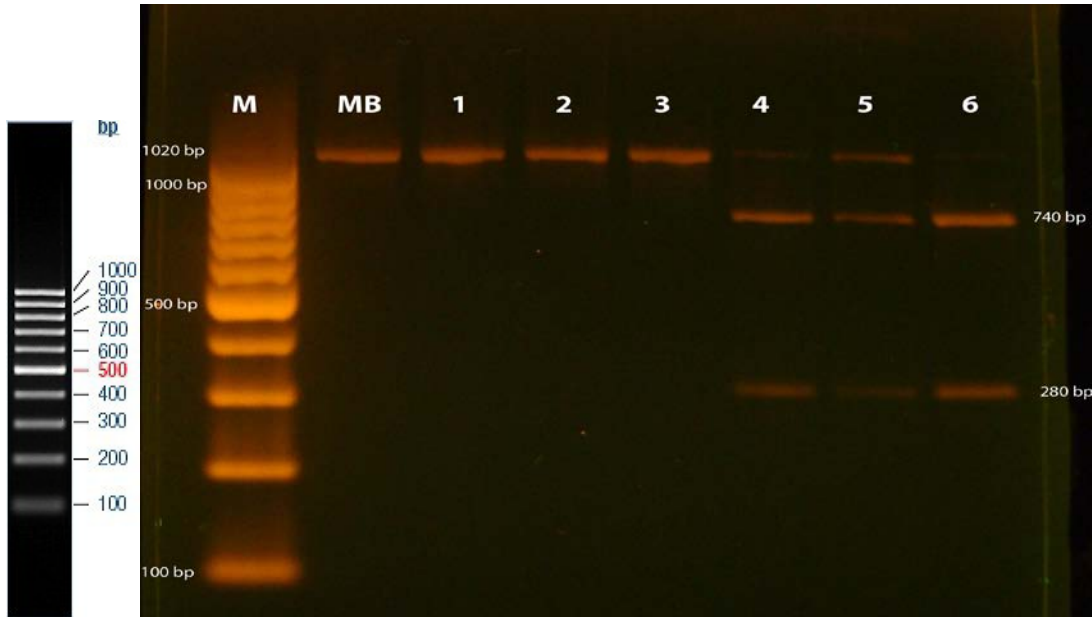
M. tuberculosis kompleks 1020 bp PZR pozitif saha izolatları ve doku örneklerinin işletmelere göre REA sonuçları Çizelge 3. 5-Çizelge 3. 11'de belirtilmiştir.

Resim 3. 7. *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) PZR ürünlerinin **RsaI** enzimi ile REA, agaroz jel elektroforez görüntüsü.



M: Marker, **MT:** *M. tuberculosis* H 37 Rv, **MB:** *M. bovis* EMVKAЕ, **1, 2, 3, 4, 5:** *M. bovis* şüpheli saha izolatları.

Resim 3. 8. *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) PZR ürünlerinin **SacII** enzimi ile REA, agaroz jel elektroforez görüntüsü.



M: Marker, **MB:** *M. bovis* EMVKAЕ, **1, 2, 3,:** *M. subsp. bovis*, **4, 5, 6:** *M. bovis subsp. caprae*.

Çizelge 3. 5. *M. tuberculosis* kompleks PZR (1020 bp) pozitif saha izolatlarının, işletmelere göre REA sonuçları

İşletme No	<i>M.tuberculosis</i> kompleks PZR pozitif izolat Sayısı	RsaI					SacII									
		360/480 bp				Toplam	280/740				Toplam	Kesim Yok				Toplam
		PLD	ACLD	MLD	TB		PLD	ACLD	MLD	TB		PLD	ACLD	MLD	TB	
1	28	3	22	-	3	28/28	-	-	-	-	-	3	22	-	3	28/28
		(%10,7)	(%78,6)		(%10,7)	(%100)						(%10,7)	(%78,5)		(%10,7)	(%100)
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3	1	1	-	1	3/3	-	-	-	-	-	1	1	-	1	3/3
		(%33,3)	(%33,3)		(%33,3)	(%100)						(%33,3)	(%33,3)		(%33,3)	(%100)
4	86	14	54	4	14	86/86	2	19	1	2	24/86	12	35	3	12	62/86
		(%16,27)	(%62,79)	(%4,65)	(%16,27)	(%100)	(%2,3)	(%22)	(%1,1)	(%2,3)	(%27,9)	(%13,9)	(%40,6)	(%3,4)	(%13,9)	(%72,09)
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	117	18	77	4	18	117/117	2	19	1	2	24/117	16	58	3	16	93/117
		(%15,3)	(%65,8)	(%3,4)	(%15,3)	(%100)	(%1,7)	(%16,2)	(%0,8)	(%1,7)	(%20,5)	(%13,6)	(%49,5)	(%2,5)	(%13,6)	(%79,4)

PLD: Preskapular lenf düğümü, **ACLD:** Akciğer lenf düğümü, **MLD:** Mezenteriyel lenf düğümü, **TB:** Tüberkül

Çizelge 3. 6. *M. tuberculosis* PZR pozitif (1020 bp) doku örneklerinin, işletmelere göre REA sonuçları

İşletme No	<i>M.tuberculosis</i> kompleks PZR pozitif doku sayısı	RsaI				SacII							
		360/480 bp				280/740				Kesim Yok			
		PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB
1	24/28	3/3	18/22	-	3/3	-	-	-	-	3/3	18/22	-	3/3
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3/3	1/1	1/1	-	1/1	-	-	-	-	1/1	1/1	-	1/1
4	79/86	14/14	47/54	4/4	14/14	2/2	13/19	1/1	2/2	12/12	34/35	3/3	12/12
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	106/423 (%25)	18/18	66/77	4/4	18/18	2/2	13/19	1/1	2/2	16/16	53/58	3/3	16/16

PLD: Preskapular lenf düğümü, **ACLD:** Akciğer lenf düğümü, **MLD:** Mezenteriyel lenf düğümü, **TB:** Tüberkül

Çizelge 3. 7. Saha izolatları ve Doku örneklerinin *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) PZR ve REA sonuçları.

Hayvan No	İşletme No	Doku örneği				Kültür <i>M.tuberculosis</i>				RsaI REA												SacII REA								Sonuç	
		<i>M.tuberculosis</i> kompleks PZR				kompleks PZR				360/560 bp				360/480 bp				360/660 bp				280/740 bp				Kesim Yok					
		PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB		
1	1	-	-	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
2	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
3	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
4	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
5	1	-	+	-	+		+		+	-			-	+			+	-		-		-			-	+			+		<i>M. bovis</i>
6	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
7	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
8	1	-	-	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
9	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
10	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
11	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
12	1	+	+	-		+	+			-	-		+	+			-	-			-	-			+	+					<i>M. bovis</i>
13	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
14	1	-	-	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>

PLD: Preskapular lenf düğümü, **ACLD:** Akciğer lenf düğümü, **MLD:** Mezenteriyel lenf düğümü, **TB:** Tüberkül

Çizelge 3. 8. Saha izolatları ve Doku örneklerinin PZR ve REA sonuçları.

Hayvan No	İşletme No	Doku örneği				Kültür <i>M.tuberculosis</i>				RsaI REA												SacII REA								Sonuç
		<i>M.tuberculosis</i> kompleks PZR				kompleks PZR				360/560 bp				360/480 bp				360/660 bp				280/740 bp				Kesim Yok				
		PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	
15	1	-	-	-			+			-				+				-				-				+				<i>M. bovis</i>
16	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+				<i>M. bovis</i>
17	1	+	+	-		+	+			-	-		+	+			-	-			-	-			+	+				<i>M. bovis</i>
18	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+				<i>M. bovis</i>
19	1	-	+	-	+		+		+	-		-		+			+	-		-		-		-		+		+		<i>M. bovis</i>
20	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+				<i>M. bovis</i>
21	1	-	+	-			+			-				+				-				-				+				<i>M. bovis</i>
31	1	+	+	-	+	+	+		+	-	-		-	+	+		+	-	-		-	-	-		+	+		+		<i>M. bovis</i>
57	4	-	+	-	+		+		+	-		-		+			+	-		-		-								<i>M. bovis</i>
58	4	-	-	-			+			-				+				-				-								<i>M. bovis</i>
59	4	-	+	-			+			-				+				-				-								<i>M. bovis</i>
60	4	-	+	-			+			-				+				-				+				-				<i>M.bovis ssp.caprae</i>
61	4	+	+	-	+	+	+		+	-	-		-	+	+		+	-	-		-	-	-		+	+		+		<i>M. bovis</i>
62	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+				<i>M. bovis</i>
63	4	-	+	-			+			-				+				-				+				-				<i>M.bovis ssp.caprae</i>
64	4	-	+	-	+		+		+	-		-		+			+	-		-		-		-		+		+		<i>M. bovis</i>

PLD: Preskapular lenf düğümü, **ACLD:** Akciğer lenf düğümü, **MLD:** Mezenteriyel lenf düğümü, **TB:** Tüberkül

Çizelge 3. 9. Saha izolatları ve Doku örneklerinin PZR ve REA sonuçları.

Hayvan No	İşletme No	Doku örneği				Kültür <i>M.tuberculosis</i>				RsaI REA												SacII REA								Sonuç	
		<i>M.tuberculosis</i> kompleks				kompleks PZR				360/560 bp				360/480 bp				360/660 bp				280/740 bp				Kesim Yok					
		PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB		
65	4	+	+	-		+	+			-	-			+	+			-	-			-	-			+	+			<i>M. bovis</i>	
66	4	-	-	-			+				-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
67	4	-	+	-	+		+		+		-			-	+			+	-		-		+		+	-		-			<i>M.bovis ssp.caprae</i>
68	4	-	+	-			+				-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
69	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+		<i>M. bovis</i>
70	4	-	+	-			+				-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
71	4	-	-	-			+				-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
72	4	-	+	-			+				-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
73	4	-	+	-			+			-	-			+	+			-	-			-			+	+					<i>M. bovis</i>
74	4	-	+	-			+				-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
75	4	+	+	-			+				-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
76	4	-	+	-			+				-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
77	4	-	+	-			+				-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
78	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+		<i>M. bovis</i>
79	4	-	+	-			+				-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>

PLD: Preskapular lenf düğümü, **ACLD:** Akciğer lenf düğümü, **MLD:** Mezenteriyel lenf düğümü, **TB:** Tüberkül

Çizelge 3. 10. Saha izolatları ve Doku örneklerinin PZR ve REA sonuçları.

Hayvan No	İşletme No	Doku örneği				Kültür <i>M.tuberculosis</i>				RsaI REA												SacII REA								Sonuç	
		<i>M.tuberculosis</i> kompleks PZR				kompleks PZR				360/560 bp				360/480 bp				360/660 bp				280/740 bp				Kesim Yok					
		PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB		
80	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
81	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
82	4	-	-	-			+			-				+				-				+				-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
83	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
84	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
85	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+		<i>M. bovis</i>
86	4	-	+	-			+			-				+				-				+				-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
87	4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-		+	+	+		-	-	-		+	+	+		-	-	-			<i>M.bovis ssp.caprae</i>
88	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
89	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
90	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
91	4	+	-	-	+	+	+		+	-	-		-	+		+	-	-	-		-	+	+		+	-	-		-		<i>M.bovis ssp.caprae</i>
92	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
93	4	-	+	-			+			-				+				-				+				-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
94	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>
95	4	-	+	-			+			-				+				-				-				+					<i>M. bovis</i>

PLD: Preskapular lenf düğümü, **ACLD:** Akciğer lenf düğümü, **MLD:** Mezenteriyel lenf düğümü, **TB:** Tüberkül

Çizelge 3. 11. Saha izolatları ve Doku örneklerinin PZR ve REA sonuçları.

Hayvan No	İşletme No	Doku örneği				Kültür <i>M.tuberculosis</i>				RsaI REA												SacII REA								Sonuç
		<i>M.tuberculosis</i> kompleks PZR				kompleks PZR				360/560 bp				360/480 bp				360/660 bp				280/740 bp				Kesim Yok				
		PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	PLD	ACLD	MLD	TB	
96	4	-	+	-			+			-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
97	4	-	+	-	+		+		+	-			-	+			+	-			-		-		+			+		<i>M. bovis</i>
98	4	-	+	-			+			-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
99	4	-	+	-			+			-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
100	4	-	-	-			+			-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
101	4	+	+	-	+	+	+		+	-	-		-	+	+		+	-	-		-	-	-		+	+		+		<i>M. bovis</i>
102	4	-	+	-			+			-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
103	4	-	+	-			+			-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
104	4	-	+	-			+			-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
105	4	-	+	-			+			-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
106	4	-	+	-			+			-				+				-				-			+					<i>M. bovis</i>
131	4	-	+	-			+			-																				<i>M. bovis</i>
132	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+			<i>M. bovis</i>
133	4	-	-	-			+			-				+				-				+			-					<i>M.bovis ssp.caprae</i>
134	4	+	+	-		+	+			-	-		+	+			-	-			-	-		+	+					<i>M. bovis</i>
208	3	+	+	-	+	+	+		+	-	-		-	+	+		+	-	-		-	-		+	+		+			<i>M. bovis</i>

PLD: Preskapular lenf düğümü, **ACLD:** Akciğer lenf düğümü, **MLD:** Mezenteriyel lenf düğümü, **TB:** Tüberkül

Çizelge 3. 12. Hayvan sayılarına göre PPD B deri testi, IFN- γ test, bakteriyoskopi, kültür, *M.tuberculosis* kompleks PZR ve REA sonuçları.

Uygulanan Test	Oran
PPD B pozitif sığır sayısı	169*/772** (%21,8)
IFN- γ test pozitif sığır sayısı	92/448 (%20,5)
Bakteriyoskopi pozitif sığır sayısı	77/135 (%57)
Kültür pozitif sığır sayısı	77/135 (%57)
Doku örnekleri <i>M.tuberculosis</i> kompleks PZR pozitif sığır sayısı	66/135 (%48,8)
Kültür <i>M.tuberculosis</i> kompleks PZR pozitif sığır sayısı	77/135 (%57)
Doku örnekleri <i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i> pozitif sığır sayısı	47/66 (%71,2)
Kültür <i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i> pozitif sığır sayısı	58/77 (%75,3)
Doku örnekleri <i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i> pozitif sığır sayısı	19/66 (%28,7)
Kültür <i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i> pozitif sığır sayısı	19/77 (%24,6)

* Test pozitif sığır sayısı

** Test edilen sığır sayısı

4. TARTIŞMA

Tüberküloz; insanlarda, sığır, koyun, keçi ve diğer memelilerde, kanatlılarda, özellikle solunum sistemi organlarında ve bunlara ait lenf düğümlerinde granülamatöz lezyonlara yol açan, kronik seyirli, zoonoz enfeksiyondur (Pollock ve ark 2001).

Tüberküloz enfeksiyonu, dünya üzerinde insan ve diğer memelilerde en önemli ölüm sebeplerinden birisidir. Yılda 2 milyon insan ölmekte ve 8 milyon yeni vaka görülmektedir (Andersen ve ark 2000). Sığırlardaki *M. bovis* enfeksiyonu ile insanlardaki tüberküloz arasında direkt ilişki bulunmaktadır. *M. bovis* sığırlarda tüberküloz enfeksiyona yol açarak ekonomik kayıplara yol açmakla birlikte insanlarda önemli bir halk sağlığı problemidir. İnsanlardaki tüberküloz vakalarının %10'unda etken *M. bovis*'tir (Cosivi ve ark 1998). Taylor ve ark (2007), demir çağına ait insan iskeletlerinde PZR ile *M. bovis*'i ortaya koymuşlardır. Sığır tüberkülozunun eradike edildiği ülkelerde, insanlardaki tüberküloz ile mücadelede büyük başarılar elde edilmiştir (Cosivive ark 1998).

M. bovis enfeksiyonu kronik seyirlidir ve uzun süre subklinik olarak seyretmektedir (Rua Domenech ve ark 2006). Enfekte hayvanlar çok uzun süre klinik belirti göstermemekte ve klinik belirtiler enfeksiyona özgü olmamaktadır. Bu yüzden enfeksiyonun yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip testler ile antemortem teşhisi eradikasyon için oldukça önemlidir (Adams 2001).

