

PARATUBERKÜLOSİS'İN SEROLOJİK TEŞHİSİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Mes'adet DOĞUER (*)

Ö N S Ö Z

Paratuberkülosis, ince barsak mucozasının kalınlaşması ve mesenterial lenf bezlerinin büyümesiyle müterafık, Acide-fast karakterli spesifik bir basilden ileri gelen, çift tırnaklıların kronik tabiatında bulaşıcı bir barsak iltihabıdır. Almanya'da ilk defa bulunduğu tarihtenberi geçen 75 yıl içinde dünyanın hemen her tarafında görülen bu hastalık memleketimizde 1928 yılındanberi münferit vak'alar halinde seyrederken 1957'de Çukurova harasında yaygın bir hale gelmesiyle bizde de önem kazanmış olup, o zamana kadar henüz lâboratuvarlarımızda rutin muayeneler arasına dahil edilmemiş olmasına sebebiyle mezkûr haraya ait sığır serumları İngiltere'deki Weybridge Veteriner Enstitüsüne gönderilmiş ve oradan getirtilen Johnin allergeniyle sığırlar allerjik testlere tâbi tutularak takriben % 20 nisbetinde müsbet vak'a tesbit edilmiş, aynı haranın buzağılarındaki ilk vaksinasyon denemelerinde de aynı orijinli aşı tatbik edilmiş, bunu müteakip, enstitümüz Tüberküloz laboratuvarında F. Demirer (4) tarafından istihsal edilmekte olan yerli Paratuberküloz aşısı ve PPD Johnin kullanılmıştır.

Memleketimizde bu hastalığın serolojik teşhisi üzerindeki ilk çalışmalar Etlik Vet. Enstüsünde S. Yılmaz tarafından 1959 yılında Mikro-Komplement fixasyon testiyle başlamış, hastalığın oldukça yaygın bir halde olduğu anlaşılmış ve o vakte kadarki durum Doğuer ve Yılmaz (5) tarafından bildirilmiştir. Müteakip yıllar içinde müessesemizde bu hususta iki geniş araştırma S. Yılmaz ve N. Emre tarafından yapılmış ve birbirini tâkiben 1966, 1967 yıllarında elde edilen neticeler neşredilmiştir. Hastalığın önemi dolayısıyla Enstitümüzde hâlen N. Yücel şefliğinde müstakil bir Paratuberkülosis teşhis lâboratuvarı kurularak muhtelif yönlerden yeni araştırmalara başlanmıştır. Bu hastalık hakkında bizde bu güne kadar yapılmış olan çalışmalardan kısaca bahsettikten sonra bu yazımızda, literatür bilgisini müteakip Kopenhag Devlet Veteriner Enstitüsünde tatbik edilmekte olan Tüp-Komplement fixation

(*) Yetiştirme Hast. Lab. Şefi.

testinden, antijen hazırlama metodundan, reaktif maddelerin titrasyonlarından ve Mikro-metodla Tüpte yapılan testin mukayescesinden bahsedilecektir. Gayemiz diğer müesseselerde çalışan meslektaşlarımızın bu testi tatbik etmeleri, bölgevi araştırmalar yapabilmeleridir. Yazıda imâl tarzından mufassalan bahsedilmiş olan antijeni hazırlayınca kadar bu konuda çalışmak isteyen meslektaşlarımıza arzu edildiği takdirde, Paratuberküloz ve Avian antijenlerinden gönderilebileceğini de bu arada bildirmek isteriz.

LİTERATÜR BİLGİSİ

JOHNE basili, ilk defa Almanya'da 1859 yılında JOHNE ve FROTHINGHAM tarafından chronic diare tesbit edilen bir hasta inekten ayrılmışsa da Kuş tipi tuberküloz zannedilmiş, 1906 yılında ise BANG bunun farklı bir hastalık olduğunu bildirmiş ve enfekte barsak mukozasını sağlam ineklere yedirerek hastalık husulünde muvaffak olmuştur. Bu hastalığın 1895 tarihinden evvel de mevcut olması fakat Avian tipinden ileri gelen Tuberkülosisle karıştırıldığından ayrı bir hastalık olarak bildirilmemiş olması araştırmacılar tarafından muhtemel görülmektedir.

KATIC (1969) Paratuberkülosis mevzuunda bütün dünyada yapılan çalışmaları coğrafik, kronolojik ve alfabetik olarak sıralayarak, bu hastalığın literatür bibliografyası hakkında geniş bilgi ihtiva eden bir kitap yayınlamıştır.

Evvelcede bahsedildiği gibi, Paratuberkülosis dünyanın hemen bütün memleketlerinde yıllardan beri mevcut olduğu bilinmekteyse de bizde 1957 yılına kadar üzerinde önemle durulmamıştır. Bu hastalığın bizde de bulunduğu ilk defa, 1928 yılında neşredilmiş olan SEZGİNER'in «Ehli hayvanlarda ihtani hastalıklar» adlı kitabından anlaşılmıştır. Bu neşriyatı müteakip AKÇAY ve ERBİL (1932) Karacabey harasına ait inek ve mandalarda mikroskopik ve histopatolojik muayenelerle Paratuberküloz vak'alarını tesbit ettiklerini, sonraki yıllar içinde de ERDÖL (1961) İstanbul mezbahasında çalışırken sığırlarda Enteritis paratuberküloza âfatına rastladığını bildirmiştir. Bu hastalık hakkında bizde son yıllara kadar yapılmış geniş bir araştırma mevcut değildir.

