

# İÇ ANADOLU BÖLGESİNDE SIĞIRLARDAKİ PARATÜBERKÜLOZİSİN MİKRO-KOMPLEMENT FİKZASYON VE TÜP KOMPLEMENT FİKZASYON TESTİ İLE SEROLOJİK OLARAK TETKİKİ

Bülent VURAL (\*)

Nuray ATALA (\*\*)

## G İ R İ Ő

Paratuberculosis, myco bakterium paratuberculosisin barsak mukozası ve barsak lenf yumrularında çoğalarak kronik bulaşıcı enteritise sebep olan zayıflama ile karakterize bir yetiştirme hastalığıdır.

Hastalık ilk olarak Johne ve Frothingam tarafından (1895) kronik ishal gösteren bir sığırdaki görülmüştür. Araştırmacılar ölen hayvanların barsaklarında A.R bakteri kümelerini görerek enfeksiyonun tüberkülozla ilgili olduğunu zannetmişlerdir (13). Bu hastalık konusunda diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda hastalığın spesifik bir etken tarafından meydana getirildiği ortaya konmuş; etken izolasyonu (1911) Twort ve Ingram tarafından yapılmıştır (25).

Paratuberküloz, başta sığır olmak üzere koyun, keçi, geyik, lama, antilop ve deve gibi çift tırnaklılarda görülen bir hastalıktır (2, 7, 9).

Bu hastalık, Dünyanın her tarafında oldukça yaygın bulunmakta ve özellikle sütçülük yönünden yetiştirilen sığırlarda daha çok görülmektedir. Enfeksiyon yavaş yayılır ve kronik bir özellik taşır. Meydana getirmiş olduğu ekonomik kayıplar büyük boyutlardadır (8, 9, 11, 19).

Ülkemizde bu hastalığın bulunduğunu bildiren ilk yayın Sezginer tarafından (1928) yapılmıştır (23).

(\*) Hayvan Hast. Araşt. Enst. Uzman Vet. Hek.

(\*\*) » » » » Asist.

Akçay ve Erbil Karacabey harasında sığırlarda mikroskopik ve histopatolojik olarak hastalığı tesbit etmişler (1). Erdöl İstanbul mezbahasında kesilen sığırlarda hastalık lezyonlarına rasladığını bildirmiştir. Demirer ve Yücel, Türkiye'de Myco. Paratüberculosisi ilk defa izole edip üretmişlerdir (4). Yapılan diğer araştırmalarla da bu hastalığın Yurdumuzda oldukça yaygın olduğu ortaya konulmuştur (5, 7, 27). Paratüberküloz'a süt sığırcılığı yapılan yerlerde daha sık rastlanmaktadır. Enfeksiyon bir mer'a hastalığı olarak belirlenmesine rağmen ahır enfeksiyonları da önemli bir yer tutar. Hastalığın klinik devresinde bakteriler gaita ile bol miktarda çıkarılır. Etkenin dayanma müddeti de uzun olduğundan o bölge devamlı bir enfeksiyon odağı olarak kalır. Sürüye tek bir hasta hayvanın girmesi enfeksiyonun yayılması için yeterlidir. Bulaşma çok kere bulaşık su ve besinle sindirim kanalı yoluyla meydana gelir (2, 17).

Bazı araştırmacılar, rutubetli ve asit karakterdeki toprakların hastalığın çıkışında etkili olduğunu, alkali karakterdeki toprakta yetiştirilen hayvanlarda ise enfeksiyona az rastlandığını bildirmişlerdir (2, 11).

Hayvanlarda konjenital bulaşma da söz konusudur. Yapılan diğer bir çalışmada meme ve meme lenf bezlerinde mikroorganizmanın tesbit edildiği ve bu nedenle enfeksiyonlu hayvan sütleri ile buzağı beslenmesinin sakıncalı olduğu belirtilmiştir (6).

Paratüberkülozun inkübasyon süresinin uzun olması nedeni ile klinik belirtiler geç ortaya çıkarlar. Hole, paratüberkülozda klinik belirtilerin en erken 9 ayda meydana gelebileceğini, çoğu olayların ise 2-5 yaş arasında olduğunu belirtmiştir (11).

Hastalığın ilk septomlarından biri submandibular ödemdir. Hayvanda ilerleyen kronik bir zayıflama vardır. Aralıklı veya devamlı bir diyare klinik tabloyu tamamlar. Paratüberkülozda kan tablosu üzerinde yapılan çalışmalar da hemoglobün, kalsiyum ve magnezyum seviyesinde düşüş görülmüştür (2, 10).