4. 1. Bakteriyoskopi

Enfeksiyonun lokalizasyonu, derecesi, klinik örneğin tazeliği ve kontaminasyon durumu, mikroskopik incelemeyi yapan personelin tecrübesi gibi nedenler metodun sensitivitesini etkileyen en önemli faktörlerdir. Yanlış pozitifliğin en önemli sebebi çevresel mikobakteriumlardır (Manzano ve ark 2008).

Mukherje ve ark (2002), 50 tüberküloz lenfadenitli hastadan cerrahi yol ile elde edilen ve kültür sonucu pozitif, lenf düğümü örneklerinin 22'sinde (%44), Goel ve Budhawar (2007), 36 akciğer dışı tüberkülozlu örneğin 13'ünde (%36,1), Ziehl Neelsen boyama ile etkeni gösterebilmişlerdir. Artan (2005), tüberkülozlu insanlarda,

Ziehl Nelsen boyamanın sensitivitesini akciğer tüberkülozunda %62,8, akciğer dışı tüberkülozda %14,2, Sevakumar ve ark (2002), akciğer tüberkülozunda sensitiviteyi %72 olarak bildirmişler ve akciğer dışı örneklerdeki sensitivite düşüklüğünün nedeni olarak etken sayısındaki azlığı göstermişlerdir.

Cancela ve Marin (1993), histopatolojik inceleme için parafinlenen tüberkülozlu sığır doku örneklerinin %52, Ortatlı ve ark (1998), %49, Beytut (2001), %62'sinde Ziehl Neelsen Boyama ile mikobakteriumları gösterirken, Shitaye ve ark (2006), 69 numunenin hiç birinde etkeni gösterememişlerdir. Okaiyeto ve ark (2008), 120 süt ineğinden 17'sinin (%14,1) sütlerinden Ziehl Neelsen boyama ile etken göstermişlerdir. Fitzgerald ve ark (2000), yabani ruminatlarda lenf düğümü örneklerinde bakteriyoskopinin sensitivitesini %90,2, spesifitesini %96,9 bildirmişlerdir.

Sığır tüberkülozunda bakteriyoskopi, postmortem muayene sonrası lezyonlu dokuların mekanik olarak parçalanması ve dekontaminasyonu sonrası gerçekleştirildiğinde örnekteki bakteri yoğunluğu artmaktadır. Proano-Perz ve ark (2006), 29 mikobakterium kültür pozitif sığır doku örneğinin 3'ünde (%10,3), Adu-Bobi ve ark (2009), 130 tüberkülozlu sığırın 95'inde (%73,3) bakteriyoskopik olarak etkeni teşhis edebilmişlerdir. Bu çalışmada, kültür pozitif 117 doku örneğinin 96'sında ve 117 mikobakterium şüpheli izolatın bakteriyoskopisinde etken görülmüştür. Doku ve organlardan direkt bakteriyoskopinin **sensitivitesi**; %82,5, **spesifitesi** %100 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3. 1).

Bu çalışmada, bakteriyoskopi öncesi doku örneklerinde lezyonlu bölgelerin seçilerek, parçalanması ve bu sırada etkenin hücre dışına çıkarılması, dekontaminasyon sırasındaki santrüfüjleme ile birim hacimdeki bakteri konsantrasyonunun artması nedeni ile sensitivitenin yüksek belirlendiği düşünülmektedir.

4. 2. Kültür

Kültür tüberküloz teŖhisinde altın standart olmakla birlikte, inkübasyon için 4-8, biyokimyasal testler için 2-3 hafta süre gerektirmekte, etkenin zoonoz ve OIE gurup III mikroorganizmalar içinde yer alması nedeni ile Biyogüvenlik Seviyesi III (BSL III) laboratuara gerek duyulmaktadır (Liebana ve ark 1995, OIE 2008c). Dekontaminasyon sırasında bakterilerin inaktive olması, diğerk bakteriler ve saprofitik mikobakteriumlar ile kontaminasyon, klinik örnekteki l mikobakteriumlar nedeni ile sensitivitesi %100 olmamaktadır (Duffield ve ark 1989, Cousins ve ark 1992).

Chambers ve ark (2001a), aerosol olarak 10^6 , 10^7 , 10^8 bak/ml dozunda enfekte ettikleri kobayların tamamında 5. haftada, Griffina ve ark (2006), *intra-tonsiller* yol ile enfekte edilen 21 sığırdan 20'sinde 20. haftada, Corner ve ark (2007), 10^1 , 10^2 , 10^3 bakteri/ml ile enfekte edilen Avrupa porsuklarının tamamında 17. haftada, O'Briena ve ark (2002), 62.500 yabancı ruminantın postmortem muayenesinde 336'sında (%0,5) *M. bovis* kültür pozitif sonuç elde etmişlerdir. Zanela ve ark (2008), Fransa'da 2001-2002 yıllarında 85 yaban domuzu lenf düğümü örneklerinden 25'inde (%29,4), 2005-2006 yılları arasında 155 örneğın 65'inde (%41,9) *M. bovis* kültüre etmişlerdir. Fitzgerald ve ark (2000), yabancı ruminatlarda lenf düğümü örneklerinde *M. bovis* kültür sensitivitesini %100, spesifitesini %98,67 olarak bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, kesimi yapılan 135 sığırdan 77'sine ait 425 numunenin 105'inde (%24,7), (18 PLD, 77 ACLD, 4 MLD, 18 TB) gliserinsiz Lowenstein Jensen besiyerinde üreme görüldü (izelge 3. 2). İzolasyonların tamamı, makroskopik olarak tüberkül görülen dokularda yapıldı. Üreme şekillenmeyen 415 numunede makroskopik lezyon gözlenmedi.

4. 3. PPD Deri Testi

PPD deri testi sığır tüberkülozunun antemortem teşhisinde kullanılan uluslararası standart testtir. Tüberkülinin deri içi enjeksiyonundan sonra oluşan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun ortaya konulması temeline dayanır (Monaghan 1994).

PPD pozitif test sonucu, tüberküloz enfeksiyonunun varlığı veya yokluğunu değil canlının daha önce tüberküloz basılı ile duyarlı hale getirildiğini göstermektedir (Raşib ve ark 2003). Bunun dışında yakın zamanda uygulanan PPD deri testi (40–60 gün), *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* gibi mikobakteriler ile çapraz antijenlere sahip bakteriler, çevresel mikobakteriler, *M. avium subsp. paratuberculosis* ile enfeksiyon, *M. bovis* BCG ile aşılama, nedeni ile PPD deri testinde yanlış pozitif sonuç alınabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı PPD deri testinin sensitivitesi düşük (%70-75) kalmaktadır (Katial ve ark 2001, Vordermeir ve ark 2001, Dunn ve ark 2005, Rua-Domenech ve ark 2006).

Enfeksiyonun yeni şekillenmesi, generalize enfeksiyon nedeni ile immün sistemin deprese olması (anerji), viral enfeksiyonlar ve kortikosteroidler gibi immün sistemi baskılayan ilaçların kullanılması, yeni doğum, gıdasal ya da nakil stresi, testin uygulanması ve değerlendirilmesindeki, PPD'nin üretiminden ve muhafazasından kaynaklanan hatalar nedeni ile PPD deri testine yanlış negatif sonuç alınabilmektedir (Rua-Domenech ve ark 2006).

Okaiyeto ve ark (2008), 120 süt ineğinden 51'inde (%42,5) PPD deri testi ile pozitiflik belirlerken, 17'sinin (%14,1) sütlerinden Ziehl Neelsen boyama ile etken göstermişlerdir. Francis ve ark (1978), Wood ve ark (1991, 1992) sığırlarda PPD deri testinin sensitivitesini %68,2-72, spesifitesini %96,8-98,8, GonzaAlez ve ark (1999) sensitiviteyi %80,2 olarak bildirmişlerdir.

Bu alışmada, PPD deri testi uygulanan 772 süt ineğinden, 169'u (%21,8) PPD-B pozitif sonuç vermiştir. İşletme 1 ve 4'te deri testinin ortalama **sensitivitesi** %69,8, **spesifitesi** %98 olarak hesaplandı (izelge 3. 1). Elde edilen PPD sonuçları GonzaAlez ve ark (1999), Francis ve ark (1978), Wood ve ark (1991, 1992) ile uyumlu bulunmuştur.

Sensitivitesini sınırlayan pek çok faktör olmasına rağmen PPD deri testi sığır tüberkülozunun antemortem teşhisinde tüm dünyada primer test olarak kullanılmaktadır. Şu ana kadar PPD deri testine alternatif bir test geliştirilip tüm dünyada kullanılabilir hale getirilememiştir (Rua-Domenech ve ark 2006). ABD, Kanada, İngiltere, İsviçre gibi ülkeler düzenli tüberkülin testi ve pozitif sığırların kesimi ile sığır tüberkülozunu eradike etmişlerdir (Cousins 2001).

4. 4. IFN- γ Testi (BOVIGAM)

IFN- γ antijenik uyam sonrası, temel olarak T lenfositlerinden salınan bir sitokindir. Mikobakteriumlara karşı immün cevap oluşturulmasında en önemli makrofaj aktivatörüdür. IFN- γ , *M. bovis* enfeksiyonunda canlıda şekillenen hücre aracılı immün cevabı ortaya koymaktadır (Pollock ve ark 2005). Enfeksiyöz etkenin alınmasından sonraki 1-4 hafta içinde, Bovine tüberkülin ya da benzer *M. bovis* antijenleri ile uyarılan perifer kan T lenfositleri ölçülebilir düzeyde IFN- γ üretmektedir (Rua-Domenech ve ark 2006)

IFN- γ testi tüberküloz enfeksiyonunu, PPD deri testine (6-9 hafta) göre daha erken (1-3 hafta) dönemde ve düşük dozdaki bakteri ile enfeksiyonda teşhis edebilmektedir (Pollock ve ark 2005). Test aynı sürüde tekrar tekrar uygulanabilmekte iken PPD deri testinde iki test aralığı 45-60 gün sürmektedir. İşletmelerin tekrar ziyaretine gerek bulunmamakta ve PPD deri testinde görülebilecek uygulamaya ve değerlendirmeye bağlı hatalar görülmemektedir (Rua-Domenech ve ark 2006).

Yüksek maliyetli laboratuvar ekipmanları, deneyimli personel ihtiyacı, yüksek kit maliyeti, kan örneklerinin alındıktan kısa süre sonra (8-12 saat), 20-25 C° ısıda laboratuvara ulaştırılması gerekliliği (Rothel ve ark 1992, Gormley ve ark 2004), kan numunelerinin alımı sırasında oluşabilecek hatalar (kanın pıhtılaşması, kulak numaralarının hatalı alınması) IFN- γ testinin dezavantajıdır. En önemli dezavantajlarından birisi de PPD deri testinde olduğu gibi, immün sistemin baskılandığı anejik hayvanlarda yanlış negatif sonuç vermesidir (Rua-Domenech ve ark 2006). Kan numunelerinin test edilmesinin gecikmesi sensitiviteyi sınırlandırmaktadır (Gormley ve ark 2004).

Rothel ve ark (1992), PPD uygulanan sığırlarda, 59. güne kadar IFN- γ düzeyinin arttığını, Whipple ve ark (2001), PPD uygulamasından sonraki üçüncü günden itibaren IFN- γ düzeyinin artmaya başladığını ve 63. güne kadar devam ettiğini, Ryan ve ark (2000), BOVIGAM testin PPD uygulamasından 28 gün sonra yapılması gerektiğini, Whelan ve ark (2004), yüksek doz *M. bovis* ile enfekte edilen buzağılarda Bovine ve Avian tüberkülin uygulamasının IFN- γ seviyesinin etkilenmediğini bildirmiştir. BOVIGAM test uygulama kılavuzunda testin PPD uygulamasından 8-28 gün sonra uygulanması önerilmektedir. Bu çalışmada BOVIGAM test için kan örnekleri PPD uygulamasından 30 gün sonra alınmıştır.

Testin uygulandığı sürünün karakterine, uygulayan laboratuara, uyarıcı antijen olarak kullanılan PPD'nin kaynağı ve üretim serisine, değerlendirmede kullanılan altın standartın ne olduğuna göre; IFN- γ testinin **sensitivitesi** %73-100, **spesifitesi** %85-99,6 olarak belirlenebilmektedir (Rua-Domanech ve ark 2006).

Gormley ve ark (2006), IFN- γ testinin sensitivitesinin (%90–93), PPD deri testinden (%70-75) daha yüksek olduğunu, deri testinin spesifitesini %99,9, IFN- γ testinin spesifitesini %95, Monaghan ve ark (1997), sensitiviteyi yorumlamadaki farklılıklara göre % 55-97, spesifiteyi %97, Wood ve ark (2001), sensitiviteyi %81-100, spesifiteyi %94-100, Öztürk ve ark (2008), 126 sığırdan 62'sinde (%49,2), IFN- γ testi, 67'sinde (%53,2) PPD deri testi ile pozitiflik belirlenir ve IFN - γ testinin sensitivitesini %90, spesifitesinin %97 olarak rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada; 4 işletmede, 448 sığırdan, 92'sinde (%20,5) IFN- γ sandwich ELISA testinde pozitiflik belirlenirken, 356'sı (%79,5) negatif olarak tespit edilmiştir. İşletme 1 ve 4'te IFN- γ testinin ortalama **sensitivitesi** %91,5, **spesifitesi** %93, 4 (Çizelge 3. 1) hesaplanarak, Monaghan ve ark (1997), Wood ve ark (2001), Rua-Domanech ve ark (2006), Gormley ve ark (2006), Öztürk ve ark (2008) ile uyumlu bulunmuştur. IFN- γ testinin sensitivitesi (%91,5) Gormley ve ark (2006) belirttiği gibi PPD deri testi sensitivitesinden (%70) yüksek, spesifitesi (%93,4), deri testi spesifitesinden (%98) düşük olarak belirlenmiştir.

4. 5. Humoral Başışıklığın ELISA ile Ölçölmesi

Tüberküloz enfeksiyonunun seyri sırasında farklı dönemlerde mikobakteriumlardan çok sayıda antijen açığa çıkmaktadır. Ancak aynı antijenlere karşı gelişen humoral cevap, vakalar arasında homojenite göstermemektedir (Hanna ve ark 1992, Lyashchenko 1998, Gupta ve Ram 2000, Özereol 2003).

Serolojik teşhiste; PPD, bakteri kültür filtratı, sonikasyon ile parçalanmış hücre ekstraktı, hücre duvarı antijenleri, pürifiye proteinler, rekombinant proteinler gibi çok sayıda antijen kullanılmasına karşın çevresel mikobakteriumlar ve diğer mikroorganizmalar ile çapraz reaksiyonlar ve antikor cevaptaki homojen olmayan yapı nedeni ile, bu antijenlerin spesifitesi düşük, rekombinant proteinlerin spesifitesi ise diğer antijenlere göre yüksek olmasına rağmen sensitiviteleri düşük olarak belirlenmiştir (Dillon ve ark 2000, Kulshrestha 2005, Julian ve ark 2001).

Reggiardo ve ark (1980), ilk kez, *M. bovis* hücre duvarından saflaştırdıkları glikolipitleri kullanarak hazırladıkları ELISA testinin sensitivitesini, %91,3, spesifitesini %97,8 olarak belirlemişlerdir. Daha sonraki yıllarda hücre duvarı glikolipitlerini kullanarak yapılan çalışmalarda elde edilen veriler birbiri ile uyuşmamaktadır. Örneğin Savage ve ark (1993), *diachyltrehalose* (DAT) spesifitesini %98, sensitivitesini %11,45 belirlerken, Escamilla ve ark (1996), spesifiteyi benzer ancak sensitiviteyi %86,7 olarak belirlemişlerdir. Torgal-Garcia ve ark (1988), fenol glikolipit, sensitivitesini %97,5, Ridell ve ark (1992), %60 olarak rapor etmişlerdir. Dillon ve ark (2000), sığır tüberkülozunda antikor cevabı belirlemek için, ELISA testinde mikobakterium 38 kDa antijeninin en iyi sonucu verdiğini (%85 sensitivite), ancak henüz yeterli sensitiviteye sahip olmadığını bildirmişlerdir.