Partuberkülozis'in laboratuvar teşhis metodlarını mikroskopik, kültürel, allerjik ve serolojik olmak üzere dört grupta toplayabiliriz. İlk üç metod mevzu dışı olduğundan, serolojik teşhis hakkında elde edilebilen yerli ve yabancı literatür bilgisinden bahsedilecektir. Bu hastalığın serolojik teşhisinde Komplement fixation testi yarım yüzyıldanberi muhtelif memleketlerde kullanılmakta olduğu halde bizde bu test geç tatbik edilebilmiştir. Bazı araştırmacılara göre, tabii enfeksiyonlarda klinik âraz teşekkül etmeden ve serolojik reaksiyonlarla müsbet sonuç alınmadan yani hastalığın başlangıcında ekseri enfektelerin gaitalarından yapılan mikroskopik muayenelerde JOHNES basillerinin tesbit edildiği, klinik semptomların başlamasıyla paralel olarak CF titresinin de yükseldiği, allerjik testlerin ise, hastalığın ilerlediği, patolojik lezyonların husule geldiği safhada ancak iyi çalıştığı, hastalığın son safhasında allerji testinin umumiyetle yeniden menfiye döndüğü, CF testinin allerjik testlere nazaran hastalığın erken safhasında, başlangıcındaki enfekteleri yakalayabildiği ve hastalığın nihayetine kadar değerini muhafaza ettiği, fakat Apatogen asidoresistan mycobacteriler sebebiyle, az nisbetde de olsa bazı sağlam sığırlarda Non-spesifik reaksiyonların husule geldiği bilinmektedir.

KELSER ve SCHOENING (1948) Komplement - fixation ve aglutinasyon testlerinden gayrimuntazam neticeler alındığını, HUTYRA ve arkadaşları (1949) allerjik testlere başvurulmasını, bazı araştırmacıların CF ve aglutinasyon testlerini pratik bulmadıklarını, HOLE (1953) şüpheli vak'alarda CF testinin teyid edici bir değeri olduğunu ve otopsi neticelerine göre % 94 oranında bir mutabakat tesbit edildiğini, JENSEN (1956) sığır serumlarıyla yapılan CF testinde M. Johnei'den hazırlanan homolog antijeni kullandığını, organizmaların önce pH 11.5 ve 9 derece C. da ekstraktını hazırladıktan sonra pH 4.5 da bu ekstraktı presipite ettiğini, aynı tarzda muhtelif mycobacteriel antijenler hazırladığını ve bunları da CF testiyle işlediğini, neticede bu testle M. avian tipi tuberkülozisten ileri gelen enfeksiyonların antibody - obsorption kullanılmadan tefrikinin mümkün olduğunu, Avian tiple enfekte hayvanlarda, bütün positif CF testi verenlerde Avianla, diğerlerine nazaran daha kuvvetli reaksiyonlar elde edildiğini, bu durumun M. Johnei veya Bovine tipi tuberkülozisle enfekte hayvanlarda tesbit edilemediğini fakat bu yolla Johnes hastalığı ile sığır tuberkülozunun serolojik olarak tefrikinin mümkün olmadığını, CHANDLER (1956)

Mikro - komplement fixation testini kullanarak paratuberkülozlu 20 baş sığırın kan serumlarının 19'unun bu metotla müsbet işlediğini, aynı zamanda bu serumların Hole testiyle de aynı neticeyi verdiğini, Paratuberküloz ve Tuberkülozdan âri hayvanların serumlarıyla işlendiğinde Mikro metodun % 97 oranında menfi verdiği halde Hole metodunun % 82 negatif verdiğini, yapılan denemelere göre bu testin Hole testinden daha hassas olduğunu ve ona nazaran daha az yanlış neticeler verdiğini, bunun anti-komplementin daha iyi eliminasyonundan veya Mikro - metodun antijeninin daha spesifik olmasından ileri gelebileceğini, bu testin kolay olduğunu ve daha çabuk netice verdiğini, TOPLEY ve WILSON (1957) diferansiyal teşhisin zarurî olduğunu, bu hastalığın parazit invazyonları ve Tuberkülozis enteritisle karıştırılabileceğini, PLUM (1958) Komplement-fixation testinin Danimarkada geniş ölçüde kullanıldığını, iyi sonuç alındığını, fakat gaitadan yapılacak mikroskopik muayenelerle bu test müşterek tatbik edildiği takdirde daha emin neticeler alınabileceğini, STABLEFORTH ve GALLOWAY (1959) gaita muayenelerinin ve gaitadan yapılacak kültürün teşhisde önemi olduğunu, CF testinde kullanılmak için organizmlerin alkollü ekstraktlarının yapıldığını, aynı zamanda enfektelerin nesiclerinden de antijenler hazırlandığını, klinikman şüpheli vak'alarda bu testten doğru neticeler alındığını, post-mortem muayenelerle de testin teyid edildiğini fakat enfeksiyonun ilk safhasında faydalı olmadığını, ekseri araştırmaların 6-9'uncu aylardan sonra ancak bu testin müsbet reaksiyon verdiğinde hemfikir olduklarını, hastalığın daha ziyade pre-klinik safhadaki enfektelerle yayılması sebebiyle enfeksiyonun ilk safhasındaki hastaları meydana çıkaracak testlerin bir değeri olduğunu, RICE ve KONST (1959) intradermal olarak PPD JOHNIN zerkinden evvel ve zerki müteakip muhtelif saatlerde olmak üzere hassas kılınmış kobay ve sığırlardan kan serumu alarak CF testinde bir değişiklik husule gelip gelmediğini bir kaç çeşit antijenle mukayese ettiklerini fakat CF aktivitesinde bir değişiklik görülmediğini, ANNAU ve KONST (1959) ısıtılmamış Johne basillerinin ekstraktını alkol-eter karışığı ile presipite ettikten sonra elde ettikleri polysaccaride fraksiyonlarını CF testinde kullandıklarını ve bu antijeni bakteri suspansiyonlarından hazırlanan antijenlerden daha yüksek derecede reaktif bulduklarını, HOLE (1959) muhtelif memleketlerde CF testinden alınan neticelerde görülen tenakuzun, testin tek-

