

# SIĞIR TÜBERKÜLOZUNUN TEŞHİSİNDE KULLANILAN GAMMA İNTERFERON TESTİ İLE ELISA'NIN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRMESİ\*

## "The Comparison of the ELISA and the gamma-interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis"

Erhan AKÇAY\*\* Müjgan İzgür\*\*\*

### ÖZET

Bu çalışmada, tüberkülin testi ile periyodik kontrolleri yapılan 536 adet ve test edilmeyen kontrolsüz 210 adet hayvandan kan örnekleri toplanarak önce ELISA'da değerlendirilmiştir. ELISA'da örneklerin 582'si (%78) negatif, 164'ü (%22) pozitif bulunmuştur. Kontrollü hayvanlarda 57 (%11) pozitif, 479 (%89) negatif, kontrolsüz hayvanlarda 107 (%51) pozitif, 103 (%49) negatif sonuç saptanmıştır. Kontrollü hayvanlarda negatif bulunan 75 adet örnek ile kontrolsüz hayvanlarda pozitif bulunan 75 adet örnek  $\gamma$ -IFN testinde kullanılmıştır.  $\gamma$ -IFN testinde kontrolsüz hayvanlardan seçilen örneklerin 42'si (%56) pozitif, 33'ü (%44) negatif, kontrollü hayvanlardan seçilen örneklerin 61'i (%81.3) negatif, 14'ü (%18.7) pozitif sonuç vermiştir.

Her iki testten elde edilen sonuçların iki kare ( $\chi^2$ ) yöntemi ile istatistiksel değerlendirilmelerinde, pozitif sonuçlar arasındaki farkın ( $p < 0.001$ ) önemli, negatif sonuçlar arasındaki farkın ( $p > 0.05$ ) önemsiz ve test sonuçlarının ortak değerlendirilmelerinde ise testler arasındaki farkın ( $p < 0.01$ ) önemli olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Sığır, Tüberküloz, ELISA,  $\gamma$ -IFN testi.

### SUMMARY

In the present study, the blood samples from 536 animals, checked with tuberculin each year and the samples from 210 animals which have never been checked with tuberculin have been tested with ELISA. As a result 582 of them (78%) have resulted in negative and 164 of them (22%) have resulted in positive. In the group of checked animals there were 57 (11%) positive and 479 (89%) negative samples and in the group of unchecked animals there were 107 (51%) positive and 103 (49%) negative samples. 75 samples from checked animals, resulted in negative in ELISA and 75 samples, chosen from the unchecked animals, resulted in positive have been tested with  $\gamma$ -IFN assay. 42 of the unchecked samples (56%) have given positive and 33 (44%) of them negative, 61 of the checked samples (81.3%) have given negative and 14 of them (18.7%) have given positive results.

The difference between the positive results ( $p < 0.001$ ) is important, between the negative results ( $p > 0.05$ ) is unimportant and the difference between the evaluation of the results of the tests ( $p < 0.01$ ) is important.

**Key Words:** Cattle, Tuberculosis, ELISA,  $\gamma$ -IFN assay.

### 1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), Mycobacterium cinsine bağlı türlerin neden olduğu dünyada yaygın zoonotik karakterli kronik, öldürücü infeksiyöz bir hastalıktır. Hastalık halk sağlığı için en büyük problemlerden birisidir (32). Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre

her yıl yaklaşık 3 milyon ölüm ve 8 milyon yeni tüberküloz olayı ortaya çıkmaktadır (41,42).

Tüberküloz, insan ve hayvanlar için bilinen en eski hastalıklardan biridir. İlk çağlardaki yazıtlar, hastalığın insanlığın sosyal gruplar halinde yaşamaya başlamasından itibaren varlığını sürdürdüğünü bildirmektedir. Eski Mozaik tabletlerinde, hayvan karkaslarında pleura ve akciğerler arasında yapışmaların olduğu yazılmaktadır (43). Robert Koch

**Kabul Tarihi:** 08.11.2002

\* Aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

\*\* Etlik Merkez Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü /ANKARA

\*\*\* A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı/ANKARA

1882'de tüberküloz basili keşfederek deneysel olarak çalışmaya başlamış, 24 Mart 1882'de tüberküloz basilinin bulunuşunu bilim dünyasına duyurmuştur (43).

Türkiye'de tüberkülozun varlığı 1900'lü yıllarda araştırılmaya başlanmıştır (14, 37, 46). Tüberküloz, hayvanlar arasında en çok sığırlarda görülür. Bunun dışında domuz, kedi, köpek, koyun, keçi, at ve kanatlılar gibi evcil hayvanlarla bir çok yabancı hayvan da enfeksiyona duyarlıdır (1,5,16,22,25,35).