Ülkemizde ELISA ile tüberküloz tanısı konusunda ilk çalışma Aksu ve ark (1998), tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar basilin hücre duvarı antijenini kullanarak %92 sensitivite ve %93 spesifite belirlemişlerdir. Kiran ve ark (1985), sonike edilmiş adsorbe antijen ile sensitiviteyi %88, spesifiteyi %94, Levy ve ark (1988), sensitiviteyi %70, spesifiteyi %85,4 olarak bildirmişlerdir.

Daniel ve ark (1985), aktif pulmoner tüberkülozlu insanlarda PPD-ELISA testinin sensitivitesini %56, spesifitesini %83 olarak belirlerken, Jain ve ark (2003), klinik olarak tüberküler lenfadenopati belirlenen, 225 insanda lenf düğümü aspirasyonunda, *M. tuberculosis* sonike antijenlerine karşı tavşanda hazırlanan poliklonal antikorlar ile kaplı ELISA testin sensitivitesini %91,6, spesifitesini %85,7 olarak bildirmişlerdir.

Lilenbaum ve ark (1999), bovine PPD-ELISA testinin, sensitivitesini %86,7, spesifitesini %90,6 olarak belirlerken, aynı çalışmada deri testinin sensitivitesi %87,7, spesifitesi %95,2 olarak rapor edilmiştir.

Auer (1987), Placket ve ark (1989), Casillas ve ark (1995), ELISA'nın sığır tüberkülozunun teşhisinde uygun olmadığını, deri testine alternatif olamayacağını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada; 4 işletmede PPD B ELISA ve *M. bovis* sonikasyon ELISA testi uygulanan 448 serum örneğinin. 160'ı (%35,71) PPD B ELISA pozitif, 288'i (%64,2) negatif sonuç verirken, 158 (%35,2) serum *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif, 290 (%64,7) serum negatif sonuç vermiştir.

İşletme 1 ve 4'te PPD B ELISA testinin ortalama **sensitivitesi** %48,2, **spesifitesi** %55,2, *M. bovis* sonikasyon ELISA testinin ortalama **sensitivitesi** %31,28, **spesifitesi** %44,5 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3. 1).

Sığır tüberkülozunda, antikor cevabın enfeksiyonun kronik döneminde artması (Vordermier ve ark 2004, Neill ve ark 2001) farklı dönemlerde farklı antijenik yapıların ön plana çıkması (Hanna ve ark 1992, Lyashchenko 1998, Gupta ve Ram 2000, Özereol 2003), çevresel mikobakteriumlar ve diğer mikroorganizmalar ile çapraz reaksiyonlar (Dillon ve ark 2000, Kulshrestha 2005, Julian ve ark 2001) nedeni ile bu çalışmada ELISA testinin sensitivite ve spesifitesinin düşük belirlendiği sanılmaktadır. Sığır tüberkülozunun ELISA ile yüksek sensitivite ve spesifite ile teşhisine ilişkin veriler bulunmasına karşın, aynı antijenin kullanıldığı çalışmalar arasında uyumluluk bulunmamaktadır. Tüberküloz teşhisinde yüksek sensitivite ve spesifite ile teşhise yönelik veriler bulunmasına rağmen uluslararası standart bir test geliştirilememesi de düşündürücüdür.

Bu çalışmada, PPD B ELISA testinin sensitivitesi ve spesifitesi, *M. bovis* sonikasyon ELISA testine göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bu duruma PPD'nin, konakçıda antikor cevabı uyaran mikobakteriyel antijenleri *M. bovis* sonikasyon ürünlerine göre daha saf ve yoğun olarak içermesinin neden olduğu düşünülmektedir.

PPD B ELISA pozitif test sonuçlarının PPD deri testi, IFN- γ testi, *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif test sonuçları ile sırası ile %42,3, %38,7, %64,7 oranında, *M. bovis* sonikasyon ELISA pozitif test sonuçlarının PPD deri testi ve IFN- γ pozitif test sonuçları ile %33, %34,4 oranında uyumlu olduğu gözlemlendi (Çizelge 3. 3).

4. 6. Moleküler Metotlar

4. 6. 1. PZR

Süt, kan, idrar, burun mukusu, çevresel örnekler, lenf düğümü biyopsileri, postmortem doku ve organlardan *M. bovis* teşhisinde PZR, kültüre göre zaman, doğru teşhis ve bulaşma güvenilirliği yönüyle avantaj sağlamaktadır (Vitale ve ark 1998). Ancak klinik örneklerdeki PZR inhibitörleri ve DNA izolasyonundaki yetersizlik metodun kullanımını sınırlamaktadır. PZR çoğunlukla kültüre edilen bakterinin tür düzeyinde identifikasyonunda kullanılmaktadır (Rua-Domenech ve ark 2006).

Mikobakteriumların tür düzeyinde ayırımı biyokimyasal özelliklerine göre, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), tür spesifik DNA problemleri ile hibridizasyon ve moleküler metotlar ile gerçekleştirilebilmektedir. Biyokimyasal testlerin oldukça uzun süre alması, HPLC maliyetli oluşu ve deneyimli personel ihtiyacı, DNA problemleri ile hibridizasyonun çok sayıda prob ile rastgele hibridizasyon gerekliliği gibi dezavantajları bulunmaktadır (Telenti ve ark 1993).

Liebana ve ark (1995), 49, *M. bovis* kültür pozitif sığırdan 35'ine (%71,4), kültür negatif 32 sığırdan 2'sine (%6,25) ait doku örneklerinde *M. tuberculosis* kompleks PZR ile etkeni gösterebilmişlerdir. Vitale ve ark (1998), PPD pozitif sığırlarda, süt örneklerinde ve lenf düğümü aspiratlarında PZR, sensitivite ve spesifitesini %100, burun sıvı örneklerinde sensitiviteyi %58, spesifiteyi %100

olarak bildirmişlerdir. Romero ve ark (1999), PPD deri testi negatif sığırların %12'sinde, kan, süt ve burun mukus örneklerinde, Cedeno ve ark (2005), 3'ü (%5), PPD deri testi pozitif sonuç veren, 60 sığıra ait burun mukus örneğinin 39'unda (%65) PZR ile *M. bovis* teşhis etmişlerdir. Solmaz ve ark (2009), PPD deri testi uyguladıkları 210 süt ineğinde, PPD pozitif 3 sığırın süt örneklerinde PZR ile *M. tuberculosis* kompleks belirlemişlerdir. Livingstone (2001), sığırlarda tüberküloz enfeksiyonunun antemortem teşhisinde PZR metodunun sensitivitesini %65-90, spesifitesini %98-99 rapor etmişlerdir. Yardımcı ve ark (2007), 36 lezyonlu lenf düğümü örneğinin 9'unda (%25) PZR ile *M. bovis* DNA'sını amplifiye etmişlerdir.

Milera ve ark (2002), PZR ile, mikobakterium kültür negatif 102 sığıra ait parafinlanmış doku örneklerinin 58'inde (%56,8) *M. tuberculosis* kompleks, 41'inde (%40,19) *M. avium* (11'i *M. avium subsp. paratuberculosis*) teşhis etmişler, Çataloluk ve ark (2003), insan kaynaklı, parafinlenmiş 84 deri tüberkülozu örneğinin 81'inde (%96,4) PZR pozitif sonuç elde etmişlerdir. Iralu ve ark (1993), *M. avium* septisemili insanlarda, kan örneklerinde PZR sensitivitesini %80 belirlemişlerdir. Nolte ve ark (1993); *M. tuberculosis* kültür pozitif 123 balgam örneğinin 112'sinde (%91), Rebello ve ark (2006), akciğer tüberkülozlu hastaların %41, akciğer dışı tüberküloz vakalarının %36'sında kan ve idrar örneklerinde PZR ile *M. tuberculosis* teşhis etmişlerdir.

M. tuberculosis kompleks, *M. tuberculosis*, *M. bovis subsp. bovis*, *M. bovis subsp. caprae*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* (subtypes I, II), *M. microti*, *M. canetti* ve *M. pinnipedii* içermektedir. Bu grubun üyeleri nükleotid seviyeleri ve 16SrRNA gen sekansı yönünden %99,9 benzerdir. *M. tuberculosis* kompleks üyelerini hızlı bir şekilde birbirinden ayırt etmek için, spoligotyping, *mtp40*-PZR, *pncA* ve *oxyR*-PZR, RD1-PZR, 32-kDa protein gen-PZR, *dnaJ*-PZR, *hsp 65*-PZR, *superoxide dismutase* gene-PZR, *recA*-PZR, *rpoV*-PZR, DNA hibridizasyon, multilocus enzim elektroforezi, 16S rDNA sekans analizi, 16S-23S rDNA *internal transcribed spacer* gibi moleküler metotlar geliştirilmiştir. Spoligotyping metodu deneyimli personel ve alt yapı gerektirmekte, diğer metotlar tüm türler arasında ayırım yapamamaktadır (Kasai ve ark 2000, Chimara ve ark 2004).

Hücre bölünmesinde önemli rol oynayan DNA gyrase (topoisomerase) enziminin B alt ünitesini kodlayan *gyrB* gen sekansı bir çok mikobakterium türünde bulunmaktadır (Chimara ve ark 2004).

Chimara ve ark (2004), Kasai ve ark (2000), Nieman ve ark (2000), *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türlerinde, *gyrB* gen sekansını kodlayan 1020 bp, primerleri kullanarak ve elde edilen PZR ürünlerinin restriksiyon endonuclease analizi ile hızlı, kolay, ucuz ve yüksek doğrulukla bu grubun üyelerini birbirinde ayırt etmişlerdir. *gyrB*-PCR, iki aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada 1020 bp kodlayan primerler ile PZR gerçekleştirilmekte, ikinci aşamada 1020 bp pozitif PZR ürünlerinin *RsaI* ve *SacII* enzimleri ile restriksiyon endonuclease analizi ve agaroz jel elektroforezi yapılmaktadır.

Bu çalışmada, 135 ACLD, 135 PLD, 135 MLD, 18 TB ve bunların kültürü sonucu mycobacterium şüpheli üreme gösteren 117 izolat, *M. bovis* EMVKAЕ, *M. tuberculosis* H 37 Rv ve *M. avium* ATCC 25291 referans suşlarının *M. tuberculosis* kompleks PZR (1020 bp) analizinde; 66 ACLD (%48,8), 18 PLD (%13,3), 4 MLD (%2,9), 18 TB (%100), 117 (%100) saha izolatu, *M. bovis* EMVKAЕ ve *M. tuberculosis* H 37 Rv, referans suşları pozitif DNA bantları verirken, *M. avium* ATCC 25291 ile 1020 bp’de bant gözlenmemiştir (Çizelge 3. 4).

Klinik örneklerde *M. tuberculosis* kompleks PZR (1020 bp) **sensitivitesi** %90,5, **spesifitesi** %100 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3. 1). PZR bulguları Vitale ve ark (1998), Çataloluk ve ark (2003) ile uyumlu bulunmuştur.

PZR metodunun, kültüre edilmiş mikobakteriumların tür düzeyinde identifikasyonunda, klinik örneklerde kullanımına göre daha duyarlı sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Liebana ve ark 1995, Wards ve ark 1995, Amadori ve ark 2002b). Bu çalışmada, Lowenstein Jensen besiyerinde kültüre edilen mikobakterium şüpheli 117 izolatın tamamında *M. tuberculosis* kompleks PZR pozitif sonuç elde edilmiştir.

Bu çalışmada, *M. tuberculosis* kompleks türlerinde bulunan *gyrB* gen bölgesi üzerinde *M. tuberculosis* için spesifik 734 bp fragmenti kodlayan MTUB-*gyrB*-756 ve MTUB-*gyrB*-1450-Cr primerleri ile *M. tuberculosis* H 37 Rv referans suşuna

uygulanan PZR ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde türe özgü 734 bp büyüklüğünde DNA bantları elde edildi (Resim 3. 5).

M. avium kompleks; *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *sylvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis* ve *M. genavense* olarak 5 alt türe ayrılmaktadır (Mendenhall 2000, Mijis 2002).

M. avium kompleks seroaglutinasyon metodu ile 28 serovara ayrılmıştır. Serovar 1-6, 8-11 ve 21, *M. avium*, Serovar 7, 12 ve 20 *M. intracellulare*, Serovar 22-24, 26-28, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* ve sınıflandırılmayan mikobakteriumları içermektedir (Cardoso Leao ve ark 1999).

M. avium subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *sylvaticum*; kanatlılarda tüberküloz, sığırlarda ve insanlarda lenf düğümü (Picardeau 1996) ve akciğer enfeksiyonlarına, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; ruminantlarda *Johne's disease* (paratüberküloz), insanlarda *Chron's disease* (OIE 2008a,b), *M. intracellulare*, insanlarda, sığır, domuz ve kanatlılarda (Hensyl 1994), *M. avium* subsp. *hominissuis*, insan ve domuzlarda (Mijis 2002), *M. genavense* insan, kanatlı ve köpek gibi hayvanlarda (Mendenhall 2000) tüberküloz benzeri enfeksiyonlara yol açmaktadır. *M. avium* subsp. *avium* insanlarda fırsatçı patojendir, özellikle immün sistemi baskılanmış ve AIDS'li insanlarda enfeksiyona sebep olmaktadır (Kunze ve ark 1992).

M. avium kompleks türlerinin birbirinden ayırımında, 16S rRNA, *internal transcribed spacer* (ITS), 16S-23S ribosomal DNA PZR, 16S rRNA problemleri (Gen-Probe), RFLP (Restriction fragment length polymorphisms) gibi moleküler metotlar kullanılmıştır.

Kunze ve ark (1991), *M. avium* kompleks türlerinin ayırımında ilk kez insertion sekanslarını (IS) kullanmışlardır. *M. avium* subsp. *avium* için IS901, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* için IS900, *M. intracellulare* için IS902 primerleri ile PZR uygulamışlardır. Pavlik ve ark (2000), IS901 sekansının patojen *M. avium* serotip 1, 2 ve 3'te bulunduğunu ve patojenite ile ilgili olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada; ACLD, PLD, MLD ve TB örneklerinden *M. avium* subsp. izole edilemedi. *M. avium* ATCC 25291 referans suşuna, P1-IS901 ve P2-IS901 primerleri ile uygulanan PZR ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde, türe özgü 1018 bp büyüklüğünde DNA bantları elde edildi (Resim 3. 6).

4. 6. 2. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA)

Restriksiyon enzimleri (RE), çok özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek genellikle 1000-20000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir (Persing 1993). DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısının kıyaslanması ile elde edilen çeşitliliğe “*Restriction Endonükleaz Analizi (REA)*” adı verilir. REA, dört temel adımda gerçekleştirilmektedir. Bunlar; DNA'nın izolasyonu, DNA'nın RE ile kesilmesi, kesilen DNA'larının elektroforezi ve en son aşamada ise jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesidir (Vines ve ark 1992, Persing 1993).

Bu çalışmada, 117 saha izolatu (18 PLD, 77 ACLD, 4 MLD ve 18 TB) ve 106 doku örneğine (18 PLD, 66 ACLD, 4 MLD, 18 TB) ait *M. tuberculosis* kompleks PZR ürünleri, *RasI* enzimi ile, *M. bovis/M. bovis subsp. caprae* olarak belirlendi.

Saha izolatlarına ait PZR ürünlerinin; **93'ü (%79,5)**, (16 PLD, 58 ACLD, 3 MLD, 16 TB), doku örneklerine ait **88'i (%83)**, (16 PLD, 53 ACLD, 3 MLD, 16 TB) *SacII* enzimi ile, *M. bovis* (PZA dirençli), saha izolatlarına ait **24'ü (%20,5)**, (2 PLD, 19 ACLD, 1 MLD, 2 TB) ve doku örneklerine ait **18'i (%17)**, (2 PLD, 13 ACLD, 1 MLD, 2 TB) *M. bovis ssp. caprae* (PZA duyarlı) olarak identifiye edildi (Çizelge 3. 5, Çizelge 3. 6).

M. caprae ilk olarak koyun ve keçilerden izole ve identifiye edilirken, daha sonra evcil ve yabani sığırlarda, insanlarda atlarda, kedi, köpek ve domuzlardan izole ve identifiye edilmiştir (Lantos ve 2003). *M. bovis*, Aranaz ve ark (1999), teklifi ile, *M. bovis subsp. bovis* (PZA dirençli) ve *M. bovis subsp. caprae* (PZA duyarlı) olarak iki türe ayrılmıştır.

Lantos ve ark (2003), Budapeşte hayvanat bahçesinde 8 yaşında erkek Sibirya kaplanından aldıkları bronko alveoler lavaj örneğinde *M. bovis subsp. caprae* izole ve identifiye etmişlerdir. Cvetnic ve ark (2006), aynı çiftlikte bulunan, 6 sığır ve 4 domuzun iç organlarından izole ettikleri *M. bovis* suşlarını, *M. bovis subsp. caprae* olarak identifiye etmişlerdir.

Prodinger ve ark (2002) ve Kubica ve ark (2003), *M. bovis subsp. caprae*'nin Avrupa'da sığır tüberkülozunun en önemli nedeni olduğunu, insanlardaki sığır tüberkülozu olgularında da önemli yeri olduğunu bildirmişlerdir. Kubica ve ark (2003), 1999-2001 yılları arasında Almanya'da insanlarda tüberküloz vakalarından izole ettikleri 137 *M. bovis* suşunun 41'ini (%29,9) *M. bovis subsp. caprae* olarak tiplendirmişlerdir.

M. bovis subsp. bovis ve *M. bovis subsp. caprae*, yalnızca moleküler metotlar ile birbirinden ayırt edilebilmektedir (Cvetnic ve ark 2006).

Bu çalışmada; *M. tuberculosis* kompleks PZR pozitif saha izolatlarının %20,5'i, (19 sığıra ait) doku örneklerinin %17'si (19 sığıra ait) PZR-REA ile *M. bovis subsp. caprae* olarak identifiye edilmiştir (Çizelge 3. 12).

Türkiye'de sığır ve insanlarda tüberküloz vakalarında, *M. bovis subsp. capre* izolasyonu ile ilgili yayınlanmış veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, ülkemizde ilk kez sığır tüberküloz vakalarında ***M. bovis subsp. caprae*** izole ve identifiye edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Sığır tüberkülozunun antemortem teşhisinde, IFN- γ testinin yüksek sensitivite ve spesifitesi ile tek başına kullanılabileceği, ancak yüksek kit maliyeti, kan numunelerinin en geç 8-12 saat içerisinde 20-22°C'de laboratuara ulaştırılmasının gerekmesi, uygun laboratuvar alt yapısı ve tecrübeli personel ihtiyacı gibi nedenlerle rutin kullanımının sınırlı olduğu,

2. PPD deri testinin düşük sensitivitesine rağmen saha şartlarında uygulanabilmesi ve düşük maliyeti nedeni ile sığır tüberkülozunun antemortem teşhisinde alternatifsiz olduğu,

3. PPD ELISA ve *M. bovis* sonikasyon ELISA testlerinin oldukça ucuz olmalarına rağmen, düşük sensitivite ve spesifiteleri ile sığır tüberkülozunun antemortem teşhisine, uygun olmadığı ancak diğer testler ile negatif sonuç alınan sığırların tekrar test edilmesinde kullanılabileceği,

4. Postmortem teşhiste kültür en güvenilir metot olmakla birlikte etkenin inkübasyon süresinin oldukça uzun süre alması, diğer mikroorganizmalar özellikle mantarlar ile kontaminasyon, çevre ve personele bulaşma riski nedeni ile uygun olmadığı,

5. Postmortem klinik örneklerde PZR ve bakteriyoskopinin yüksek sensitivite ve spesifiteleri ile kültüre alternatif olabileceği, antemortem teşhiste diğer metodlar ile negatif sonuç alınan sığırlarda burun mukusu ve süt örneklerinde etkenin ortaya konulmasında faydalı olabileceği, bu yöndeki çalışmaların artırılması gerektiği,

6. REA metodunun *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin tür düzeyinde identifikasyonunda başarılı olduğu,

7. Sığır tüberkülozunda, *M. bovis* subsp. *bovis* dışında, *M. bovis* subsp. *caprae*'nin etken olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, 5 süt sığırcılığı işletmesinde, 3 farklı antemortem teşhis metodu ile test edilen sığırlarlarda tüberküloz enfeksiyonunun sürü prevalansı %100, sürü içi prevalans ise PPD deri testine göre %21,8, IFN- γ testine göre %20,5, PPD ELISA

testine göre %35,7, *M. bovis* sonikasyon ELISA testine göre %35,2 olarak belirlendi. Türkiye’de, sığır tüberkülozunda ilk defa etken olarak *M. bovis* subsp. *caprae* izole ve identifiye edildi. Antemortem teşhiste kullanılan metotların, tek başlarına yeterli olmadığı, farklı metotlar ile elde edilen sonuçların kombine edilmesi gerektiği, Mikobakteriumların zoonoz olması ve resmi verilerin aksine sığır tüberküloz prevalansının oldukça yüksek olması (%21,8-%35,7) nedeni ile insan tüberkülozu ile mücadele ve sığır tüberkülozundan kaynaklanan ekonomik kayıpları azaltabilmek için eradikasyon çalışmalarına daha fazla önem verilmesi, insan tüberküloz vakalarında *M. bovis* alt türlerinin izolasyon ve identifikasyonunun göz ardı edilmemesi gerektiği kanaatine varıldı.

6. ÖZET
T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sığırlarda Tüberkülozun Farklı Metotlar İle Karşılaştırmalı Teşhisi

Zafer SAYIN

Mikrobiyoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2010

Bu çalışmada mikobakterium kültür sonuçları altın standart kabul edilerek sığır tüberkülozunun antemortem ve postmortem teşhisinde ideal metot belirlenmeye çalışıldı. Konya (2), Çorum (2) ve Aksaray'da (1) bulunan 5 farklı çiftlikteki, 772 adet süt ineğine PPD B (Bovine) ve PPD A (Avian) deri testi uygulandı. PPD deri testi uygulanan sığırların 448'inden otuz gün sonra kan örnekleri alınarak BOVIGAM (IFN- γ) ve PPD B ELISA, *M. bovis* sonikasyon ELISA testleri uygulandı. PPD ve IFN- γ pozitif test sonuçlarına seçilen 135 sığırın kesimleri yaptırılarak, akciğer (ACLD), preskapular (PLD), mezenteriyel (MLD) lenf düğümleri ve tüberkül (TB) örnekleri alındı. Postmortem doku örneklerinin Ziehl Neelsen boyama metodu ile bakteriyoskopik muayeneleri, Lowenstein Jensen besiyerinde kültürleri ve *M. tuberculosis* kompleks PZR analizleri yapıldı. Lowenstein Jensen besiyerinde mikobakterium şüpheli üreme gösteren kolonilerin bakteriyoskopik incelemeleri ve *M. tuberculosis* kompleks PZR analizleri gerçekleştirildi. *M. tuberculosis* kompleks PZR pozitif sonuç elde edilen DNA ürünlerinin tür düzeyinde identifikasyonları için, SacII ve RsaI, enzimleri ile Restriksiyon Endonükleaz Analizleri (REA) yapıldı.

Postmortem klinik örneklerde bakteriyoskopinin sensitivitesi %82,5, spesifitesi %100 olarak belirlendi, 77 sığıra ait 99 lenf düğümü ve 18 tüberkülden etken izole edildi.

PPD deri testi uygulanan 772 sığırın 169'unda (%21,8) PPD B pozitif olarak belirlendi, metodun sensitivitesi %69,8, spesifitesi %98 tespit edildi.

Kan örnekleri alınan, 448 sığırın 92'sinde (%205) IFN- γ testi, 160'ında (%35,7) PPD B ELISA testi, 158'inde (%35,2) *M. bovis* sonikasyon ELISA testi ile pozitif sonuç elde edildi. IFN- γ

testi, PPD B ELISA ve *M. bovis* sonikasyon ELISA testlerinin sensitivite ve spesifite oranlarıyla, %91,5, %48,2, %31,28 ve spesifite oranları %93,4, %55,2, %44,5 olarak hesaplandı.

425 postmortem doku örneğinin ve Lowenstein Jensen besiyerinde üreyen mikobakterium şüpheli 117 izolatın *M. tuberculosis* kompleks PZR analizinde, 66 sığra ait 88 lenf düğümü, 18 tüberkül örneği ve izolatların tamamına ait DNA örnekleri *M. tuberculosis* kompleks olarak belirlendi. PZR ürünlerinin REA sonucunda saha izolatlarından 93'ü (58 sığırdan izole edilen) *M. bovis*, 24'ü (19 sığırdan izole edildi) *M. bovis* subsp. *caprae*, doku örneklerine ait PZR ürünlerinin 88'i (47 sığra ait) *M. bovis*, 18'i (19 hayvana ait) *M. bovis* subsp. *caprae* olarak tanımlanmıştır. Postmortem klinik örneklerde *M. tuberculosis* kompleks PZR metodunun sensitivitesi %90,5, spesifitesi %100 olarak tespit edildi.

Sonuç olarak, 5 işletmede 3 farklı antemortem teşhis metodu ile sığır tüberkülozunun sürü prevalansının %100, sürü içi prevalansın PPD deri testi, IFN- γ testi, PPD BELISA ve *M. bovis* sonikasyon ELISA testlerine göre sırası ile %21,8, %20,5, %35,7 ve %35,2 olduğu belirlendi. Sığır tüberkülozunun antemortem teşhisinde IFN- γ testinin tek başına kullanılabileceği ancak saha taramalarında kullanımının sınırlı olduğu, PPD deri testinin düşük sensitivitesine rağmen alternatif olarak kullanılabileceği, mikobakteriumların tür düzeyinde tanımlanmasında REA metodunun uygun olduğu, sığır tüberkülozunda *M. bovis* dışında, *M. bovis* subsp. *caprae*'nin de etken olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Tüberküloz; PPD; IFN- γ ; ELISA, *M. bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*

7. SUMMARY
T.C.
SELÇUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE

Comparative Diagnosis of Cattles Tuberculosis by Different Methods

ZAFER SAYIN

Department of Microbiology (VET)

THESIS OF DOCTORATE-2010

The aim of this research was to determination of the best method in postmortem and antemortem diagnosis of bovine tuberculosis as bacteriological culture accepted to be the gold standard. PPD B (Bovine) and PPD A (Avian) tuberculin tests were performed in 772 dairy cattle of five different farms located in Konya (2), Aksaray, and Çorum (2). Blood samples were collected from PPD tuberculins administered 448 cattle after 30 days, and samples were analyzed by BOVIGAM (IFN- γ), PPD B ELISA, *M. bovis* sonikasyon ELISA tests. 135 cattle were slaughtered according to positive observed results of PPD tuberculin and IFN- γ test. Bronchial, mesenteric, prescapular lymph node and tubercules samples were taken from slaughtered cattle. Tissue samples were stained with Ziehl-Neelsen method and examined in direct microscopy. They were cultured in Lowenstein Jensen medium and PZR technique to detect the members of *M. tuberculosis* complex. Suspected mycobacteria colonies cultured in Lowenstein Jensen medium were examined with direct microscopy and *M. tuberculosis* complex PZR technique. Restriction Endonuclease Analysis (REA) of *M. tuberculosis* complex PZR positive amplified products were done with SacII and RsaII enzymes for identification of strains.

The sensitivity and specificity of the direct microscopy with Ziehl Neelsen method in postmortem tissue samples were detected 82,5% and 100%, respectively. *Mycobacterium ssp.* were isolated from 99 lymphatic nodule and 18 tubercule samples obtained from 77 cattle.

PPD B tuberculin positive was found in 169 (21,8%) out of 772 tested cattle, and the sensitivity and specificity of this method were detected 69,8% and 98%, respectively.

IFN- γ test, PPD B ELISA test and *M. bovis* sonication ELISA test positive were determined in 92 (20,5%), 160 (35,7%) and 158 (35,2%) out of 448 cattle, respectively. The sensitivity and specificity of these methods were 91,5%, 48,2%, 31,2% and 93,4%, 55,2%, 44,5%, respectively.

In *M. tuberculosis* complex PZR analysis of 425 postmortem tissue samples and 117 bacterial strains cultured in Lowenstein Jensen medium, DNA of the 88 lymphatic nodules and 18 tubercles samples obtained from 66 cattle and all isolate was detected as *M. tuberculosis* complex. 93 bacterial strains obtained from 58 cattle and 88 tissue samples obtained from 47 cattle were identified as *M. bovis* with REA of these PZR products. 24 bacterial strains and 18 tissue samples obtained from 19 cattle were identified as *M. bovis* subsp. *caprae*. The sensitivity and specificity of the *M. tuberculosis* complex PZR method of tissue samples were detected 90,5% and 100%, respectively.

Consequently, the herds prevalence of cattle tuberculosis was found %100 by using four different antemortem diagnosis methods in five farms, and the individual prevalence was found 21,8%, 20,5%, 35,7% and 35,2% according to PPD tuberculin, IFN- γ , PPD B ELISA and *M. bovis* sonication ELISA tests, respectively. IFN- γ test has sensitivity 91,5 and specificity 93,4%, and it can be used conveniently in the antemortem diagnosis of bovine tuberculosis. However, the application of this method is limited for herds screening. The PPD tuberculin test is unprecedented in spite of its low sensitivity. The PPD B and *M. bovis* sonication ELISA tests did not useful for diagnosis of bovine tuberculosis. *M. tuberculosis* complex PZR method can be used alternatively to culture in postmortem diagnosis, and REA method can be suitable for identification of mycobacterium strains. In addition to *M. bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae* was determined as agent in bovine tuberculosis.

Key Words: Tuberculosis; PPD; IFN- γ ; ELISA; *M. bovis*; *M. bovis* subsp. *caprae*

8. KAYNAKLAR

1. Adams LG. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties. 2001; 20 (1): 304-324.
2. Akay Ö, Aydın N, Arda M, Hazıroğlu R. Bir mink'te saptanan tüberkülozis olgusu üzerinde araştırma. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1984; 31: 463.
3. Akay Ö, Hazıroğlu R, Kutsal O. Bir kedide rastlanan tüberküloz olgusu. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1985; 32: 438.
4. Akay Ö. Aside dirençli bakteriler. In: Arda M, editör. Özel Mikrobiyoloji. 4. baskı. Ankara: Medisan Yayın Evi. 1997. 179-198.
5. Adu-Bobi NAK, Mak-Mensah EE, Achel DG, Gyafmi OK, Bedzra KD. Preliminary investigation of bovine tuberculosis in suspected beef from a metropolitan abattoir in Ghana with Ziehl-Neelsen microscopy. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2009; 12 (17): 1222-1225.
6. Akçay E. Sığır tüberkülozünün teşhisinde kullanılan gamma interferon testi ile ELISA'nın karşılaştırılmalı değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi. Doktora Tezi. 2000.
7. Akçay E. Sığır tüberkülozu. Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. 2009. <http://www.etlikvet.gov.tr/Vethalksagligi/tuberkuloz.htm>, Erişim Tarihi 08.10.2009
8. Aksu HSZ, Doğan ÜB, Akoğlu T, Aksaray N, Cürçay A. Mikobakteriel hücre duvarı antijenine karşı spesifik IgG antikorlarının gösterilmesi. Enfeksiyon Derg. 1988; 2: 169.
9. Allios AD, Picardeau M, Goh KS, Sola C, Vincent VR, Rastogi N. Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification to species level of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. Journal of Clinical Microbiology. 1996; 34 (11): 2756-2759.
10. Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, Pollock JM, Zerbini I. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. Veterinary Microbiology. 2002; 85: 379-389 (a).
11. Amadori M, Tagliabue S, Lauzi S, Finazzi G, Lombardi G, Telo P, Pacciarini L, Bonizzi L. Diagnosis of *M. bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the *avium/intracellulare* group. J. Vet. Med. B. 2002; 49: 89-96 (b).
12. Ambrosio SR, Márcia de Deus OE, Rodriguez CAR, Neto JSF1, Amaku M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. Brazilian Journal of Microbiology. 2008; 39: 241-244.
13. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune based diagnosis of tuberculosis. Lancet. 2000; 356: 1099-1104.
14. Angela DP, Giuseppina C, Tony FV, Bijo B, Fatmira S, Giuseppina T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in milk using polymerase chain reaction (PCR). Food Control. 2006; 17: 776-780.
15. Anonymous: Iowa State University Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Bovine tuberculosis. 2009. www.cfsph.iastate.edu/IICAB/, Erişim tarihi: 13.10.2009.

16. Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, Blazquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G, Dominquez L *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov. a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999; 49: 1263-1273.
17. Arda M. Boyalar ve boyama metotları. Temel Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi. 1997; 281-289.
18. Arias-Bouda LMP, Kuijper S, Van Deutekom H, Van Gijlswijk R, Pekel I, Kolk AHJ. Enzyme-linked immunosorbent assays using immune complexes for the diagnosis of tuberculosis. Journal of Immunological Methods . 2003; 283:115-124.
19. Artan MO. Tüberkülozun tanısında kullanılan Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test'in uygulanması ve konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılması. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi. 2005; 27 (1):5-10.
20. Auer LA. Assesment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. Australian Veterinary Journal. 1987; 64: 172-176.
21. Beytut E. Kars ili ve yöresinde sığırlarda tüberküloz insidensi ve lezyonların lokalizasyonu üzerine patolojik incelemeler. Kafkas Üniv. Vet Fak. Derg. 2001; 7 (1): 15-25.
22. Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MTP, Zanini MS, Salas CE. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular and Cellular Probes. 2004; 18: 167-170.
23. Bengisun JS, Gökırmak MÇ, Arıbal E, Saygun N, Özenci E. Tüberkülozun serolojik tanısında ELISA testinin tanı değeri. Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası. 1997; 50 (4): 193-195.
24. Bilgehan H. Mycobacteriaceae. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir. Barış Yayınları. 1990; 335-364.
25. Bilgehan H. Aşırı duyarlılık tepkimeleri. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 9. Baskı. İzmir, Barış Yayınları. 1999; 492-531.
26. Black GF, Dockrell HM, Crampin AC, Floyd S, Weir RE ve ark. Patterns and implications of naturally acquired immune responses to environmental and tuberculous mycobacterial antigens in northern Malawi. J Infect Dis. 2001; 184(3): 322-329.
27. Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. Eur. Respir. J. 1995; 8: 676.
28. Brosman SA. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. Urol. Clin. North Am. 1992; 19: 557-564.
29. Buddle BM, Parlane NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody K, Andersen P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 1999; 6: 1-5.
30. Buddle BM, Ryanb TJ, Pollockc JM, Andersend P, W de Lislea G. Use of ESAT-6 in the interferon γ test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. Veterinary Microbiology. 2001; 80: 37-46.

31. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM ve GW de Lisle. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine*. 2002; 20: 1126-1133.
32. Butler JP. The Mycobacteria. *Bergeys Manuel of Systematic Bacteriology*. Volume:2. Baltimore, USA, Williams&Wilkins. 1986; 1435-1457.
33. Cancela MMG and Marin JFG. Comparision of Ziehl Nelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *J. Comp. Path.* 1993; 109: 361-370.
34. Cardoso Leao S, Briones MRS, Sircili MP, Balian SC, Mores N, Neto JSF. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR-Restriction Enzyme Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37: 2592-2597.
35. Casillas CR, Elizondo GV, Diaz CA. Comparicion del ELISA con la tubercilinizacion en el diagnostico de la tuberculosis bovina. *Tecnica Pecuaria de Mexico*. 1995; 33: 148- 158.
36. Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet Microbiol*. 2006; 112: 151-161.
37. Cedeno I, Obaldia R, Sanjur O, Bayard V, Barria EO, Escobar C. Use of the polymerase chain reaction for diagnosing bovine tuberculosis in Panama. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2005; 24 (3): 1067-1076.
38. Chalmers JW, Jamieson AF, Rafferty P. An outbreak of bovine tuberculosis in two herds in South West Scotland, veterinary and human public health response. *Journal of Public Health Medicine*. 1996; 18(1): 54-58.
39. Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen D, Whelan A, Hughes C, Hall G, Lever MS, Marsh PD, Hewinson RG. A guinea pig model low dose *Mycobacterium bovis* aerogenic infection. *Veterinary Microbiology*. 2001; 80: 213-226. (a)
40. Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen D. A guinea pig model of low-dose *Mycobacterium bovis* aerogenic infection. *Vet Microbiol*. 2001; 80: 213-226. (b)
41. Chimara E, Ferrazoli L, Leo SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB* restriction fragment length polymorphism analiysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (7): 745-748.
42. Cockle PJ, Gordon VS, Lalvani A, Buddle BM, Hewinson RG ve ark. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect Immun*. 2002; 70: 6996-7003.
43. Colditz GA, Brewer TF, Berkley CS, Wilson ME ve ark. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *JAM*. 1994; 271 (9): 698-702.
44. Corner LAL, Costello E, Lesellier S, O'Meara D, Sleeman DP, Gormley E. Experimental tuberculosis in the European badger (*Meles meles*) after endobronchial inoculation of *Mycobacterium bovis*: Pathology and bacteriology. *Research in Veterinary Science*. 2007; 83: 53-62.
45. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson SRA, Huchzermeyer HFAK, Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis .due to *M. bovis* in developing countries. *Emerg.Infect Dis*. 1998; 4: 59-70.

46. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30 (1): 255-258.
47. Cousins DV, Corner LA, Tolson JW, Jones SL, Wood PR. Eradication of Bovine Tuberculosis from Australia: Key Management and Technical Aspects. CSL Limited, Parkville, Australia. 1998; 45.
48. Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech*. 2001; 20: 71-85.
49. Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature*. 1999; 402: 79-83.
50. Cvetnic Z, Sipicic S, Katalinic-Jankovic V, Marjanovic S, Obrovac M, Benici M, Mitak M, Pavlik I. *Mycobacterium caprae* infection in cattle and pigs on one family farm in Croatia: a case report. *Veterinaria Medicina*. 2006; 51: 523-531.
51. Çataloluk O, Karşigil T, Bayazıt N. Evaluation of polymerase chain reaction amplification method for *Mycobacterium tuberculosis* complex on samples from different sources. *Scand J Infect Dis*. 2003; 35: 329-331.
52. Daniel TM, Debanne SM, Kuyp FVD. Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis. *Chest*. 1985;88: 388-392.
53. Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1987; 135: 1137.
54. Daniel TM. *Captin of Death: The Story of Tuberculosis*. New York, University of Rochester Press. 1997.
55. Del Portillo D, Murillo LA, Patorroyo E. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29 (10): 2163-2168.
56. Diker S. Aşırı duyarlılık reaksiyonları. *İmmunoloji*. 1. Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi. 1998; 237-253.
57. Dillon CD, Alderson MR, Day CH, Bement T, Campos-Neto A, Skeiky YAW ve ark. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38 (9): 3285-3290.
58. Duarte TA, Barbosa Jr AA, Arruda S. Morphometric analysis of granulomas induced by *Mycobacterium bovis* suggests an influence of IFN-Gamma on the generation and modulation upon granulomatous inflammatory response in the different tissues. *Int. J. Morphol*. 2005; 23(4): 317-322.
59. Duffield BJ, Norton JH, Hoffman D. An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in Northern Queensland. *Aust. Vet. J*. 1989; 66: 307-308.
60. Dunn JR, Kaneene JB, Grooms DL, Bolin SR, Bolin CA, Bruning-Fann CS.. Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon- γ assay for tuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2005; 223(3): 429-435.

61. Edwards ML, Goodrich JM, Muller D, Pollack A, Ziegler JE ve ark. Infection with *Mycobacterium avium-intracellulare* and the protective effects of Bacille Calmette-Guerin. J Infect Dis. 1982; 145(5): 733-741.
62. Eroğlu C. Tüberküloz tanısında PCR. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun. 2003; 311-316.
63. Erganiş O. Mycobacterium cinsi. Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, 2.baskı. Konya, Sağlık Eğitim Enstitüsü Yayınları. 1994; 299-304.
64. Erganiş O, İstanbulluoğlu E. Aşırı duyarlılık reaksiyonları. İmmunoloji. 2. Baskı. Konya, S.Ü. Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. 1999; 95-106.
65. Escamilla L, Mancilla R, Glander W, Lopez-Marin LM. *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 1996; 154: 1964.
66. Feng CF, Demangel C, Kamath AT, Macdonald M, Britton WJ. Dendritic cells infected with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin activate CD8+ T cells with specificity for a novel mycobacterial epitope. International Immunology. 2001; 13 (4): 451-458.
67. Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet. 1995; 346: 1339-1345.
68. Fitzgerald SD, Kaneene JB, Butler KL, Clarke KR, Fierke JS, Schmitt SM, Bruning-Fann CS, Mitchell RR, Berry DE, Payeur JB. Comparison of postmortem techniques for the detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J Vet Diagn Invest. 2000; 12: 322-327.
69. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Ann Rev Immunol. 2001; 19: 93-129.
70. Francis J, Seiler RJ, Wilkie WI, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculin. Veterinary Record. 1978; 103: 420-435.
71. Fritsche A, Engel R, Buhl D, Zellweger JP. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. Int J Tuberc Lung Dis. 2004; 8: 903-904.
72. Fulton SA, Martin TD, Redline RW, Boom WH. Pulmonary immune responses during primary *Mycobacterium bovis*-Calmette-Guerin bacillus infection in C57Bl/6 mice. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000; 22: 333-343.
73. Gebreyohannes TK. Low dose BCG vaccination in mice: Immune responses and implications for tuberculosis control. Doktora Tezi. Department of Microbiology and Immunology University of Saskatchewan, Saskatoon. 2007.
74. Gemicioğlu B. Erişkinde tüberküloz kliniği ve tanısı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri; Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu. İstanbul. 1999; 21-37.
75. Goel MM and Budhwar P. Immunohistochemical localization of *Mycobacterium tuberculosis* complex antigen with antibody to 38 kDa antigen versus Ziehl Neelsen stain in tissue granulomas of extrapulmonary tuberculosis. Indian J Tuberc. 2007; 54: 24-29.
76. Gonzalez LOR, Gutierrez CBMA, Alvarez DN, V.A. de la Puente R, L. Domoanguez RAL, Rodriguez EFF. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. Veterinary Microbiology. 1999; 70: 55-66.

77. Gormley E, Doyle MB, McGill K, Costello E, Good M, Collins JD. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004; 10: 413-420.
78. Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary Microbiology*. 2006; 112: 171-179.
79. Grange JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb)*. 2001; 81: 71-7.
80. Griffina JFT, Rodgersa CR, Liggetta S, Mackintoshb CG. Tuberculosis in ruminants: Characteristics of intra-tonsilar *Mycobacterium bovis* infection models in cattle and deer. *Tuberculosis*. 2006; 86: 404-418
81. Gupta UD and Katoch VM. Animal models of tuberculosis for vaccine development. *Indian J Med Res*. 2009; 129: 11-18.
82. Gupta VK and Ram GC. Fractionation and immunoreactivity of membrane associated proteins of *M. bovis*. *Ind. J. Anim. Sci*. 2000; 70(10): 1015-1020.
83. Gutierrez M, Tellechea J, Marin JFG. Evaluation of cellular and diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Veterinary Microbiology*. 1998; 62: 281-290.
84. Haile M. Studies on new tuberculosis vaccine candidates in animal models. Swedish Institute for Infectious Disease Control, Thesis of Doctorate. Stockholm, 2005.
85. Hanekom WA. The immune response to BCG vaccination of newborns. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2005; 1062: 69-78.
86. Hanna J, Neill SD, Brion JJ. ELISA test for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol*. 1992; 31: 243-249.
87. Hamasur B, Bruchfeld J, Haile M, Pawlowski A, Bjorvatn B, Kallenius G. Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *Journal of Microbiological Methods*. 2001; 45: 41-52.
88. Harboe M, Wiker HG, Duncan JR, Garcia MM, Dukes TW, Brooks BW, Turcotte C, Nagai S. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28 (5): 913-921.
89. Hensyl WR. The Mycobacteria. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Baltimore, USA: Williams&Wilkins. 1994; 597-604.
90. Higuchi K, Sekiya Y, Harada N. Characterization of *M. tuberculosis*-derived IL-12-inducing material by alveolar macrophages. *Vaccine*. 2004; 22: 724-734.
91. Hirschel B, Chang HR, Mach N, Piguet PF, Cox J, Piguet JD, Silva MT, Larsson L, Klatser PR, Thole JER, Rigouts L, Portaels F. Fatal infection with a novel, unidentified mycobacterium in a man with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med*. 1990; 323: 109-113.
92. Hope JC, Kwong LS, Sopp P, Collins RA, Howard CJ. Dendritic Cells Induce CD4. and CD8. T-Cell responses to *Mycobacterium bovis* and *M. avium* antigens in Bacille Calmette Guerin vaccinated and nonvaccinated cattle. *Scand. J. Immunol*. 2000; 52: 285-291
93. Hope JC, Ramos BV. Bovine. TB and the development of new vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology& Infectious Diseases*. 2008; 31: 77-100.

94. Hueloner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993; 17: 968-75.
95. Hussey GD, Watkins ML, Goddard EA, Gottschalk S, Hughes EJ, Iloni K, Kibel MA, Ress SR. Neonatal mycobacterial specific cytotoxic T-lymphocyte and cytokine profiles in response to distinct BCG vaccination strategies. Immunology. 2002; 105: 314-324.
96. Iralu JV, Sritharan VK, Pieciak WS, Wirth DF, Maguire JH, Barker RH. ve ark. Diagnosis of *Mycobacterium avium* bacteremia by Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31 (7): 1811-1814.
97. Iseman M. Positive PPD in 52 years old man patient. JAMA. 2001; 286: 2015-2022.
98. İşıtez M, Çetinkaya Z, Altındış M, Çiftçi İH, Fidan F. Afyon bölgesinde Lowenstein-Jensen, BACTEC ve TK medium yöntemleri ile izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının dört major ilaca karşı dirençlerinin belirlenmesi. Kocatepe Tıp Dergisi. 2004; 5: 45-48.
99. Jain A, Verma RK, Tiwari V, Goel MM. Development of new antigen detection dot-ELISA for diagnosis of tubercular lymphadenitis in fine needle aspirates. Journal of Microbiological Methods. 2003; 53: 107-112.
100. Julian E, Cama M, Martinez P, Luquin M. An ELISA for five glycolipids from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: Tween 20 interference in the assay. Journal of Immunological Methods. 2001; 251: 21-30.
101. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997; 35: 907-914.
102. Kasi H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. Journal of Clinical Microbiology. 2000; 38 (1): 301-308.
103. Katial RK, Hershey J, Purohit-Seth T, Belisle JT, Brennan PJ, Spencer JS ve ark. Cell-mediated immune response to tuberculosis antigens: Comparison of skin testing and measurement of in vitro gamma interferon production in whole-blood culture. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2001; 8 (2): 339-345.
104. Keskin O. Sığır tüberkülozis'inin teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve alerjik yöntemle karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi. Doktora Tezi. 1996.
105. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. J Immunol. 2000; 164: 2016-2020.
106. Kiran U, Kumar SR, Sharma A. Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. Eur J Respir Dis. 1985; 66: 87-195.
107. Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of Delayed-Type Hypersensitivity. Microscopy Research and Technique. 2001; 53: 241-245.
108. Koneman EW, Winn WC ve ark. Mycobacteria. Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2006; 1066-1124.
109. Kubica T, Rusch-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 3070-3077.

110. Kulshrestha A, Gupta A, Verma N, Sharma SK, Tyagi AK, Chaudhary VK. Expression and purification of recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* for application in serodiagnosis. *Protein Expression and Purification*. 2005; 44: 75-85.
111. Kunze ZM, Wall S, Appelberg R, Silva MT, Portaels F, McFadden JJ. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 1991; 5:2265-2272.
112. Kunze ZM, Portaels F, McFadden JJ. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of Insertion sequence IS901. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30: 2366-2372.
113. Lantos A, Nieman S, Mezosi L, Sos E, Erdelyi K, David S, Parsons LM, Kubica T, Rüscherdes S, Somoskövi A. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian Tiger. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9: 1462-1464.
114. Levy H, VVadee AA, Feldman C, Rabson AR. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* in bronchial washings and serum. *Chest*. 1988; 93(4):762-766.
115. Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey JM, Smith S. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis*. 2003; 187: 117-23.
116. Leite OH. Diagnosis of pulmonary tuberculosis using dot-ELISA and ELISA immunoperoxidase techniques. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1990; 23 (4): 241-242.
117. Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 33-36.
118. Lilenbaum W, Riberio ER, Souza GN, Moreira EC, Fonseca LS, Ferreira MAS, Schettini J. Evaluation of an ELISA-PPD for diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Research in Veterinary Science*. 1999; 66: 191-195.
119. Livingstone PG. Avances en materia de diagnostico, control erradicacion de la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) en animales domesticos salvajes. In 68th General Session of the World Organisation for Animal Health (OIE) International Committee. OIE, Paris. 2001; 123-141.
120. Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N, Dumitrescu N, Verron M ve ark. BCG complications. Estimates of the risks among vaccinated subjects and statistical analysis of their main characteristics. *Adv Tuberc Res*. 1984; 21: 93-107.
121. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193 (1): 265-75.
122. Lowry PW, Ludwig TS, Adams JA, Fitzpatrick ML, Grant SM, Andrle GA, Offerdahl MR, Cho SN, Jacobs DR. Cellular immune responses to four doses of percutaneous bacille Calmette-Guerin in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 1998; 178: 138-146.
123. Ludwiczak P, Gilleron M, Bordat Y ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant, lipoarabinomannan molecular structure. *Microbiology*. 2002; 148: 3029-3037.
124. Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infection and Immunity*. 1998; 66(8): 3936-3940.

125. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC ve Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J. Bacteriol. 1996; 178: 1274-1282.
126. Manabe Y, Bishai W. Latent Mycobacterium tuberculosis-persistence, patience and winning by waiting. Nature Med. 2000; 6: 1327-1329.
127. Manzano JR, Blanquer R, Calpe JL, Caminero JA, Cayla J, Dominguez JA, Garcia JM, Vidalh R. Diagnosis and treatment of tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2008; 44(10): 551-66.
128. Marchant AT, Goetghebuer MO, Ota I, Wolfe SJ, Ceesay D, De Groote T, Corrah S, Bennett J, Wheeler K, Huygen P, Aaby K, McAdam P, Newport MJ. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. J. Immunol. 1999; 163: 2249-2255.
129. Mendenhall MK, Ford SL, Emerson CL, Wells RA, Gines LG, Eriks IS. Detection and differentiation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium genavense* by polymerase chain reaction enzyme digestion analysis, J Vet Invest. 2000; 12: 57-60.
130. Meyer JP, Persad R ve Gillatt DA. Use of Bacille Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. Postgrad Med J. 2002; 78: 449-454.
131. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. Vet J. 2000; 160: 92-106.
132. Mijs W, De Haasp, Rossau R, Van Der Laan T, Rigouts L, Portaels F & Van Soolingen D. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* to bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002; 52: 1505-1518.
133. Millera JM, Jennyb AL, Payeurb JB. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. Veterinary Microbiology. 2002; 87: 15-23.
134. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test. Veterinary Microbiology. 1994; 40: 111-124.
135. Monaghan M, Quinn PJ, Kelly AP, McGill K, McMurray C, O’Crowley K, Bassett HF, Costello E, Quigley FC, Rothel JS, Wood PR, Collins JD. A pilot trial to the evaluate the γ -interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infected cattle under Irish conditions. Irish Vet. J. 1997; 50: 229-232.
136. Mukherje A, Kalra N, Beeana KR. Immunohistochemical detection of mycobacterial antigen in tuberculous lymphadenitis. Ind. J. Tub. 2002; 49:213.
137. Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F ve ark. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Scand. J. Immunol. 1998; 48: 535–543.
138. Mustafa AS, Skeiky YA, Al-Attiyah R, Alderson MR, Hewinson RG, Vordermeier HM. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle. Infection and Immunity. 2006; 74: 4566-4572.
139. Neill SD, Bryson DB, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. Tuberculosis. 2001; 81: 79-86.
140. Niemann S, Harmsen D, Rüsche-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2000; 38: 3231-3234.

141. Nolte FS, Mettchock B, McGowan JE, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, Mitchell PS, Plikaytis B, Shinnick T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31 (7): 1777-1782.
142. O'Brien DJ, Schmitta SM, Fierkea JS, Hoglea SA, Wintersteinb SR, Cooleya TM, Moritzc WE, Diegeld KL, Fitzgerald SD, Berrye DE, Kaneenef JB. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995–2000. *Preventive Veterinary Medicine*. 2002; 54: 47-63.
143. Oğuz D. 5-24 Ay Arası Sağlıklı Çocuklarda BCG Aşısının Tüberkülin Deri Testine Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. 2004.
144. OIE. Avian tuberculosis. *Terrestrial Manual*. 2008. Chapter 2. 3. 6. p: 497-506. (a)
145. OIE. Bovine tuberculosis. *Terrestrial Manual*. 2008. Chapter 2.4.7, p: 683-694. (b)
146. OIE. Prescribed and alternative diagnostic test for OIE listed disease. *Terrestrial Animal Health Code*. 2008. Chapter 1,3, p: 1-5. (c)
147. OIE. Animal Health Information. World Animal Health Information Database. 2009
<http://www.oie.int/wahis/public.php>
148. Okaiyeto SO, Allam L, Akam E, Sabo G. Investigation of the prevalence of bovine tuberculosis in a dairy farm in Kaduna State Nigeria. *Research Journal of Dairy Sciences*. 2008; 2 (1): 27-29.
149. Olsen I, Boysen P, Kulberg S, Hope JC, Jungersen C, Storset AK. Bovine NK cells can produce gamma-interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infection and Immunity*. 2005; 73(9): 5628-5635.
150. Ortatlı M, Çiftçi MK, Tuzcu M. Sığırlarda tüberküloz ve diğer granülatöz pnömoniler üzerine patolojik incelemeler. *Vet. Bil. Derg.* 1998; 14 (2): 139-150.
151. Özbal Y. Tüberküloz immunolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi*. 2006; 28 (1): 25-34.
152. Özbey G, Kalender H, Muz A. Sığır Tüberkülozu'nun Epidemiyolojisi ve Teşhisi. *Derleme. F.Ü. Sağ. Bil. Derg.* 2008; 22 (5): 307-314.
153. Özereol Hİ. Tüberkülozun serolojik tanısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun. 2003.
154. Öztürk R. Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun. 2003.
155. Öztürk D, Pehlivanoglu F, Kale M, Tok AA, Güldalı Y, Türütoğlu H. -İnterferon testi ile sığır tüberkülozunun in vitro teşhisi. VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi: p 50, 2008, Van.
156. Palomino JC and Portaels F. Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(2): 402-408.
157. Palmer CE ve Long MW. Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1966; 94(4): 553-68.
158. Palmer MV, Whipple DL, Rhyen JC, Bolin CA, Saari DA. Granuloma development in cattle after intratracheal inoculation with *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res*. 1999; 60: 310-315. (a)

159. Palmer MV, Whipple DL, Olsen SC. Development of a model of natural infection with *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer. *J Wild Dis.* 1999; 35: 450-457. (b)
160. Palmer MV, Waters WR. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology.* 2006; 112: 181-190.
161. Pavlik I, Svastova P, Bartl J, Dvorska L, Rychlik I. Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2000; 7: 212-217.
162. Petroff SA. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J Exp Med.* 1915; 21: 38-42.
163. Persing DH. In vitro nucleic acid amplification techniques. *American Society for Microbiology.* 1993; 51-87.
164. Picardeau M, Vincent VR Typing of *Mycobacterium avium* isolates by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 1996; 34 (2): 389-392.
165. Placket P, Ripper J, Corner LA, Small K, Witte K, Melville L, Hides S, Wood PR. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Australian Veterinary Journal.* 1989; 66: 15-19.
166. Pollock JM and Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *M.bovis* in cattle. *Infection and Immunity.* 1997; 65: 2587-2592.
167. Pollock JM, MacNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, Neill SD. Immune response in bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 2001; 81: 103-107.
168. Pollock JM, McNair J, Bassett H, Cassidy JP, Costello E, Aggerbeck H, Rosenkrands I, Andersen P. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003; 41: 1856-1860.
169. Pollock JM, Welsh MD, McNair J. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2005; 108: 37-43.
170. Pollock JM, Rodgers JD, Welsh MD, McNair J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Vet Microbiol.* 2006; 112: 141-150.
171. Proano-Perz F, Rigouts L, Brandt J, Dorny P, Ron J, Maria-Agusta C, Rodriguez R, Fissette K, Aerde AV, Portaels F, Benitez-Ortiz W. Preliminary observations on *Mycobacterium* ssp. in dairy cattle in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(2): 318-323.
172. Prodinger W, Eigentler MA, Allerberger F, Schonbauer M, Glawischnig W. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2270-2272.
173. Puyang X, Lee K, Pawlichuk C, Kunitomo DY. IS1626, a new IS900-related *Mycobacterium avium* insertion sequence. *Microbiology.* 1999; 145: 3163-3168.
174. Raqib R, Rahman J, Kamaluddin AKM, Kamal SMM, Banu FA, Ahmed S Rapid Diagnosis of active tuberculosis by detecting antibodies from lymphocyte secretions. *The Journal of Infectious Diseases.* 2003; 188: 364-70.
175. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med. Res.* 2004; 120: 213-232.

176. Rebello MJ, Garrido RSJ, Folguez D, Palenque E, Pedrochea CD, Lumblerasa C, Aguadoa JM. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006; 56 (2): 141-146.
177. Reggiardo Z, Vazquez E, Schnaaper L. ELISA test for antibodies against mycobacterial glycolipids. *J. Immunol Methods*. 1980; 34: 55.
178. Reichman LB, Hershfield ES. Pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis*. Second Edition. Basel, Marcel Dekker. 2000; 241-260.
179. Resmi Gazete. Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği. 2009. Sayı: 27188.
180. Ridell M, Wallström G, Minnikin DE, Balton RC, Magnusson M. A comparative serological study of antigenic glycolipids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*. 1992; 73: 101.
181. Ritacco V, Kantor IN, Barrera L, Nader A, Barnadelli A, Torrea G, Errico F, Flies E, Kantor IN. Assessment of the sensitivity and specificity of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of Mycobacterial antibodies in Bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine*. 1987; 34: 119-125.
182. Ritacco V, Lopez B, Barrera L, Nader A, Fliess E, Kantor IN. Further evaluation of an indirect enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Vet Medicine*. 1990; 37: 19-27.
183. Ritacco V, Lopez B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*. 1991; 50: 365-367.
184. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Böttger EC. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *International journal of systematic bacteriology*. 1990; 40 (4): 323-30.
185. Romero RE, Garzon DL, Mejia GA, Monroy W, Patarroyo ME, Murillo LA. Identification of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Samples by PCR Species-Specific Primers. *Can J Vet Res*. 1999; 63: 101-106.
186. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*. 1990; 67: 134-137.
187. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal*. 1992; 69: 1-4.
188. Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen. KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*. 2006; 81 (2): 190-210.
189. Runyon EH. Mycobacteria, an overview. *Rev. Infect. Dis*. 3: 819-821. In: Pritchard, D.G. (1988): A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J. Comp. Pathol*. 1981; 99: 357-399.
190. Ryan TJ, Buddle BM, de Lisle GW. An evaluation of the gamma-interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Research in Veterinary Science*. 2000; 69: 57-61.

191. Savage C, Vincent P, Leclerc H. Serodiagnosis of tuberculosis: Evaluation of a sulpholipid antigen. *Zentralbl Bakt.* 1993; 278: 49.
192. Sevakumar N, Rahman F, Rjasekaran S, Narayannan PR, Frieden TR. Inefficiency of %0,3 carbol fuchsin in Ziehl-Neelsen staining for detecting acid-fast bacilli. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002; 40: 3041-3043.
193. Sezen İY, Erer H, Erganiş O. Bir güvercinde tüberküloz olgusu. *Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi.* 1986; 2(1): 163-166.
194. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* 1996; 2: 662-667.
195. Shitaye JE, Getahun B, Alemayehu T, Skoric M, Treml F, Fictum P, Vrbas V, Pavlik I. A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS6110 PCR examination of tissues with tuberculous lesions in cattle in Ethiopia. *Veterinari Medicina.* 2006; 51 (11): 512-522.
196. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003; 16 (3): 463-496. (a)
197. Smith CV, Huang CC, Miczak A ve ark. Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 1735-1743 (b).
198. Soini H and Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry.* 2001; 47 (5): 809-814.
199. Solmaz H, İlhan Z, Aksakal A, Gülhan T, Ekin İH. Detection of bovine tuberculosis by tuberculin test and polymerase chain reaction in Van, Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2009; 33(3): 229-233.
200. Speer CA, Scott MC, Babbabine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Eda S. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2006; 13 (5): 535-540.
201. Srivastava KL, Bansal M, Gupta S, Srivastava R, Kapoor RK, Wakhlu I, Srivastava BS. Diagnosis of tubercular meningitis by detection of antigen and antibodies in CSF and sera. 1998; 35: 841-850.
202. Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology.* 1997; 35: 566-569.
203. Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology.* 2007; 153: 1243-1249.
204. Telenti A, Marchesi F, Balz M ve ark. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 175-178.
205. Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. *Mycobacterium bovis Infection In Animals and Humans.* Second Edition. Iowa, Blackwell. 2006; 4: 18-33.
206. Torgal-Garcia J, David HL, Papa F. Preliminary evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* phenol glycolipid antigen in the serological diagnosis of tuberculosis. *Ann Inst Pasteur/ Microbiol.* 1988; 139: 289.

207. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, De Haas PEW, Herman PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, Van Embden JDA. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997; 47: 1236-1245.
208. Van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2000; 7(2): 155-160.
209. Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36 (4): 1050-1055.
210. Vines A, Reeves S, Hunter S, Swaminathan B. Restriction fragment length polymorphism in four virulence associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Res Microbiol*. 1992; 143: 281-94.
211. Vordermeier HM. T-cell recognition of mycobacterial antigens. *Eur Respir J*. 1995; 20: 657-667.
212. Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001; 8: 571- 578.
213. Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson G. Correlation of ESAT-6 specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*. 2002; 70: 3026-3032.
214. Vordermeier M, Goodchild A, Clifton-Hadley R, De la Rua R. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Veterinary Record*. 2004; 155: 37-38.
215. Vordermeier MR, Hewinson G. Development of cattle TB vaccines in the UK. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006; 112: 38-48.
216. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol*. 1995; 43: 227-240.
217. Waters WR, Nonnecke BJ, Palmer MV, Robbe-Austermann S, Bannantine JP, Stabel JR ve ark. Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium subsp. avium* and *M. avium subsp. paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2004; 11: 729-735.
218. Whelan AO, Hope JC, Howard CJ, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM. Modulation of the bovine delayed-type hypersensitivity responses to defined Mycobacterial antigens by a synthetic bacterial lipopeptide. *Infection and Immunity*. 2003; 71: 6420-6425.
219. Whelan AO, Coad M, Peck ZAA, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM. Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Record*. 2004; 155: 204-206.
220. Whipple DL, Palmer MV, Slaughter RE, Jones SL. Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation*. 2001; 13: 117-122.
221. WHO. Global tuberculosis control, surveillance, planning, financing: WHO report 2008. WHO/HTM/TB/2008. 393.
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html, Erişim Tarihi: 1 Ocak 2009

222. WHO. Global tuberculosis control, epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009. WHO/HTM/TB/2009.411.
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html, Erişim tarih: 4 Aralık 2009
223. Willem H, Gelderbloem SJ, Hawkridge A, Hussey G, Sheperd R, Workman L, Soler J, Ress SR, Kaplan G. Dose-dependent immune response to *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in neonates virginia davids. Clinical and Vaccine Immunology. 2007; 14: 198-200.
224. Wilsher ML, Menzies RE ve Croxson MC. *Mycobacterium tuberculosis* DNA in tissues affected by sarcoidosis. Thorax. 1998; 53: 871-874.
225. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweedle NF. Field comparison of the interferon-gamma assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Australian Veterinary Journal 1991; 68: 286-290.
226. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, De Witte K, Tolson J, Ryan TJ, de Lisle GW, Cox JC, Jones SL. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis Veterinary Microbiology. 1992; 31: 71-79.
227. Wood PR, Rothel JS. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. Veterinary Microbiology. 1994; 40: 125-135.
228. Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis. 2001; 81(1/2): 147-155.
229. Yardımcı H. Mycobacterium enfeksiyonları. In: Aydın N ve Paracıkoğlu J, Edit. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). 1. Baskı. Ankara. İlke-Emek Matbacılık ve Yayıncılık. 2006; 87-107
230. Yardımcı H, Ünal CB, Ataseven L, Sareyyüpoğlu B. Sığır tüberkülozunun PCR ile tanısı ve *Mycobacterium bovis*'in spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2007; 54: 183-189.
231. Yearsley D, Egan J, Costello E, O'Reilly P, Hewinson RG. An evaluation of an anamnestic ELISA for the detection of tuberculous cattle. Irish Veterinary Journal. 1998; 51: 303-306.
232. Zanella G, Durand B, Hars J, Moutou F, Garin-Bastuji B, Duvauchelle ,Ferme M, Karoui C, Boschirolu ML. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. Journal of Wildlife Diseases. 2008; 44: 99-108.
233. Zimmerman MR. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. Bull N Y Acad Med. 1979; 55(6): 604-608.

9. EKLER

Resim 9. 1. PPD deri testi için derinin traş edilmesi.



Resim 9. 2. Deri kalınlığının ölçülmesinde kullanılan kumpas.



Resim 9. 3. A. B. Deri kalınlığının kumpas ile ölçölmesi.



A



B

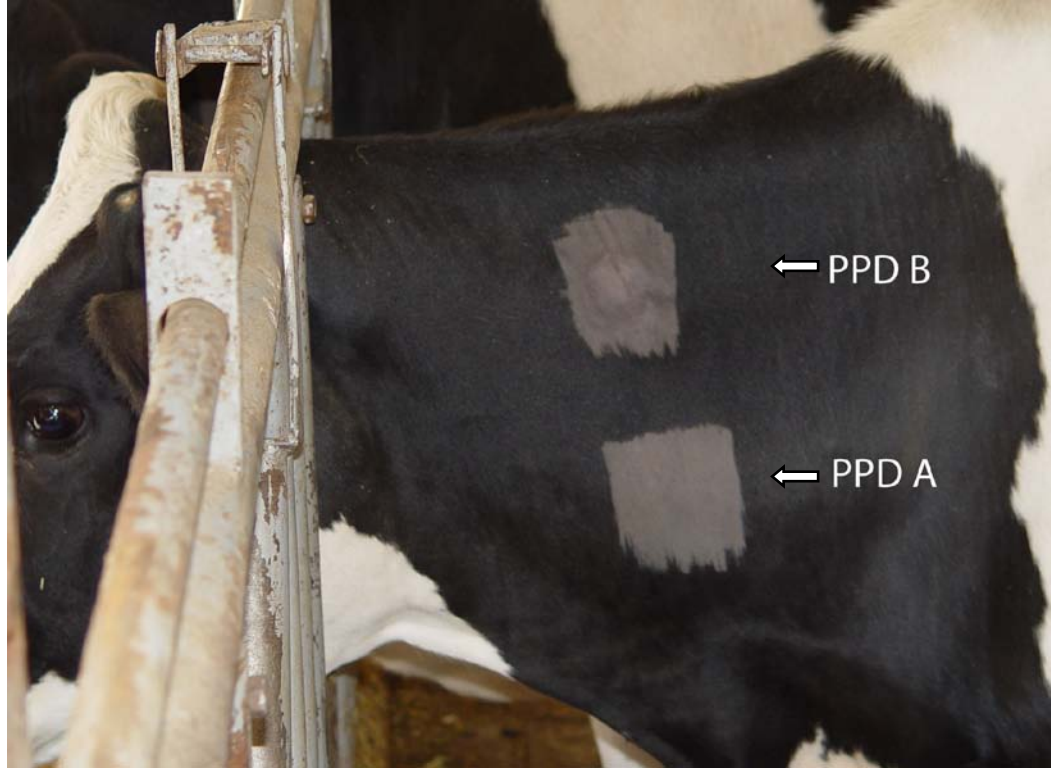
Resim 9. 4. PPD'nin deri içi enjeksiyonu.



Resim 9. 5. PPD enjeksiyonundan sonra deride şekillenen şişlik.



Resim 9. 6. PPD B pozitif reaksiyon.



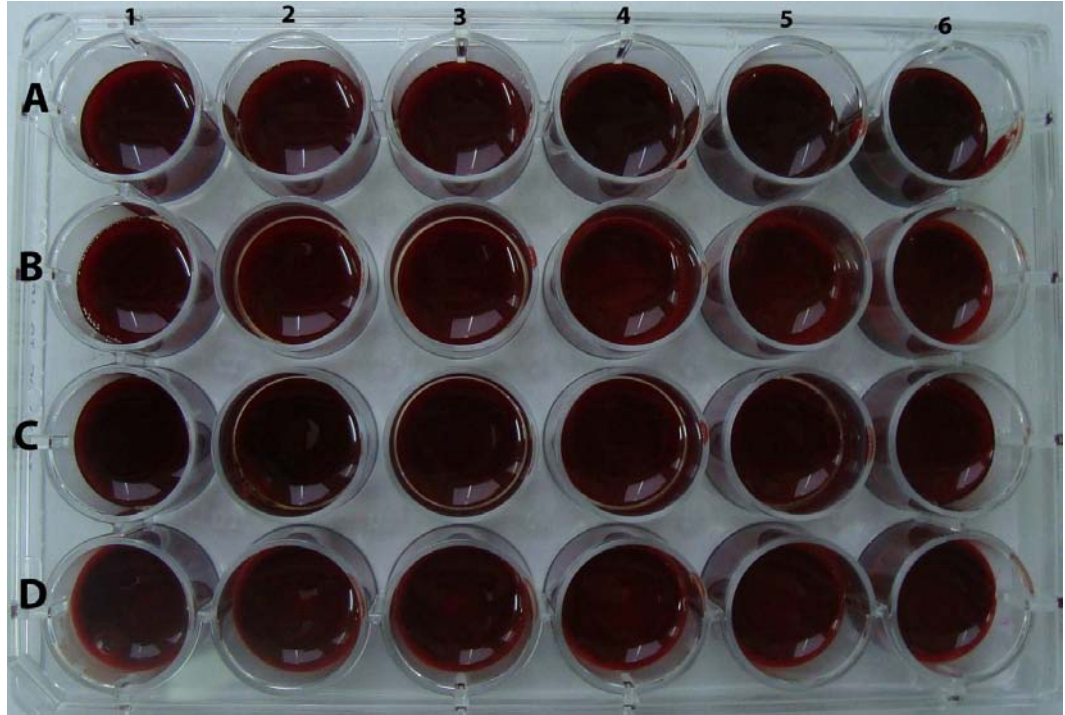
Resim 9. 7. PPD B ve PPD A pozitif reaksiyon.



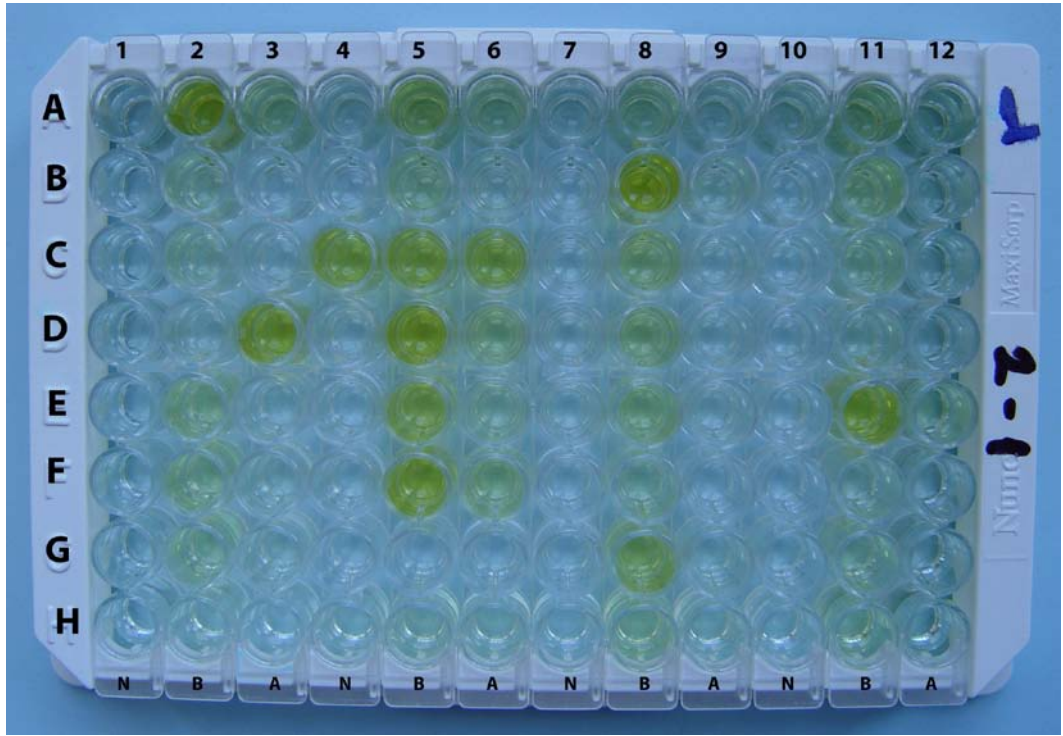
Resim 9.8. IFN- γ test kiti (BOVIGAM).



Resim 9. 9. IFN- γ testi için 24 gözlü hücre kültür pleytinde kan kültürü.

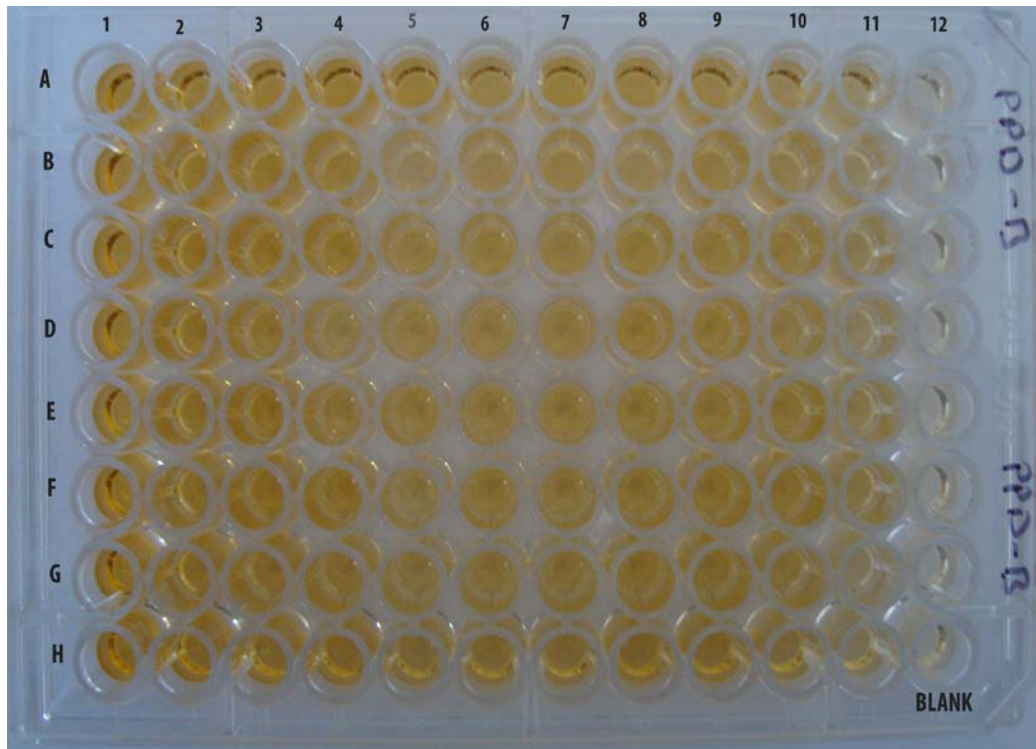


Resim 9. 10. IFN- γ testi sandwich ELISA.

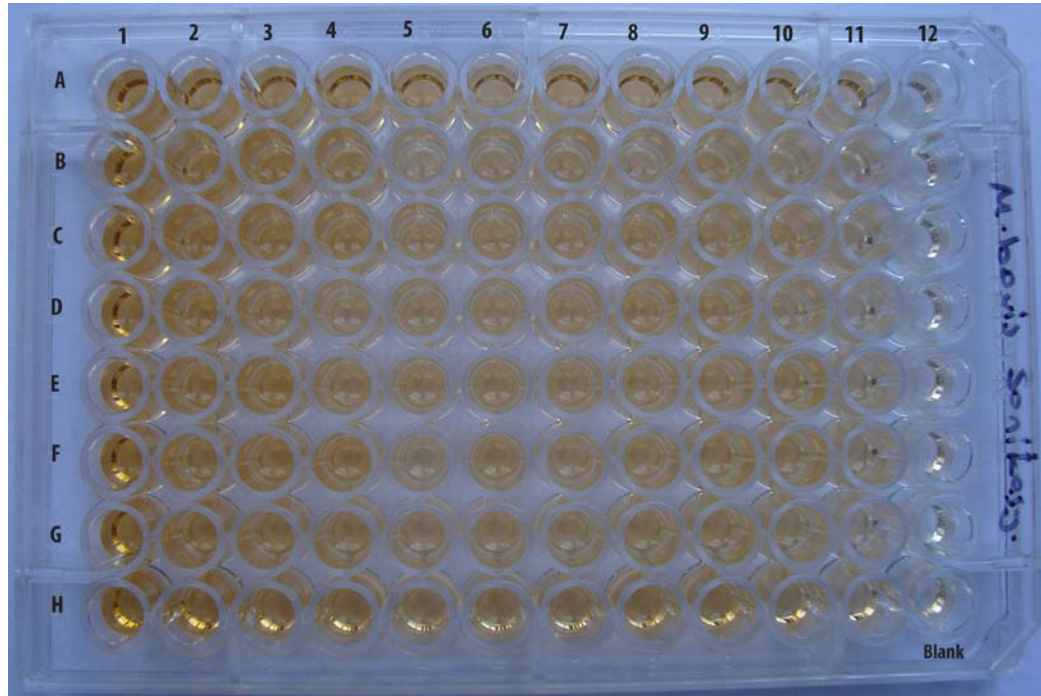


N: Negatif kontrol (Nil antijen, PBS), **B:** PPD B, **A:** PPD A

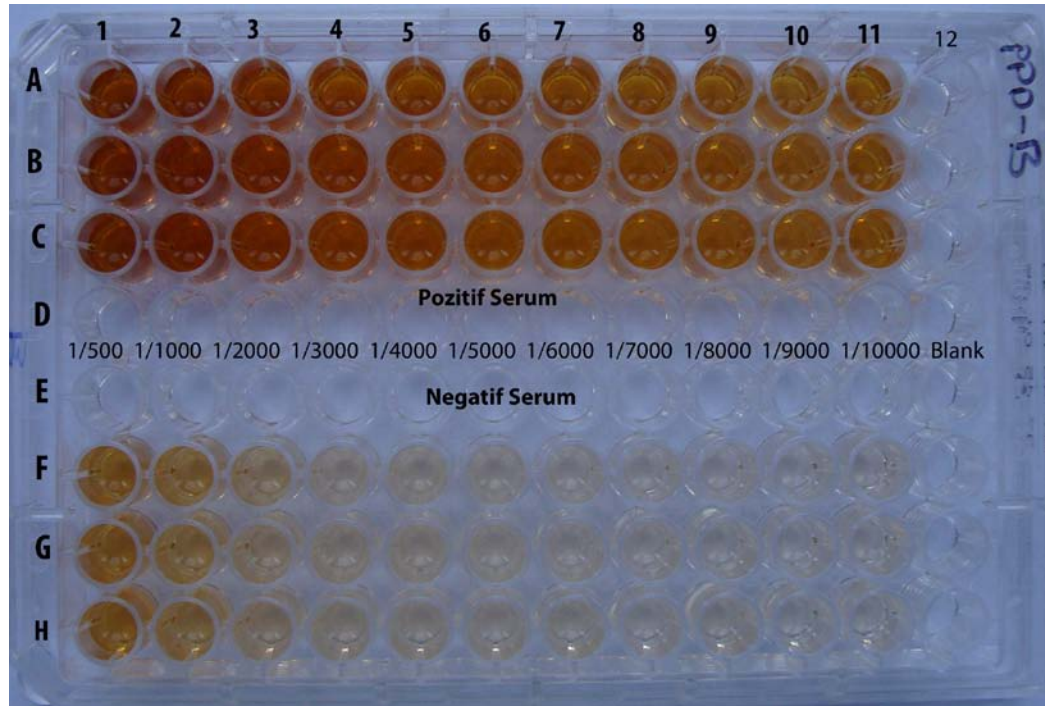
Resim 9. 11. PPD B ELISA antijen titrasyonu.



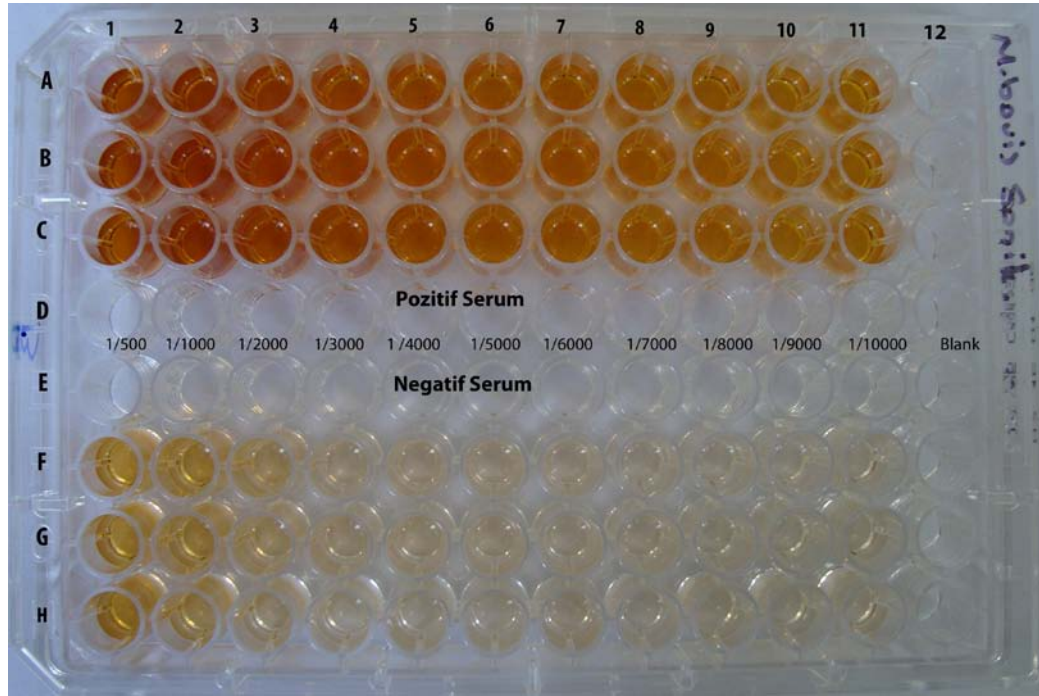
Resim 9. 12. *M. bovis* sonikasyon ELISA antijen titrasyonu.



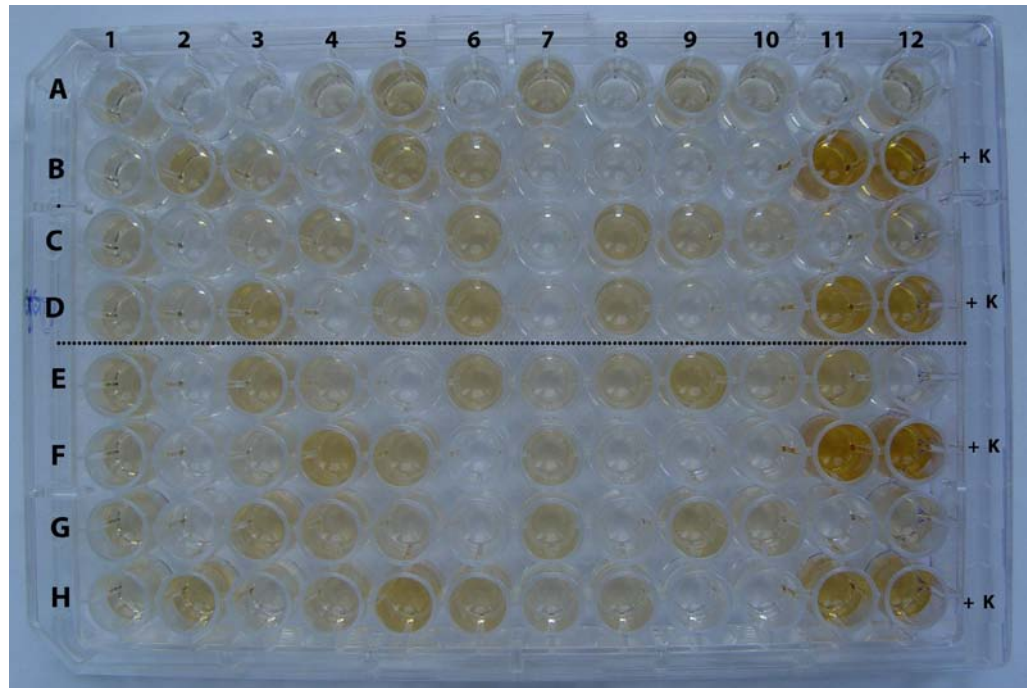
Resim 9. 13. PPD B ELISA konjugat titrasyonu.



Resim 9. 14. *M. bovis* sonikasyon ELISA konjugat titrasyonu.

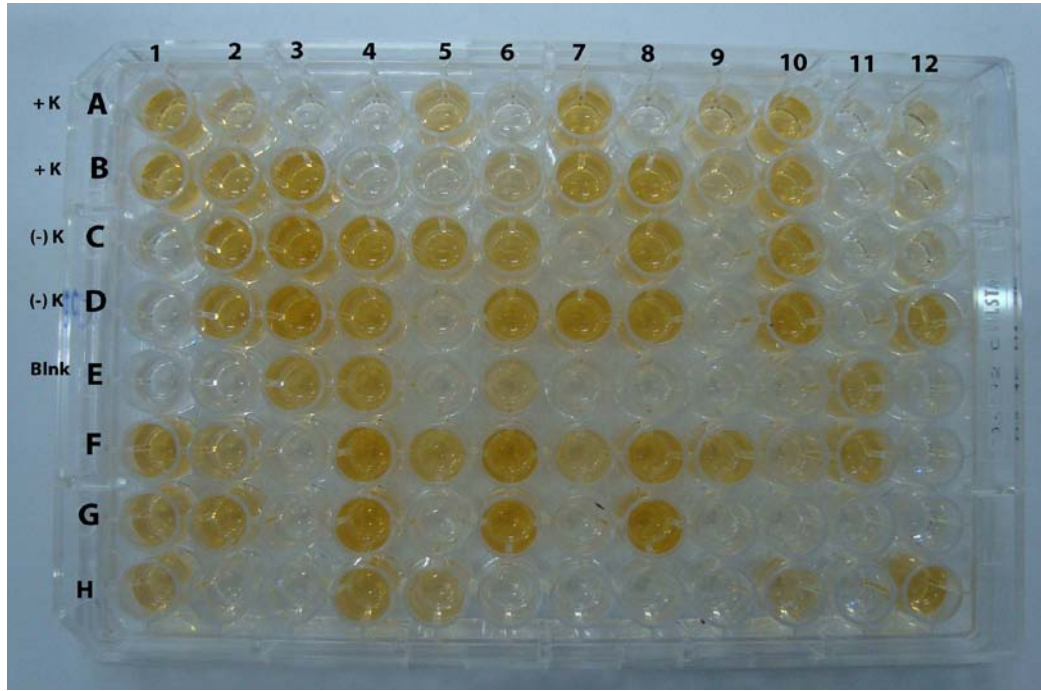


Resim 9. 15. PPD B ve *M. bovis* sonikasyon ELISA negatif eşik değeri.



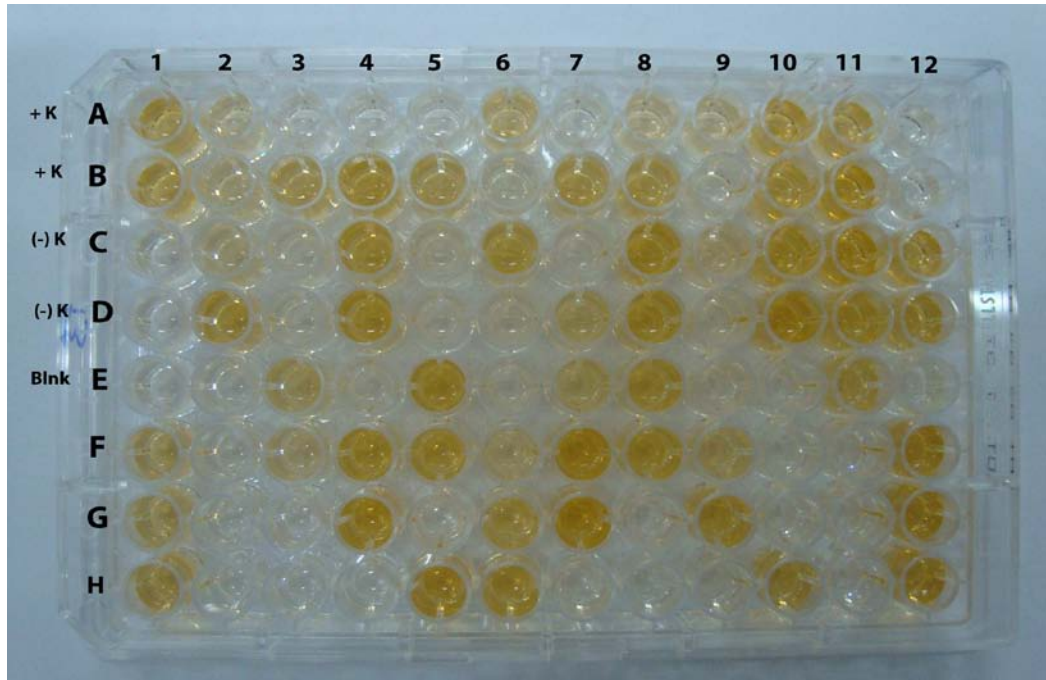
A-B-C-D; PPD-B, **E-F-G-H:** *M. bovis* sonikasyon ürünü ile kaplı çukurlar, **B-D-F-H;** Pozitif kontrol (+K), **9-10:** Blank

Resim 9. 16. PPD ELISA testinin uygulanışı.



(+) **K**; Pozitif kontrol, (-) **K**; Negatif kontrol, **Blnk**: Blank

Resim 9. 17. *M. bovis* sonikasyon ELISA testinin uygulanışı.



(+) **K**; Pozitif kontrol, (-) **K**; Negatif kontrol, **Blnk**: Blank

Resim 9. 18. A. B. Akciğer yüzeyinde tüberküller.



A

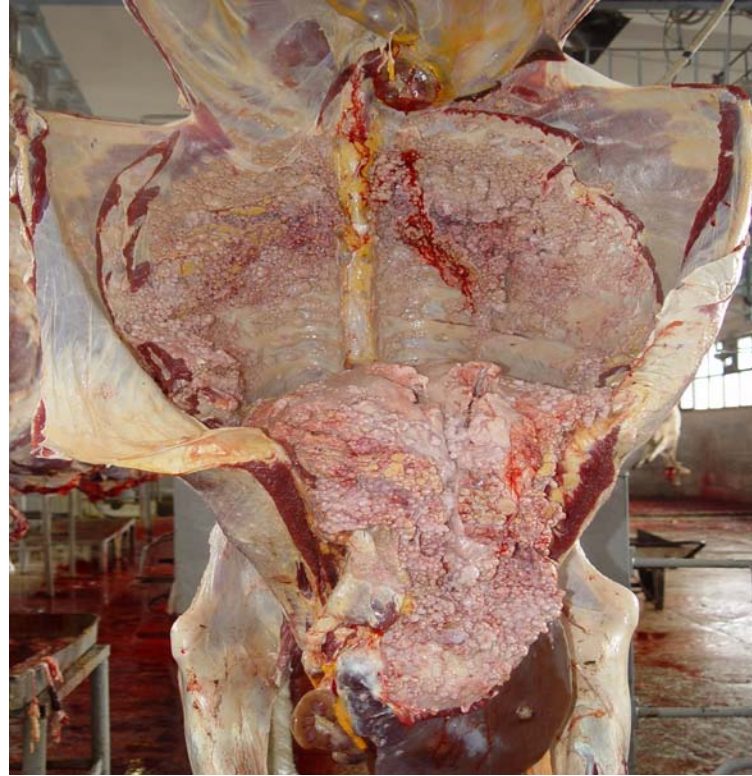


B

Resim 9. 19. Kostaların iç yüzeyinde tüberküller.



Resim 9. 20. Generalize tüberküloz.



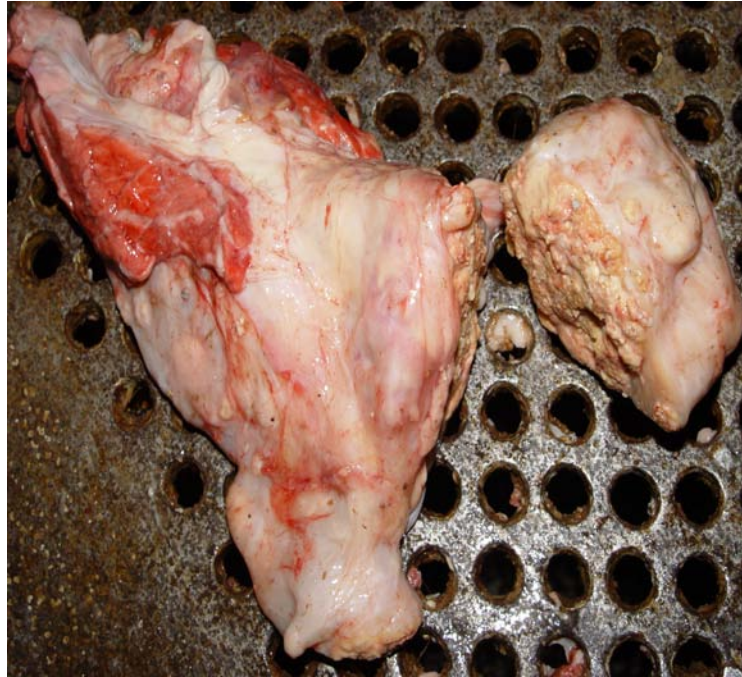
Resim 9. 21. A. B. C. Akciğer lenf düğümlerinin kesit yüzeyinde tüberküller.



A



B



C

Resim 9. 22. Rumen ve barsaklar yüzeyinde tüberküller.



10. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ankara’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. 1996 yılında S.Ü. Veteriner Fakültesi’ne yerleştirildi, 2001 yılında mezun oldu. 2002 yılında S.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına ataması yapıldı, 2004 yılında doktora öğrenimine başladı. Halen S.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda görev yapmaktadır.