



Gökben ÖZBEY¹
Hakan KALENDER²
Adile MUZ³

¹ Fırat Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri
Meslek Yüksekokulu,
Elazığ, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Süleyman Demirel Keban
Meslek Yüksekokulu,
Elazığ, TÜRKİYE

³ Fırat Üniversitesi
Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 11.12.2007
Kabul Tarihi : 18.06.2008

Yazışma Adresi
Correspondence

Gökben ÖZBEY

Fırat Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri
Meslek Yüksekokulu,
23119
Elazığ -TÜRKİYE

gokbenozbey@yahoo.com

Sığır Tüberkülozu'nun Epidemiyolojisi ve Teşhisi

Sığır tüberkülozu *Mycobacterium bovis* tarafından oluşturulan bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık, insanlar, sığırlar, diğer evcil hayvanlar ve bazı yabani hayvanlarda görülür. Sığır tüberkülozu birçok ülkede olduğu gibi, ülkemizde de üzerinde durulması gereken zoonoz bir hastalıktır. Bu derlemede sığır tüberkülozunun epidemiyolojisi ve teşhisi ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sığır tüberkülozu, *Mycobacterium bovis*, epidemiyoloji, teşhis..

Epidemiology and Diagnosis of Bovine Tuberculosis

Bovine tuberculosis is a contagious disease, caused by *Mycobacterium bovis*. The disease occurs in humans, cattle, other domesticated animals, and certain wildlife populations. Bovine tuberculosis is an important zoonotic disease in Turkey and many countries. This review summarizes the knowledge on the epidemiology and diagnosis of bovine tuberculosis.

Key Words: Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, epidemiology, diagnosis..

Giriş

Bergey's Manual of Systemic Bacteriology'nin 9. baskısına göre, *Mycobacterium*'lar Prokaryotes aleminde, Fimircutes divizyonunda, Actinomycetales takımında, *Mycobacteriaceae* familyasında ve *Mycobacteria* cinsinde sınıflandırılmıştır (1).

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) kompleks (MTBC) bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerliklerine göre birbirleriyle yakın ilişkili *Mycobacterium* türlerinin bir grubuna verilen isimdir (2). Bunların tümü insan ve diğer memelileri etkileyen kronik granülatöz bir hastalık olan tüberküloz (TB)'a sebep olur. Bu kompleks *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. bovis BCG* (3), *M. canetti* (4) ve *M. caprae* (5)'i içerir. *M. bovis* MTBC'i içerisinde en geniş konakçı dağılımına sahiptir ve insanlar da dahil olmak üzere çok sayıda memeli türünü infekte edebilir (6). Bununla birlikte, *M. tuberculosis* sadece bir insan patojenidir (7).

Sığır TB'u etkeni olan *M. bovis* aside dirençli, aerobik, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz bir bakteridir (8).

Sığırlarda *M. bovis* çoğunlukla solunum yolu ile bulaşır, fakat kontamine materyalin sindirim yoluyla alınması ile de infeksiyon meydana gelebilir. Bakteri akciğerlere girdiği zaman çoğalmaya başlar ve genellikle akciğerlerin yanındaki lenf nodüllerine yayılır (9).

Sığır TB'u tüberkeller olarak bilinen nodüler granülom'ların oluşumuyla karakterizedir (10). Çoğunlukla kronik bir hastalık olarak tanımlanmasına rağmen, sığır TB'u bazen akut, çabuk ilerleyici bir seyir gösterebilir. Her vücut dokusu etkilenebilir, fakat lezyonlar çoğunlukla lenf nodülleri (özellikle baş ve thoraks), akciğerler, bağırsaklar, karaciğer, dalak, pleura ve peritoneum'da gözlenir (10).

Bugün gelişmiş ülkelerde sığır TB'u eradike edilmiş veya kontrol edilebilir durumdadır (11). Bu ülkelerde TB'un prevalansına bakıldığında ülkemizde etkili bir eradikasyon çalışmasının yapılması gerekmektedir (11). Hastalığın eradikasyonuna yönelik 1986 yılından bugüne kadar ülkesel bir eradikasyon projesi uygulanmamasına karşın uzun yıllardan beri çeşitli resmi kurum ve kuruluşlardaki hayvanlarda TB mücadelesi sürdürülmektedir (11).

Sığır TB'u genellikle canlı hayvanda gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları ile teşhis edilir (10). İnfeksiyon subklinik bir seyir izlediğinden klinik muayene ile teşhis edilemez. Ölü hayvanlarda post-mortem muayene ve histopatolojik ve bakteriyolojik tekniklerle teşhis edilir ve DNA prob ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknikleri de kullanılabilir (10). Sığır TB'unun tanısı için kullanılan bakteriyolojik yöntemler Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile aside dirençli basilin mikroskopik olarak gösterilmesi ve *M. bovis*'in kültürle üretilmesidir. Ziehl-Neelsen boyama yöntemi çabuk, ucuz, fakat duyarlılığı düşük bir yöntemdir (7). BACTEC 460 gibi sıvı kültür sistemlerinin kullanımı ile kültür yönteminin duyarlılığı artmış ve üreme süresi kısalmıştır (12, 13).

Epidemiyoloji

M. bovis başlıca sığırları aynı zamanda domuz, kedi, köpek, koyun, keçi, at ve kanatlılar gibi evcil hayvanlarla, birçok yabani hayvanı (porsuk, geyik, tilki ve ferret'ler) ve insanları infekte edebilen zoonotik bir bakteridir (6, 10).