Sığır tüberkülozunun etkeni *Mycobacterium (M) bovis*'tir. Etken Mycobacteriaceae familyasında tek cins olan *Mycobacterium* cinsinde yer almaktadır (2,19,38).

Günümüzde tüberkülozun teşhisi için; tüberkülin deri testi, Fleuresan Antikor Tekniği, Radio-İmmuno Assay (RAI), ELISA, GIFT ( $\gamma$ -IFN testi), lenfosit proliferasyon testi (LPA), PCR, kromotografi ,faj tiplendirme ve DNA fingerprint gibi testler kullanılmaktadır (7,9,28,29). Tüberkülin testi birçok ülke için hastalığın eradikasyonunda önemli rol oynamaktadır (40). Tüberkülin testi enfekte hayvanların %80'inde başarı sağlarken stres altındaki hayvanlarda ve bireysel farklılıklarda hastalığı saptamada %60'dan daha düşük bir başarı gösterebilmektedir (12,39). Tüberkülin testi yapılan hayvanların %15'i yanlış negatif, %2-5'i yanlış pozitif sonuç vermektedir (12). Bu nedenler tüberkülozun teşhisinde ek veya alternatif diagnostik testlere gerek duyulduğunu göstermektedir (6). Tüberkülozlu hastalarda ELISA tekniğini, ilk kez 1976 yılında Nassau ve ark. antijen olarak *M. tuberculosis* H37Rv suşunun kültür filtratını kullanarak uygulamışlardır (8). Yapılan çalışmalar ELISA 'nın %90 spesifiteye, %70-89.8 arasında sensitiviteye sahip olduğu göstermektedir (3,4,10,11,13,15,18). Ayrıca araştırmalar ELISA'nın tüberkülozun teşhisinde tek başına olmasa bile kullanılabilceğini göstermektedir (15,17,21,30,31).

$\gamma$ -IFN testi *M. bovis*'le enfekte sığırlarda hızlı ve güvenilir sensitivitesi yüksek bir test olarak kabul edilmektedir (26,33,34). Bu test ile kanda

25 pg/ml'den daha düşük düzeylerde rekombinant sığır  $\gamma$ -IFN'lerinin ölçülebileceği, testin sığırlarla birlikte koyun ,keçi ve buffalolarda kullanılabileceği de bildirilmektedirler (23,34,40,44,45). Kanda sıfır düzeyinde ve stabil olan  $\gamma$ -IFN yalnızca enfeksiyon durumunda T lenfositlerince salgılanabilmektedir. Bu test sisteminde kan PPD antijenleri ile önce duyarlılaştırılarak ölçülebilir düzeyde  $\gamma$ -IFN salgılanması sağlanır , sonra plazma alınarak bir enzim immunoassay yardımıyla  $\gamma$ -IFN'a karşı monoklonal antikorlarla kaplı pleytlerde  $\gamma$ -IFN düzeyleri saptanır (20,33). Bilinen lenfosit proliferasyonuna dayanan çalışmalara göre ,  $\gamma$ -IFN test sisteminin spesifik hücrel immunitiyi ölçmede diğer testlere göre daha seri ve duyarlı olduğu bilinmektedir (26,34,36,39,44).

Bu çalışmada, Türkiye'de periyodik tüberküloz kontrolleri yapılan işletmelerden seçilen örnekler ve geçmişte tüberkülozla enfekte olmuş ahırlardan seçilen örnekler kullanılarak sığır tüberkülozunun serolojik teşhisinde ELISA'nın duyarlılığının  $\gamma$ -IFN testi ile karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller

Sığır tüberkülozunun serolojik teşhisi amacıyla; ELISA ve  $\gamma$ -IFN testlerinde kullanılan kan örnekleri Tarım İşletmelerine bağlı 3 çiftlikten (A,B,C) ve Ankara çevresindeki 2 köyden (D,E) tüberküloz belirtileri göstermeyen 2 yaş üstü hayvanlardan seçilmiştir. Toplam 746 örnek temin edilmiştir. Bu örneklerin 150'si (ELISA sonuçlarına göre 75 pozitif ve 75 negatif)  $\gamma$ -IFN testinde kullanılmıştır.

### 2.2. ELISA

ELISA, Ritacco ve ark.'nın (31), bildirdikleri yöntemle göre yapılmıştır. Önce testte kullanılacak serum, antijen ve konjugatın titrasyonları yapılarak test için gerekli uygun antijen ,serum ve konjugat değerleri tespit edilmiştir.

### 2.3. GIFT ( $\gamma$ -IFN testi)

$\gamma$ -IFN testinde kullanılan 150 örneklilik kit



materyali CSL şirketinden (CSL limited, 45 Poplar Road, Parkville 3052, Victoria, Avustralya) temin edilmiştir. Test Rothel ve ark.'nın (34), bildirdiği yöntemle yapılmıştır.