niğindeki ve okunmasındaki farklardan ileri geldiğini, bu testin her vak'ada doğruluk derecesinin % 80-82 olduğunu, McQueen (1959) bazı denemelere istinaden % 0.5 nisbetindeki fenolle preserve edilmiş serumların negatif reaksiyon vermelerine mukabil fenolle preserve edilmişlerin pozitif reaksiyon verdiğini, İngilterede Tüberkülozun sık görüldüğü sürülerde, son seneler içinde CF testinin allerjik testlerden daha fazla kullanıldığını, bu testle post-mortem muayeneler arasında iyi bir korelasyon olduğunu, umumiyetle klinik belirtilerden bir kaç ay evvel hayvanların reaktif bulduklarını, bazı vak'alarda tecrübî veya naturel efektelerin, CF testi pozitif olmadan evvel basil çıkardıklarını, efektelerin ekserisinde ise pre-klinik safhada CF testinin pozitif reaksiyon vermediğini, halbuki bu sığırların post-mortem muayenelerinde efektelerde olduklarının tesbit edildiğini, RINGDAL (1960) gaita ve rektal mukozanın mikroskopik muayenesiyle acide-fast organizmler tesbit edilen 127 sığırın % 98.4'ünün CF testiyle reaktör bulunduğunu, CF antibodilerini ihtiva eden 125 hayvanın % 69.6'sının acide-fast mikropları excre ettiklerini, 48 vak'ada M. Tüberkülozis elde edildiğini ve bunların 43'ünün kan serumlarının da pozitif bulunduğunu, serolojikman reaktör olan 165 sığırın % 26'sından yapılan kültürel muayenelerde müsbet olduğunu ve bunların % 31'inin acide-fast mikropları excre ettiğini, 44 vak'ada rectal mukozadan kültür yapıldığını, 21'inde neticenin müsbet olduğunu, bunların 16'sında kan testlerinde pozitif reaksiyon görüldüğünü, 28 baş serum reaktörünün % 57'sinden mikrop üretildiğini, Paratüberkülozis tesbit edilen 30 sürüye ait 1929 baş sığırdan kan alındığını, aynı zamanda bunların gaitalarının da muayene edildiğini % 9.5 nisbetinde CF müsbet bulunduğunu, CF testinin hastalığın başlangıcında en elverişli bir metod olarak kabul edilebileceğini, muntazam yapılacak sürü muayeneleriyle ve reaktörlerin sür'atle uzaklaştırılmasıyla klinik vak'aların azaltılabileceğini, ERTÜRK (1960) Paratüberküloz'un emin şekilde teşhisinin, rektümün iç cidarlarından alınan ufak bir barsak mukozasından yapılan preparasyonların boyanarak etkenlerin görülmesiyle ve deriye tatbik edilen Johnin ile müsbet bir reaksiyon elde etmekle yapıldığını, küçük laboratuvar hayvanlarında hastalık meydana getirilemediğini, klinik semptom gösteren hayvanların umumiyetle öldüğünü, kronik bir hastalık olduğundan ekseriya hastalığın son devresinde teşhis edildiğini, NOVIKOVA (1960) Paratüberkülozis bakımından 20 bin sığır ve koyun serumunu CF testi ile işlediğini bu hay-

vanlara Avian tuberkülin de tatbik ederek mukayeseli bir araştırma yaptığını, hastalığın teşhisinde iki testin beraber kullanılmasını tavsiye ettiğini, son zamanlarda İngilterede CF testinin daha geniş ölçüde muvaffakiyetle kullanıldığını, bilhassa ithal edilecek hayvanlara tatbik edildiğini, RICE ve arkadaşları (1961) Standard metoda nazaran CF testinde bir modifikasyon yaptıklarını, bu metodla naturel enfektelerde yüksek titre elde ettiklerini, aynı zamanda tecrübî olarak enfekte hayvanlarda bu metodla 2-3 ay evvelinden reaksiyon elde ettiklerini, YEŞİLADA (1963) Komplement fixation testinin teşhisdeki değerini incelerken klinik belirti gösterenlerle göstermeyenleri ayrı ayrı düşünmek gerektiğini, klinik âraz gösterenlerin % 90'ının CF testiyle müsbet reaksiyon verdiğini, klinik âraz göstermeyenlerde, enfeksiyonun ilk safhalarında CF testine karşı reaksiyon görülmediğini, 12 aydan eski olmıyan enfeksiyonlarda nadiren reaksiyon verdiğini, bu testle enfekte hayvanların ancak bir kısmının meydana çıkarılabileceğini, DEMİRER ve YÜCEL (1964) Çifteler harasına ait iki düğe ile Zeytinoğlu çiftliğine ait bir baş sığırın gaitalarından Basillus mycobacterium paratuberculosis (Johne)'nin memleketimizde ilk defa izole edilip, üretildiğini ve bu üç baş sığırın kan serumlarının da CF testiyle müsbet bulunduğunu, YEŞİLADA (1964) CF metodunun teşhisde çok kullanıldığını ve doğru sonuç alındığını, yetiştirme müesseselerini bu hastalıktan temizliyebilmek için muhtelif teşhis metodlarının birlikte kullanılmasını, RINGDAL (1965) hastalıklı bir sürüdeki genç ve yaşlı sığırlarda enfeksiyonu beş sene müddetince tâkip ettiğini, senede iki defa sürünün bütün hayvanlarının kanlarını CF testiyle, bir defa da gaitalarını muayene ettiğini ve kültür yaptığını, ilk muayenede 132 sığırın % 12.1'inde müsbet reaksiyon tesbit ettiğini, % 7.7 oranında da gaitada basil bulunduğunu 68 baş sığırı keserek iç organlarını muayene ettiğini, 20 hayvanın organlarında hastalık tesbit ettiğini, 6'sından da basili ürettiğini, 1957 den 1962 yılına kadar devam eden bu geniş araştırma sonunda danaların tecridi ve hastaların sürüden uzaklaştırılmasıyla enfeksiyonun gittikçe azaldığını fakat tamamen bitmediğini, YILMAZ (1966) CHANDLER metodu ile 3476 sığır kan serumunu muayene ettiğini, yaptığı bu geniş araştırmada 161 reaktör tesbit ettiğini bu reaktörlerden kesime tâbi tutulan 70 baş sığırın marazi maddelerinin 42'sinde Paratuberküloz lezyonu ve etkeni tesbit edildiğini, bu durumun Mikro-komplement-fixation testi-