Hastalığın oluşumunda hayvanın yaşı, davranışı, çevre, iklim ve çiftlik uygulamalarının rolü vardır (14). *M. bovis*'in en önemli bulaşma yolu aerosoldür. (14, 15). Kalabalık ve havalandırmanın bozuk olduğu ahırlarda bulunan infekte hayvanlar öksürük ve tıksırık yolu ile sağlamları bulaştırarak hastalığın yayılmasına yol açarlar (16). İnfekte sütün emilmesi, kontamine mera veya sudan direkt olarak *M. bovis*'in alınmasıyla sindirim yolu ile de bulaşma olmaktadır (9).

Eğer üreme organları infekte olursa genital bulaşma meydana gelebilir, fakat bu tür bulaşma nadirdir (15). Deri yolu ile bulaşma da oldukça seyrek gözlenir. Süt, idrar ve gayta ile *M. bovis*'in saçılması, gelişmiş ülkelerde sığır TB'unun nispeten önemsiz bir bulaşma şekli olarak kabul edilir. Bununla birlikte, *M. bovis*'in nazal mukustan izole edildiği bildirilmiştir (17, 18).

M. bovis insanlara sindirim, aerosol inhalasyon veya mukoz membranlar ve deri sıyrıklarından direkt temas ile bulaşabilir (19, 20). İnsanlara asıl bulaşma şeklinin aerosol inhalasyon ve pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketimiyle olduğuna inanılır (21). İnfekte sığırlarla (22) veya yabani hayvanlarla yakın temas da insandan insana bulaşma da bir rol oynayabilir (6). Gelişmiş ülkelerde eradikasyon çalışmaları bu hastalığın prevalansını önemli ölçüde azaltmıştır, fakat yabani hayvanlardaki rezervuarların tam eradikasyonu güçtür (23). *M. bovis* halk sağlığı yönünden Risk 3 patojen olarak sınıflandırılmıştır (24).

M. bovis'in yabani hayvan rezervuarları sığırlar için infeksiyon kaynağıdır (8). Bu hayvanlar İngiltere'de Avrasya porsuğu (Meles meles), Yeni Zellanda'da fırça kuyruklu possum (Trichasurus vulpecula), Amerika'da beyaz kuyruklu geyik (Odocoileus virginianus), Afrika'da vahşi Afrika mandası ve diğer ruminantlardır (8).

İngiltere'de sığır TB'unun insidensi 1984 yılından beri artmıştır ve yıllık kaybın 2011 yılına kadar 1 milyar dolara ulaşacağı düşünülmektedir (25). Sığır TB kontrol programının toplam maliyeti 1998/1999 (26)'da 24.8 milyon Amerikan dolarından 2005/2006'da 99.1 milyon dolara kadar 7 yılda yaklaşık olarak % 400 artmıştır (8).

Eradikasyon programları için finansal destek alan Avrupa Birliği Üyesi Ülkelerinde 1999 ile 2004 yılları arasında sığır TB'unun prevalansı Tablo 1'de gösterilmiştir (27).

Sütün pastörizasyonu ve zorunlu kontrol programlarının uygulanması ile Amerika'daki sığırlarda *M. bovis* infeksiyonlarının insidensi %0.001'den daha aza düşmüştür (28). Sonuç olarak, Amerika'daki *M. bovis* infeksiyonlarının insan vakaları da azalmıştır (23). Bununla birlikte, birkaç rapor Amerika'nın bazı bölgelerinde *M. bovis*'e bağlı insan TB'unun insidensinin arttığını göstermiştir (29-31).

Tablo 1. Eradikasyon programları için finansiyel destek alan Avrupa Üyesi Ülkeleri arasında sığır TB'unun durumu: 1999 ile 2004 yılları arasında sürü prevalansındaki trendler (27).

Üye Ülkeler	Sürü prevalansı ^a					
	1999 (%)	2000 (%)	2001 (%)	2002 (%)	2003 (%)	2004 (%)
Yunanistan	–	–	1.1	1.3	1.8	1.2
İspanya	4.3	3.5	3.5	2.7	2.2	1.8
İrlanda	7.3	7.5	7.4	6.9	6.5	5.9
İtalya	0.8	0.9	0.7	0.7	1.0	1.1
Portekiz	0.3	0.3	0.3	0.4	0.2	0.2
İngiltere (Kuzey İrlanda)	–	6.8	6.8	10.6	12.4	12.1

^a yılda kontrol edilen sürülerin sayısı ile bölünen pozitif sürülerin sayısı.

Aktif sığır TB kontrol programları olmayan gelişmekte olan ülkelerde sığır TB'u insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (32). Gelişmekte olan ülkelerde insanlarda *M. bovis*'den kaynaklanan TB vakaları, insan TB vakalarının %10'unu oluşturmaktadır (32).

Türkiye'de sığır TB'u ile ilgili çalışmalar 1900'lü yılların başında başlamıştır ve hastalığın insidensi hakkında sağlıklı bir veri bulunmamaktadır (33-35). Kayseri bölgesinde sığır TB'unun prevalansı %1.49 olarak saptanmış ve BACTEC radyometrik metodun, *M. bovis*'i saptamada hızlı ve duyarlı bir tanı yöntemi olduğu bildirilmiştir (36). Van bölgesindeki hayvanlardan alınan burun akıntısı ve süt örneklerinin PZR yöntemi ile incelenmesi sonucu, burun akıntısı örneklerinin 3 tanesinde, süt örneklerinin ise 1 tanesinde pozitiflik bulunmuştur (35). OIE verilerine göre Türkiye TB hastalığının görüldüğü ülkeler arasında yer almaktadır (Tablo-2) (33, 37).