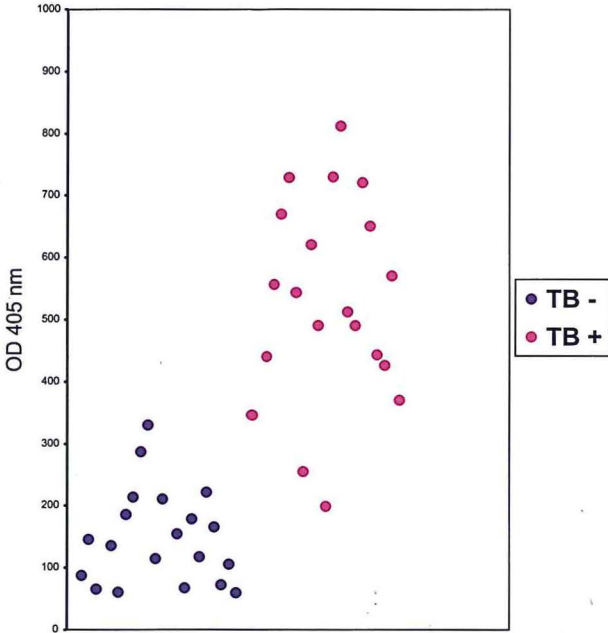
#### 2.4. İstatistiksel Analizler

ELISA ile  $\gamma$ -IFN testlerinden elde edilen sonuçların karşılaştırılmasında  $\chi^2$  yöntemi kullanılmıştır (24).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Negatiflik kriterlerinin belirlenmesi

20 pozitif ve 20 negatif kontrol serumları ile yapılan çalışmalarda, ELISA için negatif ve pozitif ayrımının yapılabilirdiği en uygun serum sulandırma değerinin 1/200 olduğu saptanmıştır. (Şekil 3.1.). Testte tüberküloz negatif serumların OD değerleri ortalaması  $0.148 \pm 0.017$  olarak hesaplanmıştır. Bu ortalama değere 2SD değeri eklenerek ( $0.148 \pm 0.153$ ) ayırım değeri (cut-off) saptanmıştır. Cut-off = 301 olarak bulunmuştur. Bu değer üstünde OD değerine sahip örnekler ELISA'da pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. ELISA'da kontrol negatif ve pozitif serumların OD'leri

#### 3.2 ELISA sonuçları

Toplanan 746 serum örneği ELISA'da değerlendirilmiştir. Saptanan Cut-off değerlerine göre serumların negatif veya pozitif olarak ayrılması her

pleyt için ayrı yapılmıştır. ELISA'da örneklerin 164'ü (%22) pozitif, 582'si (%78) negatif bulunmuştur. ELISA'da kontrollü hayvanlardan seçilen örneklerden (A,B,C) 57'si (%11) pozitif, kontrolsüz hayvanlarda ise 107'si (%51) pozitif sonuç vermiştir. Kontrolsüz hayvanlarda 103 (%49) negatif sonuç bulunurken, kontrollü hayvanlarda 479 (%89) negatif sonuç saptanmıştır.

#### 3.3. $\gamma$ -IFN testi sonuçları

ELISA 'da 75 pozitif ve 75 negatif sonuç veren örneklerden (Çizelge 3.1.),  $\gamma$ -IFN testinde D ve E'den seçilen örneklerde 42 (%56) pozitif, 33 (%44) negatif, A,B ve C'den seçilen örneklerde 61 (%81.4) negatif, 14 (%18.6) pozitif sonuç bulunmuştur (Şekil 3.4.). Örneklerin, testte toplam olarak 56'sının (%37.3) pozitif, 94'ünün (%62.7) negatif sonuç verdiği saptanmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.1. ELISA sonuçlarına göre  $\gamma$ -IFN testinde kullanılan örneklerin işletme ve köylere göre dağılımı

Kaynak	ELISA Pozitif	ELISA Negatif
İşletme	A	-
	B	-
	C	-
Köy	D	44
	E	31
<b>Toplam</b>	<b>75</b>	<b>75</b>