Hastalığın teşhisi amacıyla yapılan çalışmalarda inkübasyon süresinin uzun olması ve hayvanlarda enfeksiyona rağmen klinik septomların görülmemesi yüzünden güçlükler meydana geldiği, hastalığın kontrol ve eradikasyonunda da zorlukların ortaya çıktığı, çeşitli teşhis yöntemleri ile yapılan paralel çalışmalar, kul-

lanılan teşhis yöntemlerinin hastalığın belirli dönemlerinde önem taşıdığını, bu testler arasında serolojik yöntemlerin daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (11, 19, 22).

Stuart, tabii enfeksiyonlarda klinik septomlar meydana gelmeden hastalığın ilk dönemlerinde gaitadan yapılan mikroskopik muayenelerde etkenin tesbit edilebileceğini klinik septomların başladığı devrede C. fizyasyon titresinin yükseldiğini, allerjik testlerin ise hastalığın ilk devresinde ve patolojik lezyonların şekillendiği devrede çalıştığını,

Hastalığın son safhasında allerjik testlerin genellikle menfiye döndüğünü ve A.A.R. diğer mikobakterilerle azda olsa bazı sağlam hayvanlarda spesifik olmayan reaksiyonların meydana gelebileceğini bildirmiştir (24).

Ringdal, C. fizyasyon ve diğer teşhis metodları ile paralel olarak yaptığı çalışmada C. fizyasyon testinin hastalığın teşhisinde duyarlı olduğunu yinede periyodik sürü muayenelerinde diğer yöntemlerin reaktörleri ortaya koymada yardımcı teşhis aracı olarak kullanılmasının faydalı olacağını belirtmiştir (21).

Zimmerman; paratüberkülozlu 5 sürüdeki 292 hayvandan temin ettiği 528 serum numunesini belirli aralıklarla muayene etmiş, bazı hayvanların iki yılda dört kez tekrarlanan serum yoklamalarında komplementi fikze edici antikörlere rastlanış oranı ile hayvanların yaşları arasında kesin bir ilişki bulunduğunu kanısına varmıştır. 4 yaşından sonra pozitif olayların oranının yükseldiğini 6-8 yaşlarda % 60'a çıktığını bu yaştan sonra % 30'a indiğini tesbit etmiştir (28).

Withers, sığırlarda latent seyreden enfeksiyonun insidansı ile ilgili çalışmada mezbahada kesilen 2.354 sağlam hayvandan % 11'inin paratüberküloz bakterisini taşıdığını, böyle hayvanların hastalığın yayılmasında önemli rol oynadığını belirtmiştir (26).

Hastalığın meydana getirdiği ekonomik kaybın önlenmesi amacıyla yapılan epidimiyolojik çalışmalarda enfeksiyon teşhis edilen hayvanların bulunduğu ortamdan uzaklaştırılması ve pozitif vak'aların çıktığı sürülerinde uzun bir süre gözlem altında tutulması önerilmiştir (8, 11, 19).

Para tüberkülozun teşhisinde kullanılan C. fizyasyon metodunun işlerliği konusunda yapılan çalışmalarda diğer A.A.R. bakteri-

erin meydana getirilebileceği non spesifik reaksiyonların, homolog antijenlerin daha spesifiye edilmesi ile bu yanıtıcı reaksiyonların asgariye indiği belirtilmiştir (3, 12, 16, 19).

Paratüberküloz bugün dahi bütün dünyada hayvancılığın gelişmesinde ve sağlığında bir problemdir. Büyük ekonomik kayıplara nede nolan bu hastalıkta portörlerin teşhisi eradikasyonda büyük önem taşımaktadır.

Biz bu çalışmamızda İç Anadolu bölgesindeki sığırlarda paratüberkülozün insidansını M.c. fikzasyon ve tüp komplement fikzasyon testleri ile mukayeseli olarak araştırmayı amaçladık.

### **MATERYAL ve METOT**

İç Anadolu bölgesinde bulunan Devlet Kurumlarından Enstitümüz serolojik teşhis laboratuvarına gönderilen ve halk elindeki hayvanlardan temin edilen 2919 adet sığır kan serumu materyalimizi oluşturmuştur. Bu serumlar paratüberküloz yönünden tüp komplement fikzasyon (II) ve mikro komplement fikzasyon (3) testi ile mukayeseli olarak işlenmiştir.

Çalışmamızda, N.H. Hole ve Chandlerin metod ve tekniği kullanılmıştır (3, 11).

