

Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in ELISA ve Dot-Blot ELISA ile Teşhisi*

Ziya İLHAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06110 Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.06.2002

Özet: Bu çalışmada, koyun kan serumlarında *Corynebacterium pseudotuberculosis* antikorlarının saptanması için ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA teknikleri standardize edilerek, enfeksiyonun rutin teşhisinde ve bir tarama testi olarak da laboratuvar çalışmalarında kullanılabilirliklerinin ortaya konulması amaçlandı. Araştırmada, Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne bağlı işletmelerden sağlanan, 100 adedi aşıllı hayvanlardan olmak üzere toplam 471 adet koyun kan serumu incelendi. Serum örneklerinin ekzotoksin ELISA ile 172 (% 36,5)'si, sonike ELISA ile 119 (% 25,2)'u, dot-blot ELISA ile de 181 (% 38,5)'i pozitif olarak saptandı. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar, koyunların kazeöz lenfadenitisinde ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinin, hastalığın rutin teşhisinde ve bir tarama testi olarak da laboratuvar çalışmalarında uygulanabileceğini gösterdi.

Anahtar Sözcükler: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, dot-blot ELISA, ekzotoksin ELISA, koyun, sonike ELISA

Diagnosis of Ovine *Corynebacterium pseudotuberculosis* by ELISA and Dot-Blot ELISA

Abstract: The aim of this study was to standardize the 3 techniques designated as exotoxin ELISA, sonicated ELISA and dot-blot ELISA in the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep sera and to evaluate the usefulness of these techniques in the routine diagnosis and screening of *C. pseudotuberculosis* infection. A total of 471 sheep sera, 100 of which were from vaccinated animals, obtained from agricultural enterprises under the General Directorate of Agricultural Enterprises were examined. Among the 471 serum samples, 172 (36.5%), 119 (25.2%) and 181 (38.5%) sera were positive by the exotoxin ELISA, sonicated ELISA and dot-blot ELISA techniques, respectively. The results obtained in this research showed that exotoxin ELISA, sonicated ELISA and dot-blot ELISA techniques are useful screening tests for the routine diagnosis of caseous lymphadenitis disease in sheep.

Key Words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, dot-blot ELISA, exotoxin ELISA, sheep, sonicated ELISA

Giriş

Kazeöz lenfadenitis (KLA, Pseudotuberculosis), koyun ve keçilerde *Corynebacterium pseudotuberculosis* tarafından oluşturulan, özellikle lenf yumruları ve akciğerler başta olmak üzere diğer iç organlarda da kapsüllü apselerin oluşumu ile karakterize kronik bir enfeksiyondur (1-3). KLA, Türkiye'nin de içinde bulunduğu (4) dünyanın bir çok ülkesinde görülmektedir (5,6). KLA, et ve yapağı veriminin düşmesine, fertilitenin azalmasına ve nadiren de olsa ölümlere sebep olması bakımından ekonomik önemi fazla olan bir enfeksiyondur (2,5,6).

C. pseudotuberculosis'in hücre duvarında bulunan lipit tabakanın, serolojik teşhisinde otoaglutinasyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Etken, fosfolipaz D olarak bilinen

güçlü bir ekzotoksin sentezlemektedir. Lipit tabaka ile birlikte fosfolipaz D, etkenin virulens faktörleridir (3,7). KLA'in indirekt teşhisinde aglutinasyon (3,4,7), agar jel presipitasyon (4), deri testi (8), ELISA (3,9), çeşitli modifiye ELISA teknikleri (6,10) ile sinerjik hemoliz inhibisyon (10) testi kullanılmaktadır.

Bu araştırmada, ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinin koyunlardaki *C. pseudotuberculosis* antikorlarının saptanması için standardize edilmesi, izolasyon bulguları ile testlerin spesifite ve sensitiviteilerinin belirlenmesi, böylece hastalığın rutin teşhisinde ve ayrıca bir tarama testi olarak da laboratuvar çalışmalarında kullanılabilirliklerinin ortaya konulması amaçlandı.

* Bu makale, Prof. Dr. Müjgan İZGÜR'ün danışmanlığında yapılmış olan aynı isimli Doktora Tezinden özetlenmiştir.