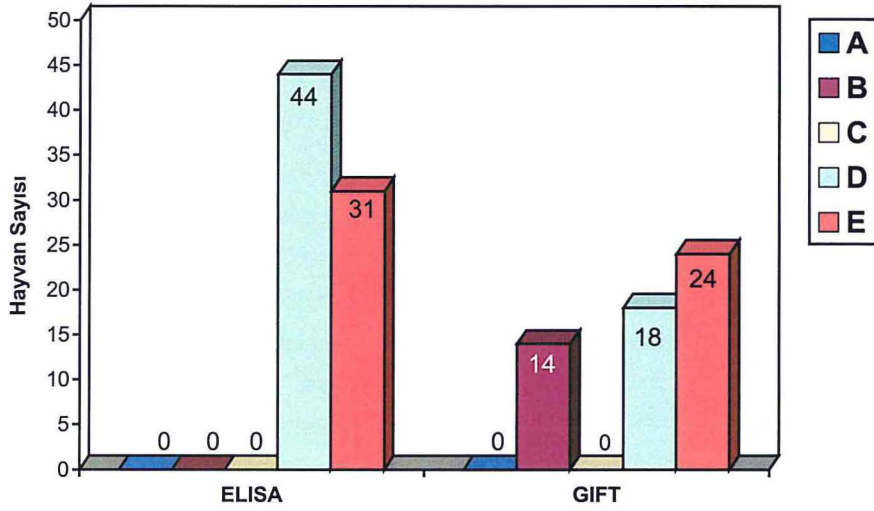
Çizelge 3.2.  $\gamma$ -IFN testi sonuçlarının kaynaklara göre dağılımları

Kaynak	Pozitif	Negatif
İşletme	A	14 (%19)
	B	29 (%39)
	C	18 (%24)
Köy	D	26 (%35)
	E	7 (%9)
<b>Toplam</b>	<b>56 (%37.3)</b>	<b>94 (%62.7)</b>

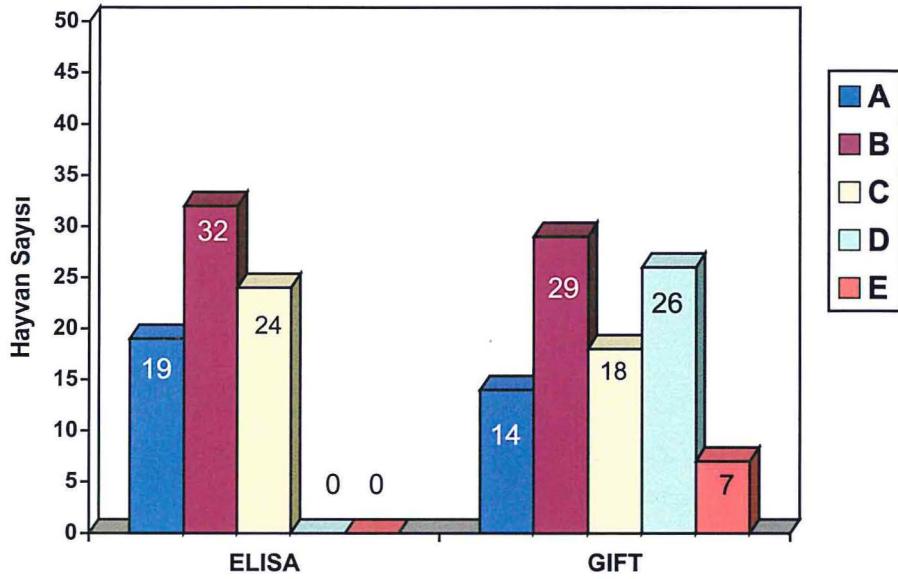
#### 3.4. ELISA ve $\gamma$ -IFN testlerinin sonuçlarının karşılaştırılması

ELISA 'da pozitif bulunan 75 örneğin  $\gamma$ -IFN testinde 42'si (%56) pozitif, 33'ü (%44) negatif bulunmuştur. (Şekil 3.5.). ELISA'da negatif bulunan 75 örnek,  $\gamma$ -IFN testinde 61'i (%88) negatif, 14'ü

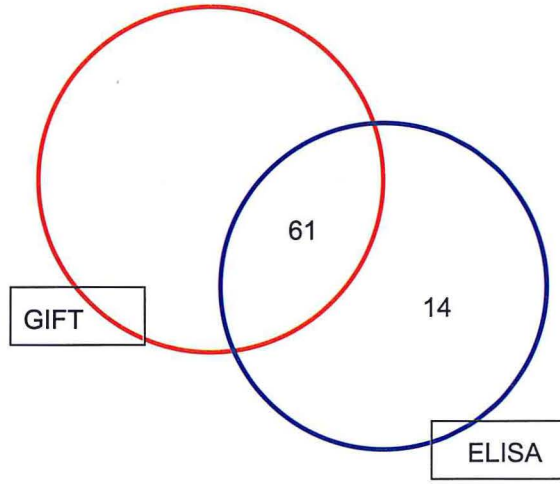
(%18) pozitif bulunmuştur. (Şekil 3.4.). Her iki testte kaynaklara göre pozitif sonuçların karşılaştırmaları Şekil 3.2.'de, negatif sonuçların karşılaştırmaları Şekil 3.3.'de verilmiştir .