#### **Komponentler (reaktifler) :**

- Antijen : Veybridge (Central Veterinary Lab.)'dan temin edilip, laboratuvarımızda pasajlarla idame ettirilen Mycobacterium Johne'in 3 and 5 path suşu kullanılarak antijen Hole yöntemi ile hazırlanarak müsbet ve menfi serumlarla titresi yapılmıştır.
- Komplement : Bir gece aç bırakılan sağlam ve erkek kobaylardan temin edilen kan serumu titresi tayin edilerek (2 M.H.D.) reaksiyonda komplement olarak kullanılmıştır.
- Hemolitik serum Haemolysin : Enstitümüz serolojik teşhis laboratuvarından temin edilmiştir.
- Hemolitik sistem : % 3 yıkanmış koyun eritrositleri suspansiyonu ile titresi belli hemolitik serum eşit ölçüde katılarak indikatör sistem hazırlanmıştır.
- Solusyonlar : Serum sulandırılmasında 0,5 % Fenollü tuzlu su, diğer sulandırmalarda serum fizyolojik kullanılmıştır (18).

- Tüp komplement fikzasyon testinde komponentlerin volümü 0,4 cc. ve test tüpü 2 cc. hacminde, M.C.F. testinde her komponent 25 mikrolitre olup test mikro plate'lerde yapılmıştır.
- Serumlar : Temin edilen kan serumlarındaki kalıntı eritrositleri uzaklaştırmak için santrifüj edilip her serum numunesi numaralanmıştır. Serumlar fenollü tuzlu su ile 1/5 oranında sulandırılarak 56°C'de 30 dakika benmaride inaktive edilmiştir. İnaktive edilen serum örnekleri; hazırlanıp titreleri tesbit edilen komponentlerle, her iki metodla paralel olarak işlenmiştir.
- Her iki metodda fikzasyon ve hemolysis safhaları :
  - A — Tüp Komplement Fikzasyon :

Serum ve sonra antijen test tüplerine konarak oda ısısında bir saat bırakılır. 1500-2000 devirde 5 dakika santrifüj edilir. Üstteki sulu kısım atılır. Tüpler bir gece 0, +4 derecede buzdolabında tutulur. Ertesi gün 0,8 F.T.S. ve komplement ilave edilir ve oda derecesinde bir saat bırakılır.
  - Hemolizis safhası :

Bu sürenin sonunda hemolitik sistem ilave edilip 37°C'lik benmaride yarım saat bırakılır. Sonra bütün tüpler 1500-2000 devirde 3-4 dakika santrifüj edilerek Hemoliz, kontrol tüpleri ile kontrol edilerek değerlendirilir.
  - B — Mikro Komplement Fikzasyon :
  - Fikzasyon safhası :

Microplate, serum, antijen ve komplement konarak bir saat oda ısısında bırakılır.
  - Hemoliz safhası :

Sürenin bitiminde hemolitik sistem ilave edilerek 45 dakika etüvde tutulur. Bu müddetin sonunda platler etüvden çıkarılıp serin bir yere konarak bırakılır, 5 dakika sonra reaksiyon sonucu okunur.
  - Kontroller : Paratüberkülozis bakımından muayenesi yapılan serumlarla birlikte her test de pozitif, negatif serum, antijen, komplement ve kan konularak reaksiyon değerlendirilir.
- Reaksiyon değerlendirilmesi :

% 75 - 100'lük fikzasyon	müsbet
% 50 hemoliz	şüpheli
% 100 hemoliz	menfi olarak değerlendirilir.

### B U L G U L A R

Bu çalışmamızda temin edilen 2919 adet sığır kan serumu paratüberküloz yönünden tüp komplement fikzasyon ve m.c. fikzasyon metodu ile mukayeseli olarak muayene edilmiş, her iki metodla alınan sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

#### Tüp Komplement fikzasyon sonuçları :

Serum adedi	: 2919
Serum dilisyonu	: 1:5
Müsbet reaksiyon adedi	: 79 (Reaktör)
Şüpheli reaksiyon	: 35
Negatif reaksiyon	: 2805

#### Mikro komplement sonuçları :

Serum adedi	: 2919
Serum dilisyonu	: 1:5
Müsbet reaksiyon adedi	: 67 (Reaktör)
Şüpheli reaksiyon	: 22
Negatif reaksiyon	: 2830

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Paratüberkülozun, teşhisi amacına yönelik çalışmalarında, Hole, C. fikzasyon tekniğinin tüberküloz bulunmayan, çiftliklerde spesifik olarak kullanılabileceğini ve teşhis için duyarlı bir test olduğunu bildirmiştir. Modifiye ettiği komplement fikzasyon tekniğinin kullanılmasıyla non-spesifik reaksiyonların en az seviyeye düştüğünü ve hastalığın eradikasyonunda emin bir metod olacağını bildirmiştir (10, 11, 12).

Biz de çalışmamızda, paratüberkülozis yönünden muayene ettiğimiz sığır kan serumlarını tüberkülozdan Salim Devlet Çiftliklerinden temin ederek nonspesifik reaksiyonların bu yönden elimine edilmesini amaçladık ve aldığımız sonuçlardan hastalığın mücadelesinde pozitif olayları ortaya koyacak bir yöntem olduğunu tesbit ettik.

Chandler, paratüberkülozun teşhisinde, m.c. fikzasyon tekniği ile Hole tekniğini mukayeseli olarak kullanmıştır. Bu çalışmasını paratüberkülozlu ve paratüberkülozdan salim hayvanlar üzerinde yaparak Ptb.'dan tbc.'den salim hayvanlarda m.c. fikzasyon metodunun % 97 menfi olduğu halde Hole metodunda bu oranın % 82 olduğunu tesbit etmiş ve m.c.f. testinin daha spesifik çalıştığını belirtmiştir (3).

Yılmaz, m.c. fikzasyon metodu ile yaptığı çalışmada 3476 sığır kan serumunu muayene ederek 161 reaktör tesbit etmiş ve m.c. fikzasyon metodunun çok pratik olduğunu kısa zamanda çok serumun muayene edilme imkânı verdiğini ve duyarlı bir test olduğunu belirtmiştir (27).

Yine Doğuer, 4376 serum numunesini paratüberküloz bakımından mikro C. fikzasyon testi ile muayeneye tabi tutmuş, ayrıca bu serumlardan 317'sini tüp c.f. testi ile mukayese ederek 299 serumun mikro ve tüp c.f. testleri ile aynı neticeyi verdiğini 18 serumdan ise değişik sonuç alındığını bildirmiştir (5).

Her iki testle mukayeseli olarak yaptığımız çalışmada menfi reaksiyonların oranlarını, Hole metodunda % 96.06 ve m.c.f. metodunda ise % 96.9 olarak bulduk. Almış olduğumuz sonuçlar yukarıdaki araştırmalardan alınan sonuçlarla uyum sağlamaktadır.

Emre, paratüberkülozun teşhisi için mukayeseli olarak yaptığı araştırmada, 1711 sığır kan serumunu Hole metodu ile muayene ederek 44 müsbet, 67 şüpheli reaksiyon bulmuş, 39 kan serumunu Hole, m.c. fikzasyon (Chandler) ve Wadswart-Maltener metodları ile karşılaştırmalı, olarak muayene ederek Hole testinin diğer testlerden daha duyarlı çalıştığını sonuçların değerlendirilmesinde enfekte olmayan hayvanların % 95'inin c.f. testine menfi reaksiyon verdiğini belirtmiştir (7).

Bizim araştırmamızda aldığımız sonuçlara göre her iki metodun aynı duyarlılıkta olduğu tesbit edilmiştir. Mc. Queen, paratüberkülozlu hayvanların kan serumlarında çeşitli preservatif maddelerin (HgCl<sub>2</sub>, Fenollü tuzlu su gibi) reaksiyonların stabilitesi üzerine olan etkisi ile çalışmasında % 0.5'lik fenollü tuzlu su ilave edilen serumların komplementi fikze eden özelliklerinin kuvvetlendiğini tesbit etmiştir (18).

Rice, paratüberkülozun teşhisinde kullanılmakta olan c. fikzasyon tekniğini modifiye ederek bu modifikasyonda sadece sığır serumlarının sulandırılıp inaktive edilmeden muayeneye tabi tutulmasından ibaret olduğunu ve C. fikzasyonun bu modifiye şekli ile tabi enfekte sığırlarda klinik semptomların başlamasından 2-3 ay önce hayvanların serumlarında yüksek titrede müsbet reaksiyonlar elde ettiklerini bildirmiştir (20).

Biz de bu çalışmamızda ve laboratuvarımızda rutin serolojik muayenelerinde serum dilisyonlarını 0,5 % fenollü tuzlu su ile yaparak kullanmakta ve iyi netice almaktayız. Klinik, allerjik ve serolojik olarak tesbit ettiğimiz sığırlardan temin edilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan serum örnekleri ve araştırmamızdan sağlanan pozitif serumların belirli aralıklarla yaptığımız kontrollerinde komplementi fikze edici özelliklerini muhafaza ettiğini gördük. Antikomplementer reaksiyon göstereceğinden dolayı, Rice tarafından önerilen metodun uygulanamayacağı kanaatindeyiz.

Araştırmamızda, temin edilen 2919 sığır kan serumunun paratüberküloz yönünden mukayeseli olarak yapılan muayenesinde, her iki test sonucunda tüp komplement fikzasyon metodunda % 2,7, m.c. fikzasyonda ise % 2,2 reaktör tesbit edilmiş olup, m.c. fikzasyon testinde pozitif reaksiyon gösteren 67 serum, tüp komplement fikzasyon testinde aynı neticeyi vermiş, 12 serumdan ise değişik sonuç alınmıştır. Buna göre her iki test arasında uyarlık oranı % 84,8 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmamızda, mikro komplement fikzasyon metodunun geniş ölçüde yapılacak taramalarda, pratik ve kısa zamanda çok miktarda serumun muayene edilme imkânı verdiği kanaatine varılmıştır.

### **ÖNERİLER:**

Bütün dünyada yaygın olan ve intensiv hayvan yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olan paratüberkülozun, tanımında ve epidemiyolojik insidansının belirlenmesinde serolojik teşhisin önemli bir yeri vardır.

Hastalığın teşhisinde kullanılan metodların değeri hastalığın bulunduğu devreye göre değişmekte ve diğer A.A.R. bakterilerinin yol açtığı non-spesifik reaksiyonlarda teşhisi güçleştirmektedir.



Bu nedenle, paratiüberkülozla mücadelede serolojik teşhisin yanında diğer teşhis yöntemlerinin de kullanılması ile mücadeleden daha kesin sonuç alınacağı kanısındayız.

## Ö Z E T

İç Anadolu bölgesinde bulunan Devlet Kurumlarından ve Halk elindeki hayvanlardan temin edilen 2919 adet sığır kan serumu, tüp komplement fikzasyon ve mikro komplement fikzasyon testiyle paratiüberküloz bakımından mukayeseli olarak muayeneye tabi tutulmuş, her iki test sonucunda tüp komplement fikzasyonda % 2,7 m.c. fikzasyonda ise % 2,2 reaktör tesbit edilmiş olup m.c. fikzasyon testinde pozitif reaksiyon gösteren 67 serum tüp komplement fikzasyon da aynı neticeyi vermiş. 12 serumdan ise değişik sonuç alınmıştır. Buna göre her iki test arasında uyarlık oranı % 84,8 olarak bulunmuştur.

## S U M M A R Y

A comparative analysis of Johne's disease in the cattle of central anatolia with micro c. fixation and tube c. fixation tests.

According to our laboratory research, 2919 blood sera from the animals of state and private farms were tested by the micro complement fixation and tube complement fixation methods.

A) The result of

### M. Complement fixation

Amount of samples	: 2919
The serum dilution	: 1/5
Pozitive	: 67
Suspicious	: 22

B) The result of

### Tube C. fixation

Amount of samples	: 2919
The serum dilution	: 1/5
Pozitive	: 79
Suspicious	: 35

## L İ T E R A T Ü R

- 1 — AKÇAY, Ş., ERBİL, İ.E. (1932) : Karacabey harası sığırlarındaki paratüberküloz vak'aları, Baytari mecmua, 10, 4.
- 2 — ARDA, M. (1982) : Özel Mikrobiyoloji. A.A. Vet. Fak. Yayınları. No: 386. Ders Kitabı. A.Ü. Basımevi, Ankara.
- 3 — CHANDLER, R.L. (1956) : A micro complement fixation for Johne's Disease and its Application to Diagnosis in cattle and sheep; Vet. Rec. 68, 819-825.
- 4 — DEMİRER, F., YÜCEL, N. (1964) : Çifteler harası ile Alpu'daki Mesut Zeytinoğlu'na ait çiftlikteki sığırların gaitasından (Bacillus) Mycobakterium paratuberculosis (Johne'i)'in memleketimizde ilk izolasyonu; Türk Vet. Hek. Derg. 34, 3-4, 170-171.
- 5 — DOĞUER, M. (1969) : Paratüberkülozün serolojik teşhisi üzerinde çalışmalar; Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg. 3, (7-8), 76-91.
- 6 — DOYLE, T.M. (1954) : Isolation of Johne's basilli from the udder of clinically affected cows. Brit. Vet. J. 110, 6, 215-218.
- 7 — EMRE, N. (1967) : Yurdumuz sığırlarında paratüberkülozun teşhis metodları üzerinde mukayeseli araştırmalar. Güven Matbaası, Ankara.
- 8 — GRAYSON, A.R., LETTS, G.A. (1958) : Johne's disease in victorian cattle; Aust. Vet. J. 34, 147-151.
- 9 — HATEKEYAMA, H., YUGI, H., NEMATO, H. (1963) : An Outbreak of Johne's disease Among sheep in Japan; Nat. Inst. Anim. Hlt. Quart; 3, 21-31.
- 10 — HOLE, N.H. (1952) : Johne's disease I-present day diaghosis and preliminary note on an investigation into the value of a serological method; Vet. Res. 64, 601-603.
- 11 — HOLE, N.H. (1956) : Johne's disease in bovines infection and spread, Epidemiology, diagnosis in control of Johne disease in cattle, sheep and goats; Org. Ec. Coop. Paris, Proj. 207, 83-120.
- 12 — HOLE, N.H. and MACLAY, M.H. (1959) : The diagnosis of Johne's Disease in Cattle and identification of M. Johne infection; Vet. Rec. 71, 1145-1167.
- 13 — JOHNE, H.A. and FROTHINGAM, L. (1895) : L. Dtsch. 2. Tiermed 21, 438. Cited. by Hagan, W.A. and Bruner, D.W. The infectious Disease of Domestic Animals; Ithaca, New York, (1961): 416-431.
- 14 — KOPECKY, K.E. (1973) : Distrubution of bovine paratuberculosis in the united states; JAVMA 162; 787-788.
- 15 — LARSEN, A.B., VARDAMAN, T.H., MERKAL, R.S. (1963) : An extended study of a herd of cattle Naturally infected with Johne's disease. II-The significance of the complement, fixation tests. Amer. J. Vet. Res. 24, 948-950.

- 16 — LARSEN, A.B., VARDAMAN, T.H. and MERKAL, R.S. (1965) : En extended study of Herd of cattle Naturally infected with Johne's Disease: The Significance of the Hemagglutination Test; Amer. J. Vet. Res., 26, 111, 254-257.
- 17 — LARSEN, A.B., MERKAL, R.S. (1968) : The effect of managment on the incidanse of ciinical Johne's disease. J. AVMA, 152, 1771-1773.
- 18 — MC. QUEEN, D.S. (1959) : Johne disease with particular reference to diagnosis (a) field aspects; Austr. Vet. oJur. 47-52.
- 19 — MERKAL, R.S. (1984) : Paratuberculosis: Advanced in cultural, serologic, and vaccination methods. JAVMA 184, 8, 939-943.
- 20 — RICE, C.E., KONST, H., CARIERE, J. (1961) : Studies of Johne's disease in Canada X. A more sensitive complement-fixation test; Vet. Bull. 626.
- 21 — RINGDAL, G. (1960) : Diagnosis of Johne's disease in cattle, Nord. Vet. Med. 12, 513-531.
- 22 — RINGDAL, G. (1965) : Studies on Johne's disease in a single herd during a five year period; Nor. Vet. Med. 17, 411.
- 23 — SEZGINER, F.R. (1928) : Ehli hayvanlarda intani hastalıklar, Hilal Matbaası, İstanbul, 252-259.
- 24 — STUART, P. (1962) : The Diagnosis of Johne disease in cattle and the effect of vaccination on tuberculin and Johnin tests. Bull. Off. Int. Epiz. 58, 33-50.
- 25 — TWORD, F.W., INGRAM, G.L.W. (1912) : Proc. royal society. Serios. B. 84, 517. Cited. by central Veterinary Lab. Weybridge. Johne disease in Bovines. Org. Eur. Ec. Coop. Paris Project (1956) 207, 27.
- 26 — WITHERS, F.W. (1959) II. incidence of the disease. Vet. Rec. 71. 1150-1153.
- 27 — YILMAZ, S. (1966) : Sığırların paratüberküloz hastalığının teşhisinde mikro-komplement fikzasyon testi ile yapılan serolojik araştırmalar. Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg. 3, 1-2.
- 28 — ZIMMERMAN, T., WESTPHAL, W. (1964) : Age of cattle in relation to apuereance of complement fixin antibodies against paratuberculosis antigen. Vet. Bull. 34, 478.