Tablo 2. OIE bilgilerine göre Türkiye'de Sığır TB'unun durumu (33, 37).

Yıl	Hastalık Varlığı	Tür	Salgın sayısı	Olgu sayısı	Ölüm sayısı	İtlaf sayısı	Mezbaha kesimi	Tüberkülin testi sayısı
2004	+	Sığır	79	368	23	4	341	6364
2003	+	Sığır	45	175	9		133	3817
2002	+	Sığır	49	64	5		44	3377
2001	+	Sığır	15	42	1		42	844
2000	+	Sığır	19	28	1	2	24	2025
1999	+	Sığır	11	46	0	1	45	2431
1998	+	Sığır	6	6	2		4	3145
1997	(1996)	Sığır						3620
1996	+	Sığır						5800

(1996): Bu yıldan önce hastalık görülmemiştir.

Türkiye'deki süt sektörünün Avrupa Birliği ülkelerine süt ve süt mamülleri ihracatı yapılabilmesi için sığırlarda TB'dan ari işletmeler oluşturulması gerekmektedir. 2005 yılı hayvan hastalık ve zararlıları ile mücadele programı gereği (38) TB'dan ari işletmeler oluşturmak amacı ile Balıkesir, Edirne, İstanbul, İzmir, Kırklareli, Kahramanmaraş, Tekirdağ, Eskişehir ve Konya illerinde süt tesislerinin sütü temin ettiği işletmelerde Tüberkülin testi uygulanmaktadır (11). Son çalışmalara göre, 2005 yılında 150 mihrakta TB hastalığı çıkmıştır, ari işletmeler dışında 5976 büyükbaş hayvana tüberkülin testi uygulanmış, pozitif çıkan 768 büyükbaş hayvan zorunlu kesime sevk edilerek 1.120.945.11 YTL tazminat ödenmiştir. TB'un prevalansı %10 olarak belirlenmiştir (33, 37, 39, 40).

Türkiye'de vahşi hayvanlarda TB'un prevalansı, dağılımı ve populasyon yoğunluğu ile bunların evcil hayvanlar ve insanlarla olan ilişkilerine ait parametreler yok denecek kadar azdır (33). Bu durum hastalıkla mücadeleyi büyük ölçüde güçleştirmektedir (33). Sıcak mevsimlerde yapılan yaylacılık sırasında vahşi domuz ve geyiklerden kalan infeksiyöz materyallerle kirlenmiş otlaklar hastalığın bulaşmasında bir kaynak oluşturabilmektedir (33, 39). Türkiye'de bir mink ve kedide TB vakası rapor edilmiştir (41, 42).

Teşhis

Sığırlarda TB sadece hastalığın son evrelerinde klinik olarak teşhis edilebilir (43). Tüberkülin deri testi universal olarak bilinen ve sığır TB kontrol programlarında başlangıç teşhisi için kullanılan bir testtir (43). Bununla birlikte, hastalık prevalansının düşük veya hastalıktan ari ülkelerde, et muayenesi teşhis ve teftiş için kullanılır (43). Deri testinin bazen uygulama dezavantajlarından dolayı, sığırlarda *M. bovis* infeksiyonlarına karşı immünolojik testler alternatif teşhis metotları olarak geliştirilmeye çalışılmaktadır (15). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve gama-interferon (IFN- γ) testi gibi testler son yıllarda infeksiyonu saptamak için

uygulanmıştır (15). Bununla birlikte, sığır veya diğer hayvanlarda TB için universal olarak kabul edilen diagnostik kan testi yoktur (10). İnfeksiyonun saptanmasında çoğu kez *M. bovis*'in izolasyon ve identifikasyonuna güvenilmektedir (10).

Klinik muayene ve Nekropsi

Sığır TB'una yakalanan çoğu sığır klinik olarak normaldir (43). Yaygın miliyer TB lezyonları gösteren bazı inekler klinik olarak normal görülürler, fakat diğer belirtilerle ilişkili olmayan aşırı zayıflama TB şüphesini artırır (43). İnip çıkan ateş de çoğunlukla hastalıkla ilişkilidir (16, 43). Akciğer TB'u solunum güçlüğü ve düşük derecede pnömoni belirtileri ile birlikte, kronik öksürükle karakterizedir (43). Etkilenen hayvanlar uysaldır ve hareketsizdir, fakat gözler parlaktır (44). İngiltere'den elde edilen rapor 6 ayın üzerindeki sığırların patolojik muayenelerinde TB'daki primer kompleksin akciğerlerde ve ilişkili olduğu lenf nodüllerinde görüldüğünü belirtmektedir (45).

Etkenin identifikasyonu

Klinik ve postmortem örneklerde *M. bovis*'in varlığı boyalı preparatların incelenmesiyle gösterilebilir ve organizmanın kültürde üretilmesi ile teyit edilebilir (10). Marazi madde alma kaplarının temiz ve steril olması gerekir (çevresel mikobakteri ile kontamine olan örnek kaplarının kullanılması çevresel mikobakterilerin çabuk gelişmesine bağlı olarak *M. bovis*'i identifiye etmede başarısızlıkla sonuçlanabilir) (10,16). Numune almada 50 ml kapasitede, uygun, tek kullanımlı plastik kaplar çeşitli örnek tipleri için kullanılabilir. Laboratuara gönderilecek örnekler sızıntıyı önlemek için iyice izole edilmeli, mühürlenmeli ve nakil sırasında meydana gelebilecek olan kırılma veya ezilmeye karşı uygun bir şekilde paketlenmelidir (46). Şüpheli zoonotik bir hastalıktan elde edilen örnekleri taşımak için "International Air Transport Association" (IATA), "Dangerous Goods Regulations" (DGR) kuralları takip edilmelidir (10). Laboratuara

örneklerin erken teslimi *M. bovis*'in kültür ile elde edilme şansını artırır, fakat teslim gecikirse, kontaminantların üremesini geciktirmek ve mikobakterileri muhafaza etmek için örneklerin dondurulması gerekir (10). Sıcak hava koşullarında, dondurma mümkün değilse, kontaminasyonu önlemek için, bakteriostatik madde olarak %5 w/v borik asit ilave edilebilir, fakat sadece sınırlı bir süre için sütün bozulmasını önler, 1 haftadan daha uzun süre bozulmayı önleyemez (10).