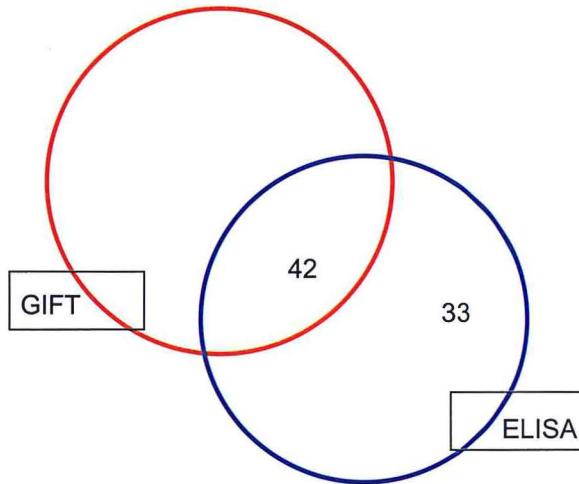
Şekil 3.2. -ELISA ve GIFT'te pozitif örneklerin kaynaklara göre karşılaştırmaları.



Şekil 3.3. -ELISA ve GIFT'te negatif örneklerin kaynaklara göre karşılaştırmaları.



Şekil 3.4. -ELISA 'da negatif bulunan örneklerin GIFT ile karşılaştırılmaları



Şekil 3.5. -ELISA 'da pozitif bulunan örneklerin GIFT ile karşılaştırılmaları



### 3.4. İstatistiksel Analizlerin Sonuçları

Her iki testten elde edilen sonuçlar  $\chi^2$  metodu ile karşılaştırılmıştır. Pozitif örneklerde  $\chi^2=11.38$ , negatif örneklerde  $\chi^2=2.88$  ve testlerin genel sonuçlarının değerlendirilmesinde  $\chi^2=4.9$  olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel yöntemle göre pozitif sonuçlar arasındaki fark ( $p<0.001$ ) önemli, negatif sonuçlar arasındaki fark ( $p>0.05$ ) önemsiz ve test sonuçlarının ortak değerlendirilmesinde testler arasında fark ( $p<0.01$ ) önemli bulunmuştur.

### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır tüberkülozunun tanısı ve kontrolü en önemli güncel problemlerden birisidir. Organizmanın canlıda meydana getirdiği immün yanıtın karmaşıklığı hastalığın tanısını ve dolayısıyla eradikasyonunu da zorlaştırmaktadır (6).

Bu çalışmada kontrollü ve kontrolsüz hayvanlardan toplanan örnekler  $\gamma$ -IFN testi ve ELISA ile test edilmiştir. ELISA'da test edilen örneklerin 582'si (%78) negatif, 164'ü (%22) pozitif bulunmuştur. ELISA'da kontrollü hayvanlardan seçilen örneklerden (A,B,C) 57'si (%11), kontrolsüz hayvanlardan seçilen örneklerden 107'si (%51) pozitif sonuç vermiştir. Kontrolsüz hayvanlarda 103 (%49) negatif sonuç bulunurken, kontrollü hayvanlarda 479 (%89) negatif sonuç saptanmıştır. Kontrollü hayvanlarda saptanan negatif sonuçlar (%89) seçilen yöntemle uygulanan ELISA'nın spesifitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar tüberkülinle kontrolleri yapılan sürülerde, ELISA'nın tüberküloz negatif hayvanların belirlenmesinde kullanılabilceğini göstermektedir. Kontrolsüz hayvanlardaki örneklerin ELISA ile değerlendirilmesinden elde edilen sonuçlara göre (%51pozitif, %49 negatif) bu tip sürülerde hastalığın tanısı için ELISA'yla birlikte ek bir teste daha gerek duyulmaktadır.

Çalışmada ELISA'da kontrolsüz hayvanlarda (D,E) pozitif bulunan 75 adet örnekle yapılan  $\gamma$ -IFN testinde örneklerin 42'si (%56) pozitif, 33'ü (%44) negatif sonuç vermiştir. Her iki testin  $\chi^2$  yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmesinde fark ( $p<0.001$ ) önemli bulunmuştur.