Materyal ve Metot

Serum Örnekleri: Çalışmada tesadüfi örnekleme ile seçilen 100 adedi *C. pseudotuberculosis* bakterin + toksiod özellikteki ticari aşı (Case-Bac, Colorado Serum Com., Denver, USA) ile aşılanmış hayvanlardan olmak üzere toplam 471 adet koyun kan serumu incelendi. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM)'ne bağlı 5 farklı işletmenin koyunculuk ünitelerinde bulunan ve yaşları 7 ile 36 ay arasında değişen hayvanlardan alınan serumlar ependorf tüplere alınarak -20 °C'de saklandı. Testlerde 12 adet pozitif, 14 adet negatif kontrol serumu kullanıldı. Pozitif serumlar *C. pseudotuberculosis* izole edilen ve kan serumları hemoliz inhibisyon test (HIT) ile pozitif sonuç veren hayvanlardan, negatif serumlar ise hastalığa ait klinik bulgu göstermeyen ve serumları HIT ile negatif sonuç veren hayvanlardan alındı.

İzolasyon Materyali: Serolojik testlerin sensitivite ve spesifitelerini belirlemek amacıyla, klinik bulgu gösteren 193 hayvandan izolasyon materyali alındı.

Antijenlerin Hazırlanması: Antijenler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'ndan sağlanan *C. pseudotuberculosis* PI-4 suşundan, Maki ve ark. (11)'nin bildirdiği yöntemin modifikasyonu ile hazırlandı. Bu amaçla kısaca, *C. pseudotuberculosis* PI-4 suşu, 250 ml % 0,1 Tween 80 (Difco) içeren Brain Heart Infusion (BHI) brothta (Difco) aerobik ortamda çalkalanarak 72 saat üretildi. Kültür 8000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Oluşan supernatant, önce 0,65 µm (Sartorius) sonra da 0,45 µm'lik (Sartorius) milipor filtreden süzüldü ve 1/10000 oranında merthiolat (Lilly) katılarak, ekzotoksin ELISA antijeni olarak kullanıldı. Santrifüj işleminden sonra elde edilen pelet 0,01 M fosfat buffer solusyonu (PBS, pH 7,2) ile yıkanıp, % 0,6 formaldehit (Merck) ile inaktive edildi. Oda ısısında 6 saat dieter (Merck) ile muamele edildikten sonra, 3 dk sonike (Artek, Sonic 300) edildi. Ürünün yoğunluğu McFarland Tüp No: 5 ($1,5 \times 10^6$ bak/ml)'e ayarlanarak, sonike ve dot-blot ELISA antijeni olarak kullanıldı. Biüret metodu ile ekzotoksin antijeninin total protein miktarı 2,25 mg/100 ml, sonike antijenin protein miktarı ise 2,37 mg/100 ml olarak tespit edildi. Ayrıca, aynı araştırmacıların bildirdikleri metotla hazırlanan 3 farklı sonike antijen de satranç tahtası yöntemi ile test edildi. Bunlar, direkt peletin kullanıldığı tüm hücre antijeni, peletin 3 dk sonike edilmesi ile elde edilen antijen ve peletin 6 saat dieter ile muamelesiyle hazırlanan antijenlerdir.

Her üç ELISA metodunda konjugat olarak peroksidaz enzimi ile işaretli anti-koyun IgG (H + L) (Sigma), substrat olarak da orto-fenilendiamin (Sigma) kullanıldı. Dot-blot ELISA'da katı faz olarak 0,5 x 0,5 cm ebatlarında kesilen, 0,2 µm por çaplı nitroseluloz membran (NCM) (Sigma, N-7892) kullanıldı.

Ekzotoksin ve Sonike ELISA: Her iki test, Maki ve ark. (11)'nin yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi. ELISA'da düz tabanlı, 96 çukurlu, polystyrene mikroplyetler (Greiner) kullanıldı. İdeal antijen, serum ve konjugat dilusyonları, pozitif ve negatif kontrol serumları kullanılarak, satranç tahtası yöntemi ile belirlendi. Mikroplyetin çukurlarına coating bufferde 1/20 oranında sulandırılan sonike ve ekzotoksin antijenlerinden 100 µl konularak +4 °C'de 1 gece bekletildi. Çukurlar % 0,05 Tween 80 içeren PBS (PBS-T, pH 7,2) ile 4 kez yıkandıktan sonra, her göze % 3'lük bovine serum albumininden (BSA, Merck) 100 µl ilave edilerek, 37 °C'de 1 saat inkube edildi. Yıkama aynı şekilde tekrarlandıktan sonra çalışma serumları, % 1 BSA içeren, PBS-T ile 1/10 oranında sulandırılarak gözlere 100 µl konuldu ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Tekrar yapılan yıkama işleminden sonra çukurlara, % 1 BSA içeren, PBS-T ile 1/2500 oranında dilue edilen konjugattan 100 µl konularak oda ısısında 1 saat inkube edildi. Son kez yapılan yıkamadan sonra çukurlara 50 µl substrat ilave edilerek, 10 dk bekletildikten sonra, her göze 50 µl durdurucu solusyon ($1,25 \text{ M H}_2\text{SO}_4$) konulup, absorbans 405 nm'de ELISA okuyucusu (Metertech 960) ile okundu. Çalışmada her pleyt için 14 negatif, 12 pozitif kontrol serumu kullanıldı. Negatif kontrol serumlarının ortalamaları belirlendikten sonra, bu değere 2 standart sapma (SD) değeri de eklenerek, eşik değer optik dansite (OD) olarak tespit edildi. Eşik değer, o pleytteki negatif ortalamasının en az 2 SD üstünde olan serumlarda pozitif kabul edildi.