Laboratuvar personelinin enfeksiyonunu önlemek için tedbirler alınmalıdır. Kültürü de içeren bütün prosedürlerin biyolojik güvenlik kabinleri içinde yapılması gerekir (10).

a) Mikroskopik muayene: *M. bovis* klinik örneklerden ve doku materyalinden direkt olarak hazırlanan preparatlarda mikroskopik olarak görülebilir (43). *M. bovis* aside dirençli olduğundan klasik Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanır, fakat fluoresan asit-fast boyama da kullanılabilir (10). Mavi zemin üzerinde kırmızı renkte basil (methylen blue boyama) ve eğer malaşit yeşili ile tekrar boyanırsa yeşil zeminde görülürler (47). Preparatta pozitif olan vakalar için lezyonun haematoxylin-eosin ile boyanmış kesitinin muayenesi önemlidir (10). Bu teknik ucuz, pratik ve diğer laboratuvar imkanlarının mevcut olmadığı gelişmekte olan ülkelerde faydalı bir başlangıç teşhis adımıdır; üstelik klinik ve patolojik örneklerde identifikasyon çabucak yapılabilir (14). *M. bovis* kültürde izole edilmesine rağmen, histolojik kesitlerde saptanmayabilir (10).

b) *M. bovis*'in kültürü: Örnekler akciğer, karaciğer, dalak v.s. gibi lezyonlu lenf nodülleri ve parenkimatöz organlardan alınır (43). Ancak intradermal deri testleri pozitif olan hayvanlarda büyük patolojik lezyonlar görülmez; retrofarengeal, bronşial, mediastinal ve mesenterik lenf nodüllerinden alınan örnekler rutin olarak kültür muayenesi için toplanır; bazen supramamar ve mandibular bezler ve karaciğer de alınır (43). Örnekler bir stomacher veya blender ile homojenize edilir (43, 46). Diğer kontaminantların üremesini engellemek için doku %5 oksalik asit veya %2-4 sodyum hidroksit gibi bir asit veya alkali ile muamele ettirilir (10, 47). Karışım oda sıcaklığında 10 dakika karıştırılır. Süspansiyon santrifüj edilir, sıvı atılır ve sediment kültür ve mikroskopik muayene için kullanılır (43).

Primer izolasyon için sediment genellikle Lowenstein-Jensen, Coletsos base ve Stonebrink'in besiyeri gibi katı yumurtalı besiyerlerine ekilir, bu besiyerlerinin piruvat veya gliserol veya her ikisini de içermeleri gerekir (43). Middlebrook 7H10 veya 7H11 gibi agar içeren besiyerlerinin de kullanılması gerekir (43, 46). Gliserolsüz sodyum piruvat içeren Stonebrink'in besiyeri muhtemelen en iyi besiyeridir (48).

Kültürler CO₂'li veya CO₂'siz ortamda 37°C'de 8 hafta inkube edilir (10, 46). Besiyerlerinin kurummasını önlemek için ağız vida-kapaklı tüplere koyulması gerekir (10). Üreme gözle görüldüğü zaman preparatlar hazırlanır ve Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanır (10). *M. bovis* genellikle 3-6 hafta inkubasyondan sonra üreme gösterir.

M. bovis piruvatsız Lowenstein-Jensen besiyerinde gelişir, fakat gliserol ilave edildiği zaman daha az ürer (10, 46). Karakteristik üreme özellikleri ve koloni görünümü *M. bovis*'in teşhisinin kanıtıdır (43). Bununla birlikte, TB kompleksindeki her bir izolatın biyokimyasal testler (niasin ve nitrat) veya Gen Prob TB kompleks DNA probuyla teyit edilmesi gerekir (10).

İzolatların identifikasyonu genellikle kültürel ve biyokimyasal özelliklerini belirlemeyle yapılır (46). *M. bovis* "disyonik" adı verilen gliserin içeren besiyerinde seyrek, ince üreme gösterir. Bununla birlikte, gliserinsiz piruvat içeren besiyerinde iyi gelişir (46). Uygun piruvatlı katı besiyerinde *M. bovis* kolonileri "smooth" (S tipi) ve sarı-beyaz renktedir. Organizma 37°C'de yavaş ürer, fakat 25°C veya 42°C'de üremez (44). *M. bovis* tiöfen-2-karboksilik asit hidrazid (TCH) ve izonikotinik asit hidrazid (INH)'e duyarlıdır (10, 43). Bu durum 7H10/7H11 Middlebrook agar besiyeri veya yumurtalı besiyerlerinde gelişmeyle test edilebilir (10). Yumurtalı besiyeri piruvatsız hazırlanır, çünkü INH'ı inhibe eder ve TCH üzerinde de benzer etkiye sahip olabilir (INH'in bir analogu olan) ve böylece yanlış pozitif sonuç verir (10, 43). *M. bovis* suşları para-amino salisilik asit ve streptomisin'e de duyarlıdır (10). Etkili ilaç konsantrasyonları yumurtalı ve agar içeren besiyerleri için farklıdır. *M. bovis*'te niasin birikimi ve nitrat indirgemesi testleri negatiftir (10, 43). Amidaz testinde, *M. bovis* üreaz pozitif ve nikotinamidaz ve pirazinamidaz negatiftir (10, 43). Mikroaerofilik ve nonkromojenik bir bakteridir (14). İdentifikasyon için ek testler kullanılabilir. Birkaç DNA analiz tekniği izolatları identifiye etmede çabuk bir yöntemdir ve moleküler tiplendirme epidemiyolojik açıdan önem taşır (10).