ELISA'da kontrollü hayvanlarda negatif bulunan 75 örneğin  $\gamma$ -IFN testinde 61'i (%81.3) negatif, 14'ü (%18.7) pozitif sonuç vermiştir. Her iki testin  $\chi^2$  yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmesinde fark ( $p>0.05$ ) önemsiz bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, tüberküline göre  $\gamma$ -IFN testinin duyarlılığının yüksek olduğunu bildiren araştırmacılarla (26) paralellik göstermektedir. ELISA'da negatif bulunan 14 örneğin,  $\gamma$ -IFN testinde pozitif bulunması, infekte hayvanlarda antikor yanıtının düşük olduğu durumlarda hücresel yanıtın saptanabilmesi olarak açıklanabilmektedir. Elde edilen bu sonuçlar, *M. bovis* infeksiyonlarında hücresel yanıtın önem kazandığını bildiren araştırmacılarla (18,28,30) paralellik göstermektedir. ELISA'da saptanamayan pozitifliklerin test edilen hayvanlarda humoral antikorların henüz oluşmaması, hastalığın ilk evreleri veya subklinik dönemi nedeniyle olduğu sanılmaktadır. Tüberkülin testinde negatif bulunan B işletmesinden seçilen hayvanlardan (32 adet) 14'ünün  $\gamma$ -IFN'de pozitif bulunması tüberkülin testinin de diğer ek tanı metotları ile desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu çalışmada sığır tüberkülozunun teşhisinde, humoral antikor yanıtının ELISA ile ölçülmesi, hücresel immün yanıtın  $\gamma$ -IFN testi ile belirlenmesi esas alınmıştır. Mikobakteriyel infeksiyonlarda hücresel yanıtın çabuk gelişimi, humoral antikorların saptanabilmesi için daha uzun sürelerle gerek duyulması nedeniyle ELISA'da bulunamayan pozitiflikler  $\gamma$ -IFN testinde kolayca saptanabilmektedir (33). Neil ve ark. (27), infekte 98 hayvanın hepsini (%100)  $\gamma$ -IFN testinde pozitif bulmuştur. Bu çalışmada sonuçların değerlendirmeleri  $\gamma$ -IFN testinin duyarlılığının yüksek olduğunu bildiren araştırmacılara (27,44) paralellik göstermektedir.

Her iki test genel olarak karşılaştırıldığında ELISA'da 75 pozitif ve 75 negatife karşılık  $\gamma$ -IFN testinde sırasıyla 56 pozitif ve 94 negatif sonuç bulunmuştur.  $\chi^2$  testi yapılarak iki testin karşılaştırılmasından elde edilen fark ( $p<0.01$ ) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ELISA sonuçlarının  $\gamma$ -IFN testi sonuçları ile karşılaştırıldığında pozitiflikleri saptamada %56



(42/75), negatifleri saptamada %81.3 (61/75) başarılı olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar,  $\gamma$ -IFN testine göre pozitifleri saptamada düşük yüzdesi (%56) nedeniyle ELISA'nın tek başına sığır tüberkülozunun tanı ve kontrolünde kullanılamayacağını göstermektedir. Her iki testin maliyetleri göz önüne alındığında  $\gamma$ -IFN testinin ELISA'ya göre en az on katı pahalı olduğu görülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, periyodik tüberkülin testi uygulanan ve tüberküloz negatif hayvanlardan alınan örneklerle yapılan ELISA'dan elde edilen sonuçlarla  $\gamma$ -IFN sonuçlarının paralel; kontrolsüz hayvanlardan seçilen örneklerde ise her iki test sonuçlarının farklı olduğunu göstermektedir.  $\gamma$ -IFN testinin sensitivitesinin yüksek olduğunu bildiren araştırmalar göz önüne alındığında bu çalışmadan çıkan sonuçlar ELISA'nın pozitif olguları saptamada yetersiz olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte  $\gamma$ -IFN testinin ELISA'ya göre pozitif hayvanları saptamada daha uygun, ancak maliyetinin yüksek olduğu da görülmektedir. Her iki testin gerek maliyet gerekse duyarlılıkları gözönüne alındığında bugün için sığır tüberkülozunun tanısında tek başlarına kullanılamayacakları anlaşılmaktadır. Özellikle tüberküloz eradikasyonunun sınırlı yapıldığı ülkelerde ELISA'nın pozitif olguları saptamadaki düşük duyarlılığı nedeniyle, tüberküloz olgularının belirlenmesinde yalnız başına kullanılmasının uygun olmadığını göstermektedir. ELISA'nın düşük maliyeti, sığır tüberkülozu ile ilgili yapılacak epidemiyolojik çalışmalara uygundur. Yüksek sensitiviteye sahip  $\gamma$ -IFN testinin maliyetinin yüksekliği bugün sığır tüberkülozunun tanısında yaygın olarak kullanımını azaltsa bile, test maliyetlerinde düşmeler ve test performansı/maliyet oranını düşünmeyecek işletmelere önerilebilir.