nin, Paratuberküloz'un teşhisinde yaklaşık bir rakkamla % 60 doğru sonuç verdiğini, yapılan araştırmaya göre ise allerjik testin % 38 oranında doğru bir sonuç verebildiğini ve neticede Mikro-Komplement - fixation testinin allerjik test'den üstün bulunduğunu, EMRE (1967) yapmış olduğu geniş bir araştırmada HOLE metodunu kullandığını, 1711 baş sığır ve bir baş geyik kan serumunu bu metodla muayene edip 44 baş sığırı ve geyiği müsbet, 67 sığır serumunu şüpheli olarak tesbit ettiğini, 39 sığır kan serumunu üç metodla (Hole, Mikro ve Wadsworth - Maltaner) mukayeseli olarak muayene ettiğini, Hole testinin daha iyi netice verdiğini otopsi, histo-patolojik muayene ve kültür testleriyle Paratuberküloz tesbit edilemeyen 95 baş sığırdan sadece iki sığırın CF testine karşı müsbet, 3'ünün ise şüpheli bulunduğunu, böylece enfekte olmıyan hayvanların % 95'inin CF testine menfi teamül verdiğini, bu testde aspesifik reaksiyonların nadir olduğunu, allerjik reaksiyonlar hastalığın başlangıcında husule gelirse de oldukça düşük nisbette olduğunu, CF testi ise özellikle enfeksiyonun geç devrelerinde daha çok reaksiyon göstermesine rağmen iyi teşhis metodu olarak kabul edilebileceğini intradermal Johnin ve keza CF testlerine karşı müsbet olan hayvanların % 95.5'nun enfekte bulunduğunu, netice olarak Paratuberküloz'un eradikasyonu için allerjik ve CF testlerinin beraber kullanılmasının daha doğru olacağı kanaatine varıldığını, CF testi için, havanda ezilerek hazırlanan antijenin cam boncuklarla çalkalanarak elde edilen antijenden daha yüksek titre gösterdiğini, % 0.5 fenollü tuzlu su ile hazırlanan antijenin 2-3 sene aynı titreyi muhafaza ettiğini, allerjik testlerin tatbikinden 14-42'inci günler arasında sığırların % 34'ünün kan serumlarında complementi fixe edici titrenin arttığını, MERKAL ve arkadaşları (1968) serolojik, bakteriyolojik ve allerjik testlerle mukayeseli olarak yaptıkları bir araştırmada, bir çok hastalıklı sığırların serolojik ve allerjik testlerle meydana çıkarılmadığını, bundan başka sığırların bir çoğunda enfeksiyona ait bir âraz mevcut olmadığı halde bunlarda müsbet reaksiyon tesbit ettiklerini bildirmişlerdir.

METERYAL VE METOD

Paratuberküloz'ın serolojik teşhisinde CF metodu Kopenhag Veteriner Serum Enstitüsünde 1954 yılından itibaren tatbika başlanmış, diğer allerjik, mikroskopik ve kültürel metodlarla mu-

kayeseli olarak Dr. RINGDAL tarafından geniş ölçüde yapılan çalışmalarda JENSEN'nin bildirdiği metod tatbik edilmiştir. Mezkûr enstitüde bulunduğumuz sırada rutin olarak kullanılan bu test öğrenilmiş ve antijen istihsaline de iştirak edilmiştir. Laboratuvarımızın resmî kayıtlarına göre 1959 yılından itibaren Devlet kurumlarına ve halka ait 4376 baş hayvanın serumu Paratüberkülozis bakımından MİKRO komplement-fixation testiyle muayeneye tâbi tutulmuş olup bunun 317'si aynı zamanda Tüp Komplement-fixation testiyle mukayese edilmiştir. Bu testin uygulanması için, muayenesi yapılacak serum, fizyolojik su veya Veronal buffer, yıkanmış koyun veya keçi alyuvarları, bunlara karşı tavşan veya sıpalarda hazırlanmış immun serum (amboceptor), taze kobay serumu (komplement), antijen olarak bakteri ekstraktı lüzumlu materyallerdir.

KOMPLEMENT TESTİNDE KULLANILAN REAKTİVE MADDELER : Koyun veya keçiden testden üç gün evvelinden kan alınıp, süzöldükten sonra serum fizyolojikle, santrüfüj yardımı ile asgarî üç defa, üstteki mayi su berraklığında oluncaya kadar yıkanır. Testde % 3 lük kan solusyonu kullanılır.

KOMPLEMENT : Erkek kobaylardan temin edilir. Preservatif bir madde ilâve edilmeden eksi 20 C derecede ufak, koyu renkli ampuller içinde titresi bozulmadan bir ay müddetle muhafaza edilebilmektedir. Titresi tâyin edileceği gün 1/10 nisbetinde sulandırılarak, tüplere tevzi edilir.