M. bovis'in TB kompleksindeki diğer üyelerden, yani *M. tuberculosis* (insanlarda TB'un primer sebebi), *M. africanum* (*M. tuberculosis* ve *M. bovis* arasında fenotipik yer işgal eder) ve *M. microti*'den ("vole (tarla faresi) bacillus", nadiren rastlanan organizma) ayırt edilmesi gereklidir (10). Yukarıda belirtilen biyokimyasal testler *M. bovis*'i diğer türlerden ayırmaya yardımcı olur (10).

Mikobakteri türlerinin identifikasyonu ve tanımlanması için diğer biyokimyasal testler aril sülfataz, Tween 80 hidrolizi, MacConkey agar, sodyum klorid tolerans, tellurit indirgeme, demir yükseltme, üreaz ve katalaz testleridir (2).

Bazı Mikobakteri izolatlarının biyokimyasal testlerle ayırt edilmesi güç olabilir (10, 43). Bu nedenle etkenlerin hücre duvarı lipid kompozisyonunun kromatografik analizinden yararlanılabilir (16). *M. bovis* polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve spoligotyping gibi moleküler tiplendirme teknikleriyle teyit edilebilir (10).

BACTEC gibi sıvı kültür sistemleri bazı tıp ve veteriner laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmaktadır (10,46). Bu otomatize sistemlerin kullanımı ile kültür yönteminin duyarlılığı artmış ve üreme süresi kısalmıştır (12, 13). Üreme radyometrik veya fluometrik aletlerle değerlendirilir (10). BACTEC 460 sistem gibi radyometrik kültür metodu geleneksel kültür metodundan daha çabuk

sonuç verir, fakat mantar kontaminasyonuna duyarlıdır ve antibiyotiklerle sınırlanamayan atipik mikobakteriler ve non-mikobakteriyal organizmalar üreyebilir (48). Bu metodun çok pahalı olması, kültür viallerini okumak için bir cihaza gerek duyması ve radyoizotoplara elle dokunulması gibi dezavantajları vardır (43). Aside dirençlilik sadece mikobakterileri tanımlamada bir kriter değildir. Çünkü *Corynebacterium* spp., *Nocardia* spp. ve *Rhodococcus* spp gibi mikroorganizmalar da aside dirençlidir (43). Primer kültürlerde MTBC organizmaların kolonisi katı besiyerinde 4-6 hafta sonra ve radyometrik ve otomatik kültür sistemlerinde 13-15 gün sonra gözlelenebilir (49). Üretici firmalar (BD-Diagnostic Systems) artık radyometrik sisteminin kullanılmasını desteklememektedir (10).

c) Moleküler yöntemler: Kültür veya izolasyon mikobakterilerin saptanması için hala altın standart test durumundadır. Bununla birlikte, mikobakterilerin kültür ortamında çok yavaş üremesi ve bazı klinik örneklerde kültür edilemeyen canlı mikobakterilerin varlığından dolayı daha uygun metotlara gerek duyulmaktadır (43). Son yıllarda, sığırlarda TB'un etkili şekilde teşhisi için çok sayıda moleküler yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler kültürden daha hızlı, spesifik ve duyarlıdır ve TB basilinin etkenini saptadığı gibi aynı zamanda bu etkenlerin tiplendirilmesinde de kullanılmaktadır (43). Bununla birlikte, bu yöntemlerin uygulanması için uygun kaynakların ve uzman personelin mevcudiyeti önemlidir ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde mikobakteriler gibi patojenlere bu teknolojiyi uygulamak güç olabilir (43,50).

Moleküler yöntemler başta *M. tuberculosis*'in tanısını güvenilir hale getirmek ve tiplendirilmesini kolaylaştırmak için uygulanmıştır (43, 50). Bununla birlikte, son zamanlarda bu metotlar zoonotik olan *M. bovis*'e yönelmiştir (43). Klinik örneklerde PCR inhibitörlerinin varlığı ile birlikte, mikobakteriyal hücre duvarlarının intrasellüler doğası ve impermeabilitesi, PCR ile tespiti sınırlar (43). Bu durum az sayıda basilin yaygın olduğu, TB'lu sığırlardan alınan örneklerde ve bazı klinik örneklerde etkenin PCR ile saptanmasında potansiyel kullanımlarını etkiler (10, 43). Amplifikasyonu baz alan PCR saptama kitleri mevcut olmasına rağmen, sığırlarda *M. bovis*'in saptanmasının "in-house" amplifikasyonu baz alan sistemlerde odaklanıldığı görülmektedir (51). Çalışmalarda farklı primerler kullanılmıştır. Bunlar 16S-23S rRNA'dan elde edilen sekanslar, insersiyon sekansları IS6110 ve IS1081, MPB70 ve 38 kDa antijen b gibi MTBC'e spesifik proteinleri şifreleyen genleri çoğaltan primerlerdir (10). Amplifikasyon ürünleri prob'larla hibridizasyon veya jel elektroforez ile analiz ve teyit edilmiştir (52-54).