### Teşekkür

Bu çalışmadaki yardımlarından dolayı A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

### KAYNAKLAR

1. AKAY Ö, AYDIN N, ARDA, M, HAZIROĞLU, R (1984). *Bir mink'te saptanan tüberküloz üzerinde araştırma*. A Ü Vet Fak Derg, 3, 463-470.
2. ARDA M, MİNBAY A, LELOĞLU N, AYDIN N, AKAY Ö (1992). *Özel Mikrobiyoloji*. Atatürk Üniv Yay, 741, 279-3311.
3. AUER LA (1987). *Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with Mycobacterium bovis*. Aust Vet J, 64, 172-176
4. AUER LA, SCHLEEHAUF SM (1988). *Antibodies to Mycobacteria in cattle not infected with Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol, 18, 51-61.
5. BARLOW AM, MITCHELL KA, VISRAM KH (1999). *Bovine tuberculosis in Llama (Lama glama) in the UK*. Vet Rec, 145, 639-640.
6. BOURNE J, DONNELLY CA, COX DR, GETINBY G, MCINERNEY JP, MORRISON I, WOODROFFE R (2000). *Bovine tuberculosis: towards a future control strategy*. Vet Rec, 146, 207-210.
7. COLLINS DM, ERASMUSON SK, STEPHENS DM, YATES FG, DE LISLE GW (1993). *DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110*. J Clin Microbiol, 31, 1143-1147.
8. DANIEL TM, DEBANNE SM (1987). *The serodiagnosis of Tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay*. Am Rev Respir Dis, 135, 1137-1151.
9. DEL PORTILLO P, MURILLO LA, PATARROYO ME (1991). *Amplification of a species-specific DNA fragment of Mycobacterium tuberculosis and its possible use in diagnosis*. J Clin Microbiol, 29, 2163-2168.
10. DOWLING LA, SCHLEEHAUF SM (1991). *Specific antibody responses to Mycobacterium bovis in infected cattle analysed with six Mycobacterial Antigens in enzyme-linked immunosorbent assays*. Res Vet Sci, 50, 157-161.
11. FOURNIE JJ, MULLINS RJ, BASTEN B (1990). *Isolation and structural characteristic of a monoclonal antibody-defined cross-reactive phospholipid antigen from Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae*. J Biol Chem, 266, 1211-1219.



12. FRANCIS JS, SEITER RJ, WILKIE IW, O'DOYLE D, LUMSDEN MJ, FROST AJ (1978). *The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculin*. Vet Rec, 103,420-425.
13. GABORICK CM, SALMAN MD, ELLIS RP, TRIANTIS J (1996). *Evaluation of a five-antigen ELISA for diagnosis of tuberculosis in cattle and Cervidae*. JAVMA, 209, 962-966.
14. GOLEM, B (1941). *Memleketimizde sığır tüberkülozunun vaziyeti ve sığır tüberkülozunun insan için olan tehlikesi*. Vet Hek Dern Derg, 11, 28-38.
15. GRIFFIN JFT, CROSS JP, CHINN DN, RODGERS CR, BUCHAN GS (1994). *Diagnosis of tuberculosis due to Mycobacterium bovis in New Zealand red deer (Cervus elaphus). using a composite blood test and antibody assays*. N Zealand Vet J, 42, 173-179.
16. GRIFFITH AS, TYTLER WH, CUMMIS SL, MCINTOS J, WHITBY LEH, BILLOCH W, FLEMING A, OKELL CC, GLOYNE SR (1930). *Bacillus Tuberculosis In: A System of Bacteriology in Relation to Medicine*. Majesty's Stationery Office, London, p:151-325.
17. HANNA J, NEILL SD, O'BRIEN JJ (1992). *ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis*. Vet Microbiol, 31, 243-249.
18. HARBOE M, WIKER HG, DUNCAN JR, GARCIA MM, DUKES TW, BROOKS BW, TURCOTTE C, NAGAI S (1990). *Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis*. J Clin Microbiol, 28, 913-921.
19. HOLT JG, KRIEG NR, SNEAT PHA, STALEY JT, WILLIAMS S T (1994). *The Mycobacteria In: Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology 9th Ed.*, Williams&Wilkins, Baltimore, p: 597-603.
20. JONES SL, COX JC, SHEPHERD JM, ROTHEL JS, WOOD PR, RADFORD AJ (1992). *Removal of false-positive reaction from plasma in an enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$* . J Immunol Methods, 155, 233-240.
21. KESKİN O, İZGÜR M (1996). *Sığır tüberkülozunun teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve allerjik yöntemle karşılaştırılması*. I Uluslararası Veteriner Mikrobiol Kong özet kitabı, s: 92.
22. LEIFSSON PS, OLSEN SN, LARSEN S (1997). *Ocular tuberculosis in a horse*. Vet Rec, 141, 651-654.
23. LILENBAUM W, SCHETTINI JC, SOUZA GN, RIBEIRO ER, MOREIRA EC, FONSECA LS (1999). *Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil*. Zentr Vet, 46, 353-358.
24. MARTIN SW, MEEK AH, WILLEBERG P (1987). *Measurement of disease frequency and production* Chapı3 In: *Veterinary Epidemiology Principles and Methods* first Ed., Iowa State Univ Press, Ames, Iowa.
25. MONIES RJ, CRANWELL MP, PALMER N, INWALD J, HEWINSON RG, RULE B (2000). *Bovine tuberculosis in domestic cattle*. Vet Rec, 146, 407-408.
26. MORRISON WI, BOURNE FJ, COX DR, DONNELLY CA, GETINBY G, MCINERNEY JP WOODROFFE, R (2000). *Pathogenesis and diagnosis of infection with Mycobacterium bovis in cattle*. Vet Rec 146, 236-242.
27. NEILL SD, HANNA J, POLLOCK J, MACKIE DP, CASSIDY J, CLEMENTS A, BRYSON DG (1994). *The diagnosis of bovine tuberculosis by blood testing*. Vet. Microbiol., 40, 1-7.
28. PLACKETT P, RIPPER J, CORNER LA, SMALL K, DEWITTE K, MELVILLE L, HIDES S, WOOD PR (1989). *An ELISA for the detection of anergic tuberculosis cattle*. Aust Vet J, 66, 15-16.
29. PLIKAYTIS BB, EISENACH KD, CRAWFORD JT, SHINICK TM (1991). *Differentiation of Mycobacterium bovis BCG by a polymerase chain reaction assay*. Mol Cell Prob, 5, 215-219.
30. RITACCO V, LOPES B, BARRERA L, NADER A, FLIES E, DE KANTOR IN (1990). *Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis*. J Vet Med, 37, 19-27.
31. RITACCO V, DE KANTOR IN, BARRERA L, NADER A, BERNARDELLI A, TORREA G, ERRICO F, FLIES E (1987). *Assessment of the sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). for the detection mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis*. J Vet Med B, 34, 119-125.