KOMPLEMENTİN TİTRAJI

Tüp No.	Tuzlu su ml.	Komplement sol. 1/10	Antijen ml.	Haemolytic system ml.
1	1.8	0.10	0.2	1.8
2	1.8	0.15	0.2	1.8
3	1.8	0.20	0.2	1.8
4	1.8	0.25	0.2	1.8
5	1.8	0.30	0.2	1.8
6	1.8	0.35	0.2	1.8
7	1.8	0.40	0.2	1.8
8	1.8	0.45	0.2	1.8

Testde, komplementin tam bir hemoliz husule getiren en küçük miktarı kullanılır. Bu titraj şeması, her serum daima iki antijenle teste tâbi tutulduğundan Paratüberküloz ve Avian tipi Tü-

berküloz antijenleriyle tekrarlanmaktadır. CF testinin en önemli reaktiflerinden biri olan komplementin haemolytic serum ve antijenle dikkatli bir şekilde titre edilmesiyle diagnostik testde kullanılacak miktar tesbit edilmiş olur. Komplement miktarının fazla olduğu tüplerde ancak haemoliz husule geldiği takdirde bu seri komplementin zayıf aktivitede olduğu anlaşıldığından kullanılmasında icap etmektedir. Kobay serumunun saf olarak tüplere tevzi de hataya sebep olacağından 1/10 nisbetindeki dilisyonunun yapılması uygun olur. Daha hassas ve kantitatif olması sebebiyle komplementin titrajında Kolmer metodu tercih edilebilir.

MUAYENESİ YAPILACAK SERUM: Normal serumlar bir miktar komplementi ihtiva ettiklerinden testi karıştırabilir. Bu sebepten bütün serumlar % 0.8 lik tuzlu su ile 1/10 nisbetinde sulandırılarak 60 C. derecede 1 saat inaktive edilir. İki antijenle karşılaştırıldığından 2 ml. seruma 18 ml. T. su ilâvesi uygundur.

HAEMOLYTIC İMMUN SERUMUN TİTRASYONU: Koyun veya keçi yıkanmış kırmızı kan küreyvelerinin muayyen fasıla ve miktarlarda tavşanların kulak venalarına zerkiyle elde edilirse de son zamanlarda amboseptor Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsünden temin edilmektedir.

HAEMOLYICIN TİTRASYONU

Tüp No.	Hemolisin dilisyonu	Haemolycin ml.	Komplement ml.	Alyuvar sol (% 3) ml.	Netice
1	400	0.5	0.5	0.5	Tam haemoliz
2	600	»	»	»	» »
3	800	»	»	»	» »
4	1200	»	»	»	» »
5	1600	»	»	»	» »
6	2400	»	»	»	» »
7	3200	»	»	»	Az erime
8	4000	»	»	»	Erime yok
9	4500	»	»	»	» »

Yukardaki takıma ayrıca kontrol tüpleri de ilâve edilir. Birinci kontrol tüpüne 2 ml. F. su, 1/400 lük serum dilisyonundan bir damla, % 3 lük kan solusyonundan 0.5 ml, ikinci kontrol tüpüne 2 ml, F. su, % 3 lük kan solusyonundan 0.5 ml, üçüncüye 1.5 ml. F. su, 0.5 ml. komplement mahlülü ve % 3 lük kandan 0.5 ml. ilâve edilir. Bütün tüpler 38. C. derecede ki su banyosunda yarım saat

birakılır. Komplementin yardımı ile haemolytic serum alyuvarları eritmekte bu serumun ilk hadlerde miktarı fazla olduğundan tam bir haemolysis müşahade edilmekte sonraki tüplerde ise inhibisyon görülmektedir. Komple bir hemoliz görülen son tüp immun serumun ünitesini bildirir. Şemada da görüleceği üzere tam erime görülen 1/2400 lük amboceptor dilisyonu immun serumun aktivitesini bildirmektedir. Bu nisbetteki serum dilisyonunun 0.5 ml. miktarı bir üniteye tekabül etmekte olduğundan ve testde de 3-4 ünite amboceptor kullanıldığından, immun serum 1/800 nisbetinde sulandırılacak demektir.

ANTİJEN İSTİHSALİ VE TİTRASYONU : Kopanhang Büllows-vejdeki Veteriner Serum Enstitüsünde antijen istihsalinde bir çok vasatlar denenmiş DORSET'in sentetik vasatı daha uygun bulunmuştur. Takriben 50 adet ufak Fernbach'a bu vasatdan 200 ml. kadar tevzi edilip, M. Johnei suşunun taze kültüründen bunlara ekilip 5-7 hafta 38 C. derecede inkubasyonda bırakıldıktan sonra büyük silindirlerde toplanarak çöktürülür, üstteki mayi atılır, dipteki koyu kıvamlı rusup madeni godelerde toplanır, santrüfüje edilir, dipteki canlı bakteri kütlesi on misli fenollü F. su ile suspansiyon edilerek tekrar 3000 r.p.m. de bir saat çevrilir, üst kısım atılır, içinde porselen bilyeler olan büyücek bir havanda mikrop kütlesinin hepsi toplanıp, bu pelte gibi madde yarı yarıya steril kum ve quartz karışığı ile karıştırıldıktan sonra havan hususi bir âlete konularak 4-5 saat çalkalanmaya bırakılır, neticede luzucî bir halen gelen mayi yavaş yavaş distile su ilâvesiyle orijinal hacminin 20-25 misli oluncuya kadar sulandırılır, cam bir silindire boşaltılır, kum ve quartz dipte toplanır, açık krem rengindeki bu koyu kıvamlı, homojen mayi porselen bir silindire aktarılır, elektrikli karıştırıcının madeni çubuğu mayiin içine daldırılmak suretiyle suspansiyon bir taraftan karıştırılırken pH derecesine bakılır, normal sudkostikle pH'ı 11.5a ayarlanır, antijen iki erlenmeyer'e bölündükten sonra özel bir ısıtma cihazında bir taraftan karıştırılmak suretiyle acele 90 C dereceye kadar ısıtılır, bu raya kadar canlı olan bakteri kütlesi ölür ve oda derecesinde soğumağa bırakılır, Isıtma esnasında hydrogen konsantrasyonu bir miktar yükselebilir, pH 9'a ayarlanır ve suspansiyon bir saat 4000 r.p.m. de çevrilir, rusup atılır, suspansiyonun üst kısmı alınır, bu alkali tabiattaki ekstrakt filtre kâğıdından süzülür, bir porselen kapta toplanır, bir taraftan karıştırıcı çalışırken bir taraftanda