İnsan TB'unun epidemiyolojik çalışmalarında, insersiyon sekansı IS6110'nun multiple kopyalarda polimorfizmlerin tanımlanması *M. tuberculosis*'in suş tiplendirmesi için alternatif bir metot olarak kabul edilir (55, 56). Ne yazık ki, İngiltere ve diğer ülkelerde sığırlardan elde edilen *M. bovis* izolatlarının çoğunluğunda bu insersiyon sekansın tek bir kopyasının

varlığı veteriner alanında bu tekniğin uygulanmasını sınırlamıştır (55,57). Aynı şekilde, delesyon tiplendirme MTBC'nin farklı türlerinin ayırımında fayda sağlamıştır, fakat İngiltere'deki sığırlardan elde edilen *M. bovis*'in suşları arasında az varyasyon saptanmıştır (55,58).

M. bovis'i MTBC'indeki diğer üyelerden ayırmak için kullanılan DNA analiz teknikleri biyokimyasal yöntemlerden daha hızlı ve daha güvenilirdir (10). *oxyR* genindeki 285 nükleotid pozisyonundaki bir mutasyonun bugüne kadar incelenen MTBC izolatlarının tümünde *M. bovis* için spesifik olduğu bulunmuştur (59).

Genetik fingerprinting (parmak izi) *M. bovis*'in farklı suşlarını ayırt edebilmektedir (10). *M. bovis*'in orijini, nakli ve yayılmasının izlenmesi açısından bu yöntem değer taşır (10). En yaygın olarak kullanılan yöntem spoligotiplendirme ve *M. bovis*'i *M. tuberculosis*'ten ayırt eder (60). Aynı spoligotip'e sahip olan suşları ayırt etmek için diğer yeni teknikler şu an gelişme aşamasındadır (10). Bunlar IS6110 primerini kullanan RFLP, direkt tekrar (DR) lokusu ve PGRS prob (poly G tekrar sekansı) (61), DR ve puce (koyu mor renk) problemlerin kombinasyonunu kullanan RFLP (62) ve VNTR profili (değişken sayıda tandem tekrarlar)'ni içerir (63-65).

2- Gecikmiş tip aşırı duyarlılık testi (tüberkülin testi): Sığır TB'unun saptanması için uluslararası standart yöntem tüberkülin testidir. Tüberkülin mikobakterilerden elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD)'dir (10). Bu test, TB'a karşı oluşan hücresele duyarlılığı ortaya koymak için yapılmakta ve hücreye bağlı olarak şekillenen aşırı duyarlılık reaksiyonları içerisinde yer almaktadır (34). Bununla birlikte, tüberkülin testinde de yanlış pozitiflik ve negatiflik görülmektedir ve yeterli spesifikite ve duyarlılığa sahip değildir (34). Ayrıca, yeni doğum yapmış olan hayvanlarda da hatalı değerlendirmelere neden olabilir (34,66-69). Sığır tüberkülin (PPD) intradermal olarak enjekte edilir ve 3 gün sonra injeksiyon alanında şişme (gecikmiş tip hipersensitivite) saptanır (10). Bu test sadece sığır tüberkülin veya avian ve sığır tüberkülinler kullanılarak karşılaştırılabilir olarak uygulanabilir (10). Tüberkülin testi genellikle boyunun orta kısmına yapılır, fakat kuyruğun kaudal kıvrımına da yapılabilir (10). Tüberküline boyun derisi kaudal kıvrım derisinden daha duyarlıdır. Bu farkı telafi etmek için tüberkülinin daha yüksek dozları kaudal kıvrımda kullanılabilir (10).

İnfekte hayvanlarla temas olduğundan şüphelenildiği durumlarda bu testin kullanılması önerilmez. Çünkü yanlış negatif sonuçlar ve testin duyarlılığında bir azalma meydana gelir (10). Eğer sadece tek bir tüberkülin test kullanılırsa tam eradikasyon güç olur, çünkü yanlış negatif sonuçlar hastalığın erken safhasında ve ileri derecede infekte hayvanlarda meydana gelebilir (10).

Kanı Baz Alan Laboratuvar Testleri

M. bovis'in teşhisinde klasik intradermal tüberkülin testi yanısıra, birkaç yeni kan testi de kullanılır (70). Bu testler genellikle intradermal deri testinin sonuçlarını teyit

etmek veya hatalarını düzeltmek için yardımcı test olarak kullanılırlar (10). Lenfosit profilyasyon testi ve gamma interferon (IFN- γ) testi hücrel immüniteyi, ELISA ise humoral immüniteyi ölçer (10).

1- Lenfosit profilyasyon testi: Test bilimsel değere sahiptir, fakat testin uzun zaman alması ve laboratuvar uygulamasının karmaşık (uzun inkubasyon sürelerine ve radyoaktif nükleotidlerin kullanılmasına gerek duyar) olması gibi dezavantajlarından dolayı rutin teşhiste kullanılmaz (10). Bununla birlikte, test vahşi hayattaki hayvanlarda faydalı olabilir (10). Lenfosit transformasyon testleri ve ELISA'yı içeren kan testinin geyiklerde *M. bovis* infeksiyonunun teşhisinde yüksek derecede duyarlı ve spesifik olduğu bildirilmiştir (71).

ELISA

TB için klinik olarak faydalı serolojik testleri geliştirme çabaları başarısız olmuştur. ELISA hücrel immüniteyi baz alan testler için alternatiften ziyade bir tamamlayıcı test olarak uygulanabilir (72). ELISA'nın tüberkülin testine alternatif olarak spesifite ve duyarlılığının düşük olduğu, fakat anerjik sığır ve geyiklerin tespitinde faydalı olabileceği bildirilmiştir (73). ELISA'nın bir avantajı kolay olmasıdır, fakat hem spesifitesi hem de duyarlılığı çoğunlukla hastalığın seyri esnasında, sığırlarda geç ve düzensiz humoral immun yanıtın gelişmesine bağlı

Kaynaklar

1. Bergey DH, Holt JG, Krieg NAR, Sneath PHA. The mycobacteria. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1994.
2. Hussain T. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. *Crit Rev Microbiol* 2007; 33(1): 15-66.
3. Behr MA. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 2001; 17: 915-922.
4. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47(4): 1236-1245.
5. Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, et al. *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.*: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 1263-1273.
6. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 1995; 76:1-46.
7. Neill SD, Skuce RA, Pollock JM. Tuberculosis--new light from an old window. *J Appl Microbiol* 2005; 98(6):1261-1269.
8. Hope JC, Villarreal-Ramos B. Bovine TB and the development of new vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; [Epub ahead of print].
9. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000; 160(2): 92-106.
10. World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.3., Bovine tuberculosis. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00054.htm. 2004.
11. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü. Tüberkülozis. <http://www.bornova.vet.gov.tr/ikizoonoz.htm>. Erişim tarihi: 07.09.2007.
12. Lima DM, Colares JK, da Fonseca BA. Combined use of the polymerase chain reaction and detection of adenosine deaminase activity on pleural fluid improves the rate of diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest* 2003; 124(3): 909-914.
13. Kısa Ö, Tozkoparan E, Gümrül R, ve ark. Tüberküloz Plörezi Tanısında Mikrobiyolojik Kültür Yöntemlerinin Değeri: 283 Olgunun Analizi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2005, 35(2): 114-118.
14. Pritchard DG. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J Comp Pathol* 1988; 99(4): 357-399.
15. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec.* 1994; 135(6): 134-135.
16. Aydın N, İzgür M, Diker KS, et al. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). *Mycobacterium* İnfeksiyonları. Yardımcı H. (Editör). İke-Emek Yayınları, Ankara, 2006; 87-107.

17. Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet Microbiol* 1991; 28(1): 103-109.
18. Cassidy JP, Bryson DG, Neill SD. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec* 1999; 144(6): 139-142.
19. Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* 1994; 40(1-2): 137-151.
20. Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev Sci Tech* 2001; 20(1): 325-37.
21. Thoen CO, Barletta, R. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: *Mycobacterium bovis* Infections in Animals and Humans, Blackwell Publishing, Ames, IA. 2005.
22. Ritacco V, de Kantor IN. Zoonotic tuberculosis in Latin America. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3299-3300.
23. Thoen C, Lobue P, de Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 2006; 112(2-4): 339-345.
24. OIE, 2005. Bovine Tuberculosis, http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf (accessed 5 April 2005).
25. DEFRA, 2004 *Preparing for a new GB strategy on bovine tuberculosis*, London, UK: DEFRA Publications.
26. DEFRA, <http://www.defra.gov.uk/animalh/tb/stats/expenditure.htm>. Department for Environment, Food and Rural Affairs. Page last modified: 29 October, 2007
27. Reviriego Gordejo FJ, Vermeersch JP. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet Microbiol* 2006; 112(2-4): 101-109.
28. Beals TL, Meyer RM, Ebel ED. Status of the state and federal cooperative bovine tuberculosis (TB) eradication program fiscal year 2004. p. 588-605. In Report of the Committee on Tuberculosis. Proceedings of the 108th Annual Meeting. United States Animal Health Association. 2004.
29. Besser RE, Pakiz B, Schulte JM, et al. Risk factors for positive Mantoux tuberculin skin tests in children in San Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission. *Pediatrics* 2001; 108: 305-310.
30. Dankner WM, Davis CE. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics* 2000; 105: E79.
31. LoBue PA, Betacourt W, Peter C, Moser KS. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 180-185.
32. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(1): 59-70.
33. Yardımcı H. Tüberküloz. <http://64.233.183.104/search?q=cache:MYQhYG-1k3kJ:www.tvhb.org.tr/bilimsel/03.....02.01.2000>.
34. Keskin O. Sığır tüberkülozünün teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve allerjik yöntemle karşılaştırılması, *Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi* 2001; 1(1): 11-18.
35. Solmaz, H., İlhan Z. Aksakal A., ve ark. Van Bölgesinde Sığır tüberkülozünün polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile saptanması. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslar Arası Katılımlı). 26-28 Eylül 2006. Side-Antalya.
36. Gümüşsoy KS, Atasever A, Aydın F, et al. Prevalence of tuberculosis in cattle in Turkey. *Medycyna Wet.* 2007; 63(3): 305-308.
37. Anonim Office International des Epizooties, World animal health situation, Handistatus 2, Erişim: [www.oie.int/hs2/report.asp]. Erişim Tarihi: 31.03.2006.
38. Hayvan Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele Programı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara. 2005; 22-24.
39. Barwinek F, Taylor NM: Assessment of the socio-economic importance of bovine tuberculosis in Turkey and possible strategies for control or eradication, Turkish-German Animal Health Information Project General Directorate of Protection and Control, Ankara. 1996.
40. Anonim, Hayvan Sağlığı Hizmetleri, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Hayvan Sağlığı Danışma Kurulu Toplantısı, Bilgi Notu, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Şap Enstitüsü, Şubat 2006, Ankara.
41. Akay Ö, Aydın N, Arda M, Hazıroğlu R. Bir mink'te saptanan tüberküloz olgusu üzerinde araştırma, *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1984; 31: 463.
42. Akay Ö, Hazıroğlu R, Kutsal O. Bir kedide rastlanan tüberküloz olgusu, *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1985; 32: 438.
43. Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis, an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1-14.
44. Blood DC, Radostis OM (editors). Disease caused by mycobacteria IV. In: *Veterinary Medicine*. 7th ed. London, UK: Bailliere Tindall, 1989; 7: 710-740.
45. Stamp JT. Bovine pulmonary tuberculosis. *J. Comp Pathol* 1948; 58: 9-23.
46. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Mycobacterium* species. *Clin Vet Microbiol Wolfe Publ., Dublin*. 1994; 156-169.
47. Barış İ. Son bilgiler ışığında tüberküloz. *İnfeksiyon Bülteni*, 1996; 23-29.
48. Kubica GP. Clinical microbiology. In: Kubica GP, Wayne LG (Editors). *The mycobacteria, a source book*, Part A. New York, NY: Marcel Dekker, 1984: 680.
49. Eisenach KD. Molecular diagnostics. In: Rutledge C, Dale J, eds. *Mycobacterium-molecular biology and virulence*. Oxford, UK: Blackwell Science, 1998; 161-179.
50. de la Rúa-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2006; 86(2): 77-109.
51. Hughes D. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nat Rev Genet* 2003; 4(6): 432-441.
52. Noredhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium*

- tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol 1996; 34, 2522-2525.
53. Miller J, Jenny A, Rhgyan J, Saari D, Saurez D. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *M. tuberculosis* complex organisms. J Vet Diagn Invest 1997; 9, 244-249.
 54. Miller J, Jenny A, Payeur J. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium bovis* and *M. avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative organisms. Vet Microbiol 2002; 2328: 1-9.
 55. Haddad N, Masselot M, Durand B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. Res Vet Sci 2004; 76(1): 1-18.
 56. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 1990; 28(12): 2668-2673.
 57. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999; 37(8): 2607-2618.
 58. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(6): 3684-3689.
 59. Espinosa de los Monteros LE, Galan JC, Gutierrez M, et al. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *M. tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. J Clin Microbiol 1998; 36: 239-242.
 60. Heifets LB, Jenkins PA. Speciation of *Mycobacterium* in clinical laboratories. In: *Mycobacteria I. Basic Aspects*, Gangadharam PR, Jenkins PA (Editors) Chapman and Hall, New York, USA. 1998; 308-350.
 61. Skuce RA, Brittain D, Hughes MS, Neill SD. Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. J Clin Microbiol 1996; 38: 2469-2474.
 62. O'Brian R, Danilowicz BS, Bailey L, Flynn O, Costello E, O'Grady D, Rodgers M. Characterisation of the *Mycobacterium bovis* restriction fragment length polymorphism DNA probe pUCD and performance comparison with standard methods. J Clin Microbiol 2000; 38: 3362-3369.
 63. Durr PA, Hewinson RG, Clifton-Hadley RS. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2000; 19, 675-688.
 64. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem. Microbiology 1998; 144, 1189-1196.
 65. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-914.
 66. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, ve ark: Özel Mikrobiyoloji. No. 26, Medisan Yayın Serisi, Ankara, 1999.
 67. Burrows W. Textbook of Microbiology, Ed. 20, W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1973.
 68. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Akay Ö. Özel Mikrobiyoloji Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 741, Kars Veteriner Fakültesi Yayınları No: 1, Ders Kitapları Serisi No: 1, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum. 1992.
 69. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC, Winn WC Jr. Diagnostic Microbiology. Ed. 4, J.B. Lippicott Company, Philadelphia. 1992.
 70. Haagsma J. Working Paper on Recent Advances in the Field of Tuberculosis Control and Research. World Health Organization Meeting on Zoonotic Tuberculosis with Particular Reference to *Mycobacterium bovis*, 15 November 1993, Geneva, Switzerland. 1993.
 71. Griffen JFT, Cross JP, Chinn DN, Rogers CR, Buchan GS. Diagnosis of tuberculosis due to *M. bovis* in New Zealand red deer (*Cervus elaphus*) using a composite blood test (BTB) and antibody (ELISA) assays. N Z Vet J 1994; 42, 173-179.
 72. Yearsley D, Egan J, Costello E, O'Reilly PF, Hewinson RG. An evaluation of an anamnestic ELISA for the detection of tuberculouscattle. Irish Vet J. 1998; 51, 303-306.
 73. Plackett P, Ripper J, Corner LA, et al. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. Aust Vet J. 1989; 66 (1): 15-19.
 74. Harboe M, Wiker HG, Duncan JR, et al. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. J Clin Microbiol. 1990; 28(5): 913-921.
 75. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust Vet J 1990; 67(4): 134-137.
 76. Buddle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vaccine 1995; 13: 1123-1130.
 77. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, et al. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust Vet J. 1991; 68(9): 286-290.
 78. Buddle BM, Ryan TJ, Pollock JM, Anderson P, De Lisle GW. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. Vet Microbiol 2001; 80: 37-46.
 79. Çelik Ü, Kocabaş E. Tüberküloz tanısında yeni bir yöntem: Interferon-gama araştırmasına dayanan testler. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 2007; 55 (1): 108-117.