32. ROBERTS T (1986). *A retrospective assessment of human health protection benefits from removal of tuberculous beef*. J Food Protect, 49, 293-298.
33. ROTHEL JS, JONES SL, CORNER LA, COX JC, WOOD PR (1992). *The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture*. Aust Vet J, 69, 1-4.
34. ROTHEL JS, JONES SL, CORNER LA, COX JC, WOOD PR (1990). *A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle*. Aust Vet J, 67, 134-137.
35. SEVCIKOVA Z, LEDECKY V, CAPIK I, LEVKUT M (1999). *Unusual manifestation of tuberculosis in an ostrich (Struthio camelus)*. Vet Rec, 145, 708.
36. STREETON JA, DESEM N, JONES SL (1998). *Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection*. Int J Tuberc Lung Dis, 2, 443-450.
37. TEKİN N, RAFYİ A (1971). *Hayvan tüberkülozu. Gelişmekte olan ülkelerde tüberküloz sorunlarının özellikle ortaya konması ve tetkiki*. Bornova Vet Araşt Enst Derg 22, 36-87.
38. WAYNE LG, KUBICA GP (1986). *The Mycobacteria In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams&Wilkins, Baltimore, p:1435-1457.
39. WAYNE R (1989). *A new test for TB*. Rural Res, 144, 4-8.
40. WHIPPLE DL, BOLIN CA, DAVIS AJ, JARNAGIN JJ, JOHNSON DC, NABORS RS, PAYEUR JB, SAARI DA, WILSON AJ, WOLF MM (1995). *Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial  $\gamma$ -interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis*. Am J Res, 56, 415-419.
41. WHO (1998). *TB a crossroads, Report on the global tuberculosis epidemic*. Geneva, 2-25.
42. WHO (1992). *Report of the WHO working group meeting on animal tuberculosis*. Cairo, Egypt, 2-24.
43. WIGHT AE, LASH E, O'REAR CRAWFORD AB (1942). *Tuberculosis and Its eradication In: Yearbook of agriculture, US Gov Print Of, p: 237-249*.
44. WOOD PR, CORNER LA, ROTHEL RIPPER JL, FIFIS T, MC CORMICK, FRANCIS B, MELVILLE L, SMALL K, BS De WITTE K, TOLSON J, RYAN TJ, De LISLE GW, COX JC, JONES SL (1992). *A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis*. Vet Microbiol, 31, 71-79.
45. WOOD PR, CORNER LA, PLACKETT P (1990). *Development of a simple rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of  $\gamma$ interferon*. Res Vet Sci, 49, 46-49.
46. YEŞİLADA Y (1966). *Tüberküloz*. Bornova Vet Araşt Enst Derg, 7, 5-14.