Dot-Blot ELISA: Antijen, konjugat ve serum sulandırmalarının belirlenmesi için antijen direkt ve PBS-T ile 1/5'den 1/80'e kadar, kontrol serumları direkt ve 1/2'den 1/64'e kadar, konjugat ise 1/125'den 1/2000'e kadar çift katlı sulandırıldı. Pozitif ve negatif serum arasındaki farkın en iyi görüldüğü en yüksek antijen, konjugat ve serum sulandırmaları ideal olarak kabul edildi. Test, Prodhan ve ark. (10)'nin bildirdikleri yöntemin modifikasyonu ile yapıldı. Testte 80 çukurlu plastik pleytlerden yararlanıldı. NCM'nin orta noktalarına 2,5 µl sonike antijen (protein oranı 2,37 mg/100 ml)

damlatılıp, kurutulduktan sonra kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı. Serum ve konjugatın sulandırılması ile yıkamalarda % 0,05 Tween 20 (Sigma) içeren PBS-T (pH 7,2)'den yararlanıldı. NCM, pleytin çukurlarına alınarak, çukurlara % 5 yağsız süt tozu (Pınar) içeren PBS-T solusyonundan 0,5 ml eklenerek, 37 °C'de 45 dk bekletildi. NCM, beşer dakika süren aşamalarla 4-5 kez PBS-T ile yıkandıktan sonra, kontrol ve test serumlarının 1/8'lik dilusyonlarından çukurlara 0,5 ml konulup, 37 °C'de 1 saat inkube edildi. Aynı şekilde yapılan yıkama işleminden sonra, her çukura 1/250'lik konjugattan 0,5 ml eklenerek, 37 °C'de 45 dk bekletildi. Son yıkamayı takiben çukurlara 0,5 ml taze hazırlanmış substrat konularak, oda ısısında karanlık bir ortamda 10-30 dk bekletildikten sonra NCM distile su ile yıkanıp, kurutuldu. Sonuçlar pozitif ve negatif serumlar da dikkate alınarak, çıplak gözle değerlendirildi ve antijen damlatılan orta bölgedeki koyu renk oluşumu pozitif olarak kabul edildi (Şekil 1).

İstatistiksel Değerlendirme: Ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA testlerinin sonuçları, ki-kare testi (12) ile değerlendirildi.

İzolasyon ve İdentifikasyon: Örnekler kanlı ve BHI agara ekilerek, 37 °C'de 5 gün inkube edildi. Etkenler, biyokimyasal özelliklerine göre identifiye edildi (13).

Sensitivite ve Spesifite: Testlerin sensitivite ve spesifitesi *C. pseudotuberculosis* izole edilen 42 hayvan dikkate alınarak belirlendi (14).