0.1 n HCL ile, kalevî olan mayiın pH derecesi 4.5'a indirilir, bu esnada 5 - 10 dakika içinde yaygın bir beyazlanma, presipitasyon husule gelmeğe başlar, uniform bir opalescence'ın görülmesi antijenin iyi olduğunu gösterir, yarım saat kadar kendi halinde oda derecesinde bekletilir, flokonlar dipte birikince presipite edilen kısım santrüfüje edilir, üst kısım atılır, krem rengindeki koyu kıvamlı viscous madde antijeni ihtiva etmektedir, hacminin 8 - 10 misli distile su ile resuspense edilir, n/10 NAOH ile pH derecesi 7.0 - 7.2'e ayarlanır, sud kostiğin ilâvesiyle biraz esmerleşen mayi bir gece soğukta bekletilir, ertesi gün pH'ı tekrar kontrol edilir, kontaminasyona mani olmak için fenollü F. su ile, daha evvelki re-koltlerin kolorimetredeki derecelerine göre ilk dilisyonu yapılır, nephelometrenin hususî tüplerinde kontrol edilip, titre edilir, Ioml. iik ampullere tevzi edilerek kurutulur, soğukta muhafaza edilir, yıllarca aktivitesinden bir eksilme olmadan saklanabilir. Bu antijen germ suspansiyonu olmayıp mikrobun ekstraktıdır. Kopenhagdaki mezkûr enstitüde tarama maksadiyle yapılan araştırmalarda iki antijen müştereken kullanılmaktadır. Mycobacterium Johnei'den elde edilen Johne antijeniyle, Mycobacterium tuberculosis avian'dan elde edilen Avian antijeninin hazırlama tekniği pek az farkla birbirine benzemekte, muayeneye gelen serumlar iki antijenle teste tâbi tutulmaktadır. Antijenlerin titrasyonları, bunların en düşük dilisyonlarıyla müsbet serumların maximum fixation verme esasına dayanır. Prospektüsüne tamamen uygun bir teknikle antijen istihsal edildiği taktirde daima yakın neticeler alınmakta, titrasyonu müteakip kesif antijenin sulandırma nisbeti 1/250 - 1/300 arasında değişmektedir. 50 miligramlık kuru antijene önce 5 ml. steril distili su ilâve edilerek eritilir, sonra bu % 0.25 lik fenollü su ile 800 ml. iblâğ edilir. Bu metodda kullanılan bütün fizyolojik tuzlu sular % 0.25 nisbetinde fenolü ihtiva etmektedir.

ANTİJEN TİTRASYONU

ANTİJENİN DİLİSYONLARI

	1/25	1/100	1/150	1/200	1/250	1/300	1/350	1/400	1/450	1/500
1 — Paratuberküloz müsbet serumu										
2 — Avian »			»	»						
3 — Menfi serum										

Her bir antijen dilisyonu müsbet ve menfi serumlarla ayrı ayrı teste tâbi tutulur.

**TİTRASYONDA KULLANILAN KONTROL SERUMLARININ
DİLİSYONLARI**

1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
Para. antijen 1/350 lik dilisyonu							
»	»	1/375	»				
»	»	1/400	»	İlk testde antijenin 1/400 lik dilisyonundan			
»	»	1/425	»	en iyi netice alınmışsa bu defa titrasyon sık			
»	»	1/500	»	aralıklarla tekrarlanır.			

Yukardaki şemalarda da görüleceği üzere yeni antijen rekoltünün geniş aralıklarla 1/25 den 1/500 kadar dilisyonları hazırlandıktan sonra bunlar standard Paratuberculose ve Avian müsbet serumlarıyla ve menfi bir serumla, ayrı ayrı CF testine tâbi tutularak kendi homolog serumu ile en kuvvetli fixation veren en küçük antijen miktarının tesbitine çalışılır. Elde edilen bu miktarla aynı zamanda heterelog serumlar karşılaştırılır. İlk titrasyonla antijenin en uygun dilisyonu tesbit edildikten sonra bu dilisyonun alt ve üst sulandırılmaları daha sık aralıklarla yapılarak tekrar homolog ve heterelog positif serumlarla ve menfi serumla karşılaştırılır ve bu suretle antijen ünitesinin exact olarak tesbitine çalışılır. Antijen testinde kullanılan miktarlar esas testin aynı olduğundan, en duru ve en konsantre antijen mahlülleri arasındaki mukayese neticesinde tesbit edilen uygun dilisyonun 0.2 miktarı testde kullanılır. Antijenin en zayıf konsantrasyonu ile en yüksek serum dilisyonunda positif reaksiyon veren tüp antijenin titresini bildirmiş olacaktır. Yeni antijen bu şekilde standardize edildikten sonra esas testde, antijen titrajında bulunanın iki misli kullanılır. İkinci şemada da görüleceği üzere antijenin 1/400 lük dilisyonundan iyi sonuç alındığından titraj sık aralıklarla da tekrarlanmıştır. 1/400 kesafetindeki antijenin 0.2'si bir ünite antijene tekabül etmekte esas test de ise iki ünite antijen kullanılacağından yeni antijen 1/200 olarak sulandırılacak demektir. Liyoflize bir halde uzun yıllar saklanabilen antijen sulandırıldıktan sonra da bir ay içinde aktivitesinde bir eksilme olmadan muhafaza edilebilmektedir.

