

DERLEME

REVIEW

## Sığır Tüberkülozünün Teşhisinde Kullanılan Metotlar ▶

Zafer SAYIN, Osman ERGANİŞ

Kocatepe Vet J (2010) 3 (2): 77-82

### Anahtar Kelimeler

Tüberküloz  
Zoonoz  
Tüberkül  
Granülom  
Mikobakterium

### Key Words

Tuberculosis  
Zoonotic  
Tubercul  
Granulomas  
Mycobacterium

Selçuk Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Konya  
Türkiye

### \* Corresponding Author

Tel: +90 332 223 2710  
Eposta: zsayin@selcuk.edu.tr

▶ Bu çalışma Zafer SAYIN'ın Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 07102007 proje numarası ile desteklenen doktora tezinden derlenmiştir.

### Ö Z E T

Tüberküloz, mikobakteriumlar tarafından oluşturulan, oldukça ciddi sağlık problemlerine ve ekonomik kayıplara sebep olan zoonoz karakterde bir hastalıktır. Tüberküloz basilleri ve konağın yangı hücrelerinin ilişkisine bağlı olarak gelişen, tüberkül adı verilen beyaz-sarı renkli, kalsifiye granülomların oluşumu ile karakterize kronik seyirli bir enfeksiyondur. Bu derlemede sığır tüberkülozunun antemortem ve postmortem teşhisinde kullanılan metotlar hakkında bilgi verilmiştir



### Methods Used in the Diagnosis of Bovine Tuberculosis

### S U M M A R Y

Tuberculosis is zoonotic disease caused by mycobacterium and causes very serious health problems or economic losses. It is a chronic infection characterized by the formation of calcified, white or yellow granulomas called tubercle which developed relationship tubercle bacilli and host inflammatory cells. In this review, it is mentioned that information about the methods used in antemortem and postmortem diagnosis of bovine tuberculosis.

## GİRİŞ

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.<sup>1,2</sup> Etken zorunlu hücre içi patojendir ve çoğunlukla mononükleer fagositik hücreleri enfekte etmektedir.<sup>3</sup>

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.<sup>3</sup> Mikobakteriumlar, OIE (Office International Epizootica) risk gurup III mikroorganizmalar içinde yer alırlar.<sup>4</sup>

## Teşhis

Sığır tüberkülozunun teşhisinde, direkt mikroskopik, kültür, histopatoloji, in vivo ve in vitro hücresel bağışıklığın ölçüm testleri, antikor cevabı ölçen serolojik testler ve moleküler metotlar kullanılabilir. OIE'ye göre sığırlarda tüberküloz enfeksiyonunun antemortem teşhisinde; tüberkülin deri testi, alternatif olarak gamma interferon testi (IFN-γ), posmortem teşhisinde; bakteriyoskopi, histopatolojik muayene, kültür ve moleküler metotlar önerilmektedir.<sup>4</sup> Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Sığır Bovine Tüberküloz Yönetmeliğine (2009) göre; Bakanlık, sığır tüberkülozunun teşhisi için tüberkülin deri testine ek olarak IFN-γ testinin uygulanmasına izin verebilmektedir.<sup>6</sup>

## Bakteriyoskopi

*M. bovis*, klinik örneklerinden ve doku örneklerinden hazırlanan sürme preparatların Ziehl-Neelsen boyama metodu ile boyanarak mavi zeminde kırmızı renkli basillerin görülmesi ile ya da fluoresan asit-fast boyama ile teşhis edilebilmektedir. Lezyonlu dokulardan hazırlanan preparatların haematoxylin-eosin ile boyanarak histo-patolojik incelenmesi ile de teşhis yapılabilmektedir.<sup>4</sup> Bakteriyoskopi ile teşhiste klinik

örneklerdeki bakteri sayısının azlığı gibi nedenlerle yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir.<sup>7</sup> Mikobakteriyel etkenlerin görülebilmesi için klinik örneğin 1 ml'sinde en az 5000-10.000 bakteri bulunması gerekmektedir, ayrıca farklı mikobakteri türlerinin ayırımı yapılamamaktadır.<sup>8</sup> 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.<sup>9</sup>

## Kültür

Kültür tüberküloz teşhisinde altın standart olmakla birlikte, inkübasyon için 4-8, biyokimyasal testler için 2-3 hafta süre gerekmekte, etkenin zoonoz ve OIE gurup III mikroorganizmalar içinde yer alması nedeni ile Biyogüvenlik Seviyesi III (BSL III) laboratuara ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>10,4</sup> Dekontaminasyon sırasında bakterilerin inaktive olması, diğer bakteriler ve saprofitik mikobakteriumlar ile kontaminasyon, klinik örnekteki ölü mikobakteriumlar nedeni ile sensitivitesi %100 olmamaktadır.<sup>11</sup> Etkenin ilk izolasyonunda Lowenstein Jensen, Coletsos base, Stonebrinks gibi yumurta bazlı ya da Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11 gibi agar bazlı besiyerleri kullanılmaktadır. Karakteristik üreme süreci ve koloni morfolojisi *M. bovis* için ön tanı sağlarken diğer *M. tuberculosis* kompleks türlerinden ayırt edilmesi gerekmektedir.<sup>4</sup> *M. bovis* Lowenstein Jensen besiyerinde 3-6 haftada, beyaz renkte, kuru, kabarık, kenarları düzensiz, granüllü, rough tipte, *M. tuberculosis*, 4-5 hafta sürede sarı, turuncu renkte kuru, kabarık, üzeri girintili, rough tipte, *M. avium* 2-3 hafta sürede, pigmentsiz, düz, smooth tipte, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, Herrold's Egg Yolk Agar gibi yumurta bazlı besiyerlerinde 8-10 hafta sürede pigmentsiz, rough tipte koloniler oluşturmaktadır.<sup>2</sup> 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.<sup>12</sup> BACTEC sistemi ile insanlarda diğer konvansiyonel yöntemlere göre iki-üç hafta daha erken teşhis ve antibiyotik duyarlılığı belirlenebilmekte, uygun ve etkili tedaviye başlanabilmektedir.<sup>13</sup>

## Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi

### PPD Tüberkülin Deri Testi

Tüberküloz enfeksiyonu sonucu gelişen geç ve hücresel tipteki bağışıklığı, aşırı duyarlılığı belirlemek için kullanılan bir testtir. 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.<sup>14</sup> Sığırlarda tüberküloz teşhisinde kullanılan PPD, *M. bovis* AN5 suşundan, hazırlanmaktadır.<sup>15</sup> Tüberkülin testi boynun yan orta kısmından (*cervical fold skin test*), ve kuyruk kökünden (*caudal fold skin test*) deri içi uygulanabilmektedir. Ancak kuyruk kökünden uygulama Amerika dışında kullanılmamaktadır.<sup>5</sup> Test, tek başına Bovine PPD ya da Avian ve Bovine PPD'nin aynı anda enjekte edildiği karşılaştırmalı tüberkülin test şeklinde uygulanabilir.<sup>16,5</sup>

Bovine tüberkülin deri içine enjekte edildiğinde canlı, *M. bovis* ya da çapraz reaksiyon veren bakteriler (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*), çevresel mikobakteriumlar, *M. avium subsp. paratuberculosis* ile enfeksiyon, yakın zamanda uygulanan PPD deri testi, *M. bovis* BCG aşılması ile daha önceden duyarlı hale getirilmiş ise enjeksiyondan sonraki 48-72. saate deride şişlik, kızarıklık, ağrı gibi yangı belirtileri ortaya çıkmaktadır.<sup>5</sup> Bu gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun meydana gelebilmesi için reaksiyonu veren T hücrelerinin PPD enjeksiyonundan haftalar önce duyarlı hale gelmiş olması gerekmektedir.<sup>17</sup> Bu süre sığırlarda enfeksiyon başlangıcından itibaren 6-9 haftadır.<sup>5</sup> PPD pozitif test sonucu, tüberküloz enfeksiyonunun varlığı veya yokluğunu değil canlılığın daha önce tüberküloz basili ile duyarlı hale getirildiğini göstermektedir.<sup>18</sup> Enfeksiyonun yeni şekillenmesi, generalize enfeksiyon nedeni ile immün sistemin baskılanmış 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 testinde yanlış negatif sonuç alınabilmektedir.<sup>5</sup>

## Gamma Interferon (IFN- $\gamma$ ) Testi

Tüberküloz enfeksiyonunda, insan ve hayvanlarda etkene karşı gelişen hücresel bağışıklığı in vitro ortaya koymak için kandaki IFN- $\gamma$  düzeyi ölçülebilmektedir.<sup>5,19</sup> Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, tüberküloz enfeksiyonuna karşı bağışıklıkta hücre aracılı immun cevabın önemli olduğu ve bu cevapta CD<sub>4</sub>+ yardımcı T-lenfositleri ve bu hücrelerden salınan IFN- $\gamma$ 'nın korunmada önemli rol oynadığı, gösterilmiştir.<sup>19</sup>

IFN- $\gamma$  testi, sığır tüberkülozunun teşhisi amacıyla 1980 yılında Avusturalya'da geliştirilmiştir.<sup>20</sup> Testin geliştirilmesindeki temel amaç hayvanları PPD gibi mikobakteriyel antijenler ile duyarlı hale getirmeden PPD deri testine göre daha yüksek sensitivite ve spesifite ile tüberküloz enfeksiyonunu teşhis edebilmektir.<sup>32</sup>

Testte, Bovine ve Avian PPD ya da diğer mikobakteriyel antijenler (ESAT-6, CFP-10) ile uyarılan tam kan ya da mononükleer hücre kültüründe, 16-24 saat süre içinde duyarlı lenfositlerden salınan IFN- $\gamma$  düzeyi, monoklonal anti-bovine IFN- $\gamma$  antikorlar kullanılarak sandwich ELISA ile ölçülmektedir.<sup>5,19</sup>

IFN- $\gamma$  testi tüberküloz enfeksiyonunu, PPD deri testine (6-9 hafta) göre daha erken (1-3 hafta) dönemde ve düşük dozdaki bakteri ile enfeksiyonda teşhis edebilmektedir.<sup>21</sup> 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.<sup>5</sup> 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,<sup>22</sup> kan numunelerinin alımı sırasında oluşabilecek hatalar (kanın pıhtılaşması, kulak numaralarının hatalı alınması), anerjik hayvanlarda yanlış negatif sonuç vermesi, IFN- $\gamma$  testinin dezavantajlarıdır.<sup>5</sup> Enfekte olmayan 6 aydan daha küçük sığırlarda, mikobakteriyel antijenler ile uyarılan kandaki doğal katil hücrelerin (NK), IFN- $\gamma$  salgılaması nedeni ile yanlış pozitiflik görülebilmektedir.<sup>23</sup>

## Lenfosit Poliferasyon Testi

Tüberkülozlu hayvanların teşhisinde kullanılan 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 gerçekleştirilebilmektedir. Hayvanların her an maruz kalabileceği çevresel mikobakteriumlardan kaynaklanan çapraz antijenlere lenfositlerin cevabı elimine edilerek spesifite artırılmaktadır.<sup>15</sup> Lenfosit proliferasyon testinde de kan örnekleri alındıktan kısa süre sonra laboratuara ulaştırılmalıdır. 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.<sup>15</sup>

## Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi

Tüberküloz enfeksiyonunun serolojik teşhisi amacı ile ilk kez 1898 yılında aglutinasyon testi kullanılmıştır.<sup>24</sup> Bundan sonraki yıllarda komplement fiksasyon testi (CFT), pasif hemaglutinasyon, jel presipitasyon, immunelektroforez, immunfloresan gibi yöntemler kullanılmış ancak sensitivite ve spesifite açısından yetersizlikle karşılaşmıştır.<sup>24,29</sup> Başta IgG olmak üzere IgM ve IgA tipi antikörlerin saptanması için ELISA'nın yüksek derecede sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu ileri süren çalışmalar bulunmasına rağmen, kullanılan antijenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir.<sup>25</sup> Mikobakteriumlar ile enfekte canlılarda antikör cevap, bakteriyel yükün ve patolojik değişikliklerin arttığı enfeksiyonun geç döneminde artmakta,<sup>26,27</sup> enfeksiyonunun seyri sırasında farklı dönemlerde mikobakteriumlardan çok sayıda antijen açığa çıkmakta, ancak aynı antijenlere karşı gelişen humoral cevap, vakalar arasında benzerlik göstermemektedir.<sup>28,29</sup>

Mikobakterium enfeksiyonlarının serolojik teşhisi ucuz ve basit olmak ile birlikte, düşük sensitivite ve spesifiteleri nedeni ile deri testine ve IFN- $\gamma$  testine alternatif olamamaktadır.<sup>27</sup> Ancak, anejrik sığırların teşhisi serolojik testler ile mümkün olabilmektedir.<sup>30</sup> Serolojik teşhis metotlarının, 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 antijen enjekte edilmediği için immun sistemin etkilenmemesi ve testin tekrar tekrar uygulanabilmesi, ucuz ve basit olması gibi avantajları bulunmaktadır.<sup>31</sup>

## Moleküler Metotlar

Süt, kan, idrar, burun mukusu, çevresel örnekler, lenf düğümü biyopsileri, postmortem doku ve organlardan *M. bovis* teşhisinde kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), PZR-REA (restriction endonuclease analysis), RFLP (restriction fragment length polymorphism), oligotyping, spoligotyping, DNA probe gibi moleküler metotlar, kültüre göre zaman, doğru teşhis ve bulaşma güvenilirliği yönüyle avantaj sağlamaktadır.<sup>32,33</sup> Ancak klinik örneklerdeki inhibitörler ve DNA izolasyonundaki yetersizlik, bu tekniklerin pahalı ve karmaşık oluşu eğitilmiş personele ihtiyaç göstermesi kullanımlarını sınırlandırmaktadır.<sup>18</sup> PZR çoğunlukla kültüre edilen mikobakteriumların tür düzeyinde identifikasyonunda kullanılmaktadır.<sup>5</sup> Mikobakteriumların doku örneklerinden moleküler metotlar ile direkt teşhisi kültür kadar duyarlı olmamakla beraber, oldukça kısa zamanda (1-2 gün), çok az sayıda mikroorganizma varlığında (1-10 mikobakterium) ve klinik numunedeki etkenin inaktive olduğu durumlarda teşhis imkanı sağlamaktadır.<sup>10</sup> *M. tuberculosis* kompleks türlerinin birbirinden ayırımında Spoligotyping,<sup>34</sup> *pncA* ve *oxyR* genlerindeki mutasyonları belirlemeye yönelik PZR,<sup>35</sup> *mtp* 40 PZR,<sup>36</sup> farklı gen bölgelerinin amplifikasyonuna yönelik metotlar kullanılabilir.<sup>37</sup>

## Hayvan Deneyi

Deneme hayvanı olarak genellikle kobaylar kullanılmaktadır. Marazi maddelerden hazırlanan inokulum (0,5 mg bakteri/ml), kobayların inguinal lenf yumruları yakınına deri altı olarak 0,2-0,3 ml enjekte edilir. 6-8 hafta sonra hayvanlara otopsi yapılarak iliakal ve subiliakal lenf düğümlerinden bakteriyoskopi ve kültür yapılarak teşhise gidilebilmektedir.<sup>38,12</sup>



## SONUÇ

Ülkemizde, 2008 yılında 37 il, 418 işletmede PPD deri testi ile test edilen 6169 sığırdan 2458'inde (%39,8) sığır tüberkülozu belirlenmiştir.<sup>39</sup> Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 2006 yılında 14,4 milyon insanda tüberküloz vakası bildirilmiştir.<sup>40</sup> Türkiye'de, 2007 yılında insanlarda tüberküloz oranı, yüz binde 29, enfeksiyondan dolayı ölüm oranı yüz binde 5 olarak rapor edilmiştir.<sup>41</sup>

*Mikobakterium enfeksiyonu kronik seyirlidir ve uzun süre subklinik olarak seyretmektedir.<sup>5</sup> Enfekte canlılar çok uzun süre klinik belirti göstermemekte ve klinik belirtiler enfeksiyona özgü olmamaktadır.<sup>18</sup> Bu yüzden insan ve hayvanlardaki tüberküloz enfeksiyonunun yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip, kolay uygulanabilir ve temin edilebilir testler ile erken teşhisi enfeksiyon ile mücadele ve eradikasyon için oldukça önemlidir*

## KAYNAKLAR

- Butler JP (1986) The Mycobacteria. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Volume: 2, Baltimore, USA, Williams&Wilkins, 1435-1457.
- Hensyl WR (1994) The Mycobacteria. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition, Baltimore, USA, Williams&Wilkins, 597-604.
- Angela DP, Giuseppina C, Tony FV, Bijo B, Fatmira S, Giuseppina T (2006) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in milk using polymerase chain reaction (PCR). *Food Control*, 17, 776-780.
- OIE (2008) Prescribed and alternative diagnostic test for OIE listed disease. Terrestrial Animal Health Code, Chapter 1.3, p: 1-5.
- Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS (2006) Antemortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$  interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 81, 190-210.
- Resmi Gazete (2009) Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği. Sayı: 27188.
- Hamasur B, Bruchfeld J, Haile M, Pawlowski A, Bjorvatn B, Kallenius G (2001) Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *Journal of Microbiological Methods*, 45, 41-52.
- Mukherje A, Kalra N, Beena KR (2002) Immunohistochemical detection of mycobacterial antigen in tuberculous lymphadenitis. *Ind J Tub*, 49, 213.
- Manzano JR, Blanquer R, Calpe JL, Caminero JA, Cayla J, Dominguez JA, Garcia JM, Vidalh R (2008) Diagnosis and treatment of tuberculosis. *Arch Bronconeumol*, 44, 551-66.
- Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L (1995) Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 33-36.
- Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL (1992) Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 255-258.
- Koneman EW, Winn WC (2006) Mycobacteria. *Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Sixth Edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1066-1124.
- İşitez M, Çetinkaya Z, Altındiş M, Çiftçi İH, Fidan F (2004) Afyon bölgesinde Lowenstein-Jensen, BACTEC ve TK medium yöntemleri ile izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının dört major ilaca karşı dirençlerinin belirlenmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 45-48.
- Gemicioğlu B (1999) Erişkinde tüberküloz kliniği ve tanısı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri; Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu, İstanbul, 21-37.
- OIE (2008) Bovine tuberculosis. Terrestrial Manual, Chapter 2.4.7, p: 683-694.
- Chalmers JW, Jamieson AF, Rafferty P (1996) An outbreak of bovine tuberculosis in two herds in South West Scotland, Veterinary and Human public health response. *Journal of Public Health Medicine*, 18, 54-58.
- Pollock JM, McNair J, Bassett H, Cassidy JP, Costello E, Aggerbeck H, Rosenkrands I, Andersen P (2003) Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1856-1860.
- Raqib R, Rahman J, Kamaluddin AKM, Kamal SMM, Banu FA, Ahmed S (2003) Rapid diagnosis of active tuberculosis by detecting antibodies from lymphocyte secretions. *The Journal of Infectious Diseases*, 188, 364-370.
- Pollock JM and Andersen P (1997) Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *M.bovis* in cattle. *Infection and Immunity*, 65, 2587-2592.
- Wood PR, Rothel JS (1994) In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 40, 125-135.
- Pollock JM, Welsh MD, McNair J (2005) Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108, 37-43.
- Gormley E, Doyle MB, McGill K, Costello E, Good M, Collins JD (2004) 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*, 10, 413-420.
- Olsen I, Boysen P, Kulberg S, Hope JC, Jungersen C, Storset AK (2005) 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*, 73, 5628-5635.
- Daniel TM, Debanne SM (1987) The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis*, 135, 1137.
- Bengisun JS, Gökırmak MÇ, Anbal E, Saygun N, Özenci E (1997) Tüberkülozun serolojik tanısında ELISA testinin tanı değeri. *Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası*, 50, 193-195.
- Neill SD, Bryson DB, Pollock JM (2001) Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, 81, 79-86.
- Vordermeier M, Goodchild A, Clifton-Hadley R, De la Rua R (2004) The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Veterinary Record*, 155, 37-38.
- Gupta VK and Ram GC (2000) Fractionation and immunoreactivity of membrane associated proteins of *M. bovis*. *Ind. J Anim Sci*, 70, 1015-1020.
- Özerol Hİ (2003) Tüberkülozun serolojik tanısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.
- Yearsley D, Egan J, Costello E, O'Reilly P, Hewinson RG (1998) An evaluation of an anamnestic ELISA for the detection of tuberculous cattle. *Irish Veterinary Journal*, 51, 303-306.
- Lilenbaum W, Riberio ER, Souza GN, Moreira EC, Fonseca LS, Ferreira MAS, Schettini J (1999) Evaluation of an ELISA-PPD for diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Research in Veterinary Science*, 66, 191-195.
- Unver A, Atabay Hİ, Güneş V, Çitil M, Erdoğan HM (2007) Kars Yöresinde Sığır Tüberkülozünün Yaygınlığının PCR ile belirlenmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 13, 27-31.

33. Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S (1998) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1050-1055.
34. 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 (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 35, 907-914.
35. Scorpio A, Zhang Y (1996) Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase, nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*, 2, 662-667.
36. Del Portillo D, Murillo LA, Patorroyo E (1991) Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 2163-2168.
37. Chimara E, Ferrazoli L, Leo SC (2004) *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB* restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99, 745-748.
38. Yardımcı H (2006) *Mycobacterium* enfeksiyonları. In: Aydın N ve Paracıkoğlu J, Edit. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). 1. Baskı. 87-107, Ankara. İlke-Emek Matbacılık ve Yayıncılık.
39. OIE (2009) World Animal Health Information Database. <http://www.oie.int/wahis/public.php>, 1 Ocak 2010.
40. WHO Report (2008) Global tuberculosis control, surveillance, planning, financing. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html), 1 Ocak 2009
41. WHO Report (2009) Global tuberculosis control, epidemiology, strategy, financing. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html), 4 Aralık 2009.