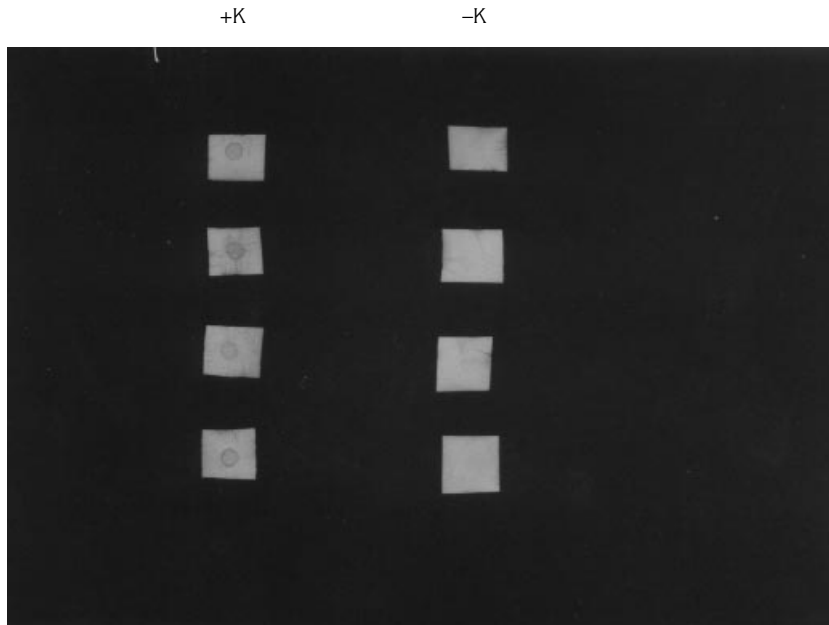
Bulgular

Serolojik Test Sonuçları: İncelenen 471 koyun kan serumundan, ekzotoksin ELISA ile 172 (% 36,5)'si pozitif, 299 (% 63,5)'u negatif; sonike ELISA ile 119 (% 25,2)'u pozitif, 352 (% 74,8)'si negatif; dot-blot ELISA ile 181 (% 38,5)'i pozitif, 290 (% 61,5)'i ise negatif olarak değerlendirildi. Pozitif serum yüzdeleri arasındaki fark toksin ELISA ile dot-blot ELISA arasında istatistiksel olarak önemli bulunmazken ($P > 0,05$), toksin ELISA ile sonike ELISA ve sonike ELISA ile dot-blot ELISA arasındaki farklar önemli ($P < 0,001$) bulundu (Tablo 1).

Aşısız hayvanlardan sağlanan 371 serumdan, ekzotoksin ELISA ile 96 (% 25,8)'si, sonike ELISA ile 82 (% 22,2)'si, dot-blot ELISA ile 122 (% 32,8)'si pozitif bulundu (Tablo 2).

Aşılı hayvan serumlarından toksin ELISA ile 76 (% 76)'sı, sonike ELISA ile 37 (% 37)'si, dot-blot ELISA ile de 59 (% 59)'u pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 3).

Her üç testle 471 serum örneğinden 79 (% 16,7)'u pozitif, 215 (% 45,6)'i negatif; aşılı hayvanlara ait 100



Şekil 1. Pozitif ve negatif kontrol serumların dot-blot ELISA'da ortofenilendiamin ile göstermiş olduğu reaksiyon (+K, pozitif serum kontrolü; -K, negatif serum kontrolü).

Tablo 1. İncelenen 471 serumda *C. pseudotuberculosis* antikorlarının ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen toplu sonuç ve oranları (%).

Test	Pozitif serum		Negatif serum		Ki kare değeri
	n	(%)	n	(%)	
Toksin ELISA	172	(36,5)	299	(63,5)	Toksin/sonike ELISA 13,96***
Sonike ELISA	119	(25,7)	352	(74,8)	Toksin/dot-blot ELISA 0,36 ⁺
Dot-blot ELISA	181	(38,5)	290	(61,5)	Sonike/dot-blot ELISA 18,8***

*** P < 0,001, ⁺ P > 0,05Tablo 2. Aşısız 371 kan serumunda *C. pseudotuberculosis* antikorlarının ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen sonuç ve oranları (%).

Test	Pozitif serum		Negatif serum		Ki kare değeri
	n	(%)	n	(%)	
Toksin ELISA	96	(25,8)	275	(74,1)	Toksin/sonike ELISA 1,44 ⁺
Sonike ELISA	82	(22,2)	289	(77,8)	Toksin/dot-blot ELISA 4,39*
Dot-blot ELISA	122	(32,8)	249	(67,2)	Sonike/dot-blot ELISA 10,81**

* P < 0,05, ** P < 0,01, ⁺ P > 0,05Tablo 3. Aşılı 100 kan serumunda *C. pseudotuberculosis* antikorlarının ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA ile elde edilen sonuç ve oranları (%).

Test	Pozitif serum		Negatif serum		Ki kare değeri
	n	(%)	n	(%)	
Toksin ELISA	76	(76)	24	(24)	Toksin/sonike ELISA 30,94***
Sonike ELISA	37	(37)	63	(63)	Toksin/dot-blot ELISA 6,58*
Dot-blot ELISA	59	(59)	41	(41)	Sonike/dot-blot ELISA 9,69**

* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

serumdan 33 (% 33)'ü pozitif, 16 (% 16)'sı negatif; aşısız hayvanlara ait 371 örnekten 36 (% 12,3)'sı pozitif, 325 (% 87,7)'i ise negatif bulundu.

İzolasyon Sonuçları: Toplam 193 koyunun 42 (% 21,7)'sinden *C. pseudotuberculosis* izole edildi. Etken 27 