MUAYENE METODU : Muayenesi yapılacak serumun önce 1/10 luk dilisyonu yapılarak bir saat müddetle 60 C derecede su banyosunda inaktive edilir. Daima iki antijenle çalışıldığından

miktarın 2 + 18 olması uygun olur. 1/10 dan 1/1280'e kadar dilisyonlar hazırlanır. Bütün tüplere komplementin en iyi işliyen dilisyonundan bir doz veya 2 ünite komplement ilâve edilir. İki seri tüpten, birinci seri serum dilisyonlarını havi tüplere iki ünite Para. antijeninden iki ünite de diğer seriye Avian antijeninden ilâve edilir. 38-40 C derecedeki inkubasyondan sonra, evvelce hazırlanıp eritrositlerin sensitize edilmesi için 15 dakika oda derecesinde bekletilmiş olan sistemden bütün tüplere ilâve edilip, tekrar yarım saatlik bir inkubasyona terkedilir. Her serum için takıma bir fazla tüp ilâve edilerek, serumların non-spesifik antikomplementer bir hassaya sahip olup olmadıkları kontrol edilmiş olur. Bu tüpde antijen yoktur. Bundan başka sehpaye antijenin spesifitesini ve potansiyelini kontrol maksadiyle müsbet olduğu bilinen positif bir serumun ilâvesi de lüzumludur.

KOMPLEMENT — FIXATION TESTİ

Tüp No.	Serum dilisyonları	Volüm ml.	Fiz. su ml.	antijen ml.	komplement ml.	haemolysin ve eritrosit solüsyonu, ml.
1	1/10	1.8	—	0.2	0.2	1.8
2	1/20	1.8	1.8	0.2	0.2	1.8
3	1/40	1.8	1.8	0.2	0.2	1.8
4	1/80	1.8	1.8	0.2	0.2	1.8
5	1/160	1.8	1.8	0.2	0.2	1.8
6	1/10 (Kontrol)	1.8	—	yok	0.2	1.8
7	hemolitik sistem kontrolü	2.2	2.2	yok	—	1.8

Yukardaki şemada da görüleceği üzere muayene edilecek her serum için asgarî 7 tüp kullanılır. İlk ve 6'ıncı tüpler boş bırakılıp diğerlerine 18. ml. F. su konur. Serumun inaktive edilmiş 1/10 luk ilk dilisyonundan 1, 2 ve 6 No. lu tüplere 1.8 ml. ilâve edilir. İki No.lu tüpten 1.8 ml. alınarak üçüncüye aktarılır ve bu şekilde 5'inci tüpe kadar devam edilerek dilisyonların bir üst katları hazırlanır. İkinci inkubasyonu müteakip neticeler okunur. İkinci okuma sehpa bir gece aşırı soğukta bırakıldıktan veya tüpler hafifçe santrifüje edildikten sonraya bırakılır. Bir takımdaki tüp serisi adedi hesaplanacak olursa :

1 — Paratüberküloz positif serum serisi.

- 2 — Avian Tüberküloz positif serum serisi.
- 3 — Negatif serum serisi.
- 4 — Muayenesi yapılacak serumun Johne antijeni serisi.
- 5 — Muayenesi yapılacak serumun Avian antijeni serisi.

Yukardaki şemada da görüleceği üzere, test iki safhalı olup primer fixation da, segonder olan da takımın bütün serilerininin 38-40 C.lık sıcak su banyosunda bırakmakla tamamlanmaktadır.

REAKSİYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ :

% 100 lük bir fixation :	hemoliz yoktur =	+++	lik bir reaksiyona tekabül eder.
% 75 » » » (inhibisyon) :	% 25 lik hemoliz =	+++	» »
% 50 » » » " :	% 50 lik hemoliz =	++	» »
% 25 » » » " :	% 75 lik hemoliz =	+	» »
Fixation mevcut değil :	% 100 lik hemoliz	—	» »

1/20 lik serum dilisyonunda % 50 lik bir inhibisyon enfeksiyona delâlet etmekte, 1/10 dilisyonunda % 50 den az hemolizyani % 75 veya % 100 lük bir fixationla ilgili reaksiyonlar şüpheli kabul edilmektedir. Serumun maksimal titresinin tâyini için tüp adedi artırılabilir. Sürülerde tarama maksadıyla yapılacak araştırmalarda esas testden evvel **Preliminer test** kullanılmaktadır. Çok serumla çalışılacağı zaman 1.8 ml. F. suyu havi iki tüpten birine 0.1 diğerine 0.2 ml. saf serum ilâve edilip inaktive edilerek yalnız Johne antijeniyle Cf testine tâbi tutulur. Müsbet veya şüpheli reaksiyon veren serumlarda ikinci bir testle limit tesbit edilir. 1/10 luk serum dilisyonunda % 50 nin üzerinde bir hemoliz müşahade edilirse bu serum menfi kabul edilerek mükerrer muayeneye tâbi tutulmaz.

S O N U Ç

Lâboratuvarımızın resmî kayıtlarına göre, Devlet kurumlarına ve halka ait hayvanlardan gönderilen 4376 serum Paratüberkülozis bakımından Mikro c.f testiyle muayeneye tâbi tutulmuş olup bu miktarın 317'si ayrıca Tüp - komplement - fixation testiyle mukayese edilmiştir. 317 serumdan 299 serum Mikro ve Tüpkomp-

lement fixation testleriyle aynı neticeyi vermiş 18 serumdan ise ayrı sonuç alınmıştır. Buna göre iki metod arasındaki uyarlık oranı % 94.3 dür. Bu nisbet her iki testin lehine kaydedilecek bir husus olmakla beraber, geniş ölçüde yapılacak taramalarda kolay ve çabuk olmasından dolayı Mikro - metod'un, enfektelerdeki maksimal titrenin, enfeksiyon durumunun değerlendirilmesinde de Tüp metodunun uygulanmasının faydalı olacağı kanaatine varılmıştır. İstihsal tarzından metinde mufassalan bahsedilmiş olan mezkûr antijenin elimizde bir miktar mevcuttur. Bu metodla çalışmak isteyen meslektaşlarımıza gönderebileceğimizi bu vesileyle bildirmek isteriz.

Çalışmalarımızda bizleri daima destekleyen ve yardımcı olan enstitü direktörü Dr. Ahmet Özsoylu müdür yardımcısı Dr. Faik Alp'a ve teknik elemanlarımızdan Cemile Sevüktükine bu vesileyle teşekkürlerimizi arz ederiz.

SUMMARY

STUDIES ON SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF PARATUBERCULOSIS

According to the official records of our laboratory, 4376 blood sera from the animals of State and private farms were tested by the method of Micro - complement fixation test, 317 out of these sera were also tested comparatively by Danish Tube - complement fixation method. By the comparative examination, 299 out of 317 sera gave the same results but the remaining 18 sera were found to be different. So, it could be stated that the rate of correlation between two methods is 94.3 %. Although two different methods could be used instead of each other, but Micro - complement fixation method is suggested for screening purpose because it is more practical and convenient. The latter, Tube - method, is advised for evaluation of infection and maximal titre in reactors.

BİBLİOGRAFİ

- 1 — Akçay, Ş., Erbil, İ.E. : Karacabey harası sığırlarındaki Paratuberküloz vak'aları; Baytarı mecmua, cilt. 10, Sayı. 4, 1932.
- 2 — Annau, E., Konst, H. : Studies on Johne's disease in Canada; Vet. Bull. Vol. 30, No. 6, 1960.
- 3 — Chandler, R. L. : A preliminary note on a Micro-complement fixation test for John's Disease; Vet. Record Vol. 68, No. 1, 1956.
- 4 — Demirer, F. : 1961 Ocak tarihli rapor.
- 5 — Doğuer, M., Yılmaz, S. : Paratuberkülozun yurdumuzdaki umumî durumu; Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg. Cilt. 1, Sayı. 4, 1961.
- 6 — Emre, N. : Yurdumuz sığırlarında Paratuberkülozun teşhis metodları üzerinde mukayeseli araştırmalar; Güven Matbaası, Ankara 1967.
- 7 — Erdöl, A. : Şahsî komünikasyon 1961.
- 8 — Ertürk, Ö. : Paratuberculosis; Vet. Fak. Derg. Cilt. VII, No. 3, 1960.
- 9 — F.A.O./O.I.E. : Meeting on Emerging Diseases of animals. 1 - 24 June, 1961.
- 10 — Hole, N. H. : La maladie de Johne; Bull. Off. Int. Epiz. 40, 1953.
- 11 — Hole, N. H. : The complement-fixation test and Johne's disease; Vet. Bull. Vol. 30, No. 7, 1960.
- 12 — Hutyra, F ve arkadaşları : Special pathology and therapeutics of the disease of domestic animals; Vol. 1, 1949.
- 13 — Jensen, M. H. : A complement-fixation test for Johne's disease in cattle; Nordisk Veterinaermedicin 8, Reprint No : 319, 1956.
- 14 — Katic, İVAN. : Bibliography of Literature on Johne's disease. Royal Vet. Ag. University Copenhagen 1969.
- 15 — Kelser, R. A., Sschoening, H. W. : Manual of Vet. Bacteriology. 1948.
- 16 — Merkal, R. S. ve arkadaşları : Comparison of examination and test methods for early detection of Paratuberculosis cattle; Vet. Bull. Vol. 39, No. 2, 1969.
- 17 — Mc Queen, D. S. : Johne's disease with particular reference to diagnosis; Vet. Bull. Vol. 30, No. 7, 1960.
- 18 — Novikova, M. P. : New liquid media for culturing Mycobacterium Johnei; Vet. Bull. Vol. 30, No. 12, 1960.
- 19 — Plum, N. : The state Veterinary Serum Laboratory 50 th. Anniversary, 12, 1958.
- 20 — Rice, C. E., Konst, H. : Comparison of Complement-fixation titres prior to and at 24 or 48 hours after a Johnin intradermal test; Vet. Bull. Vol. 30, No. 6, 1959.
- 21 — Ringdal, G. : Diagnosis of Johne's disease in cattle; Nordisk Veterinaermedicin 12, Reprint No : 360, 1960.
- 22 — Ringdal, G. : Studies on Johne's disease in a single herd during a five year period; Nordisk Vet. Med. 17, Reprint No : 411, 1965.
- 23 — Sezginer, İ. R. : Ehli hayvanlarda intanî hastalıklar; Hilâl Matbaası, İstanbul, 252 - 259, 1928.
- 24 — Stableforth, A. W., Galloway, I. A. : Infectious diseases of animals. Vol. 1, Sayfa. 529, 1959.
- 25 — Wilson, G. S., Miles, A. A. : Principles of bacteriology and Immunity; Vol. 1 Sayfa. 529, 1957.
- 26 — Yeşilada, Y. : Paratuberküloz; Bornova Araştırma Enst. Derg. Yıl. 4, Sayı. 8, 1963.
- 27 — Yeşilada, İ. : Paratuberkülozun yurdumuzdaki yayılışı, bulaşma yolları ve mücadele metodları; Bornova Vet. Araştırma Enst. Derg. sayfa. 25, 1964.
- 28 — Yılmaz, S. : Sığırların Paratuberküloz hastalığının teşhisinde Microcomplement-fixation testi ile yapılan serolojik araştırmalar, Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg. Cilt. 3, Sayı. 1 - 2, 1966.
- 29 — Yücel, N., Demirer, F. : Bacillus mycobacterium Paratuberculosis'in memleketimizde ilk izolasyonu; Vet. Hekimler Dern. Derg. Cilt. 34, Sayı. 3 - 4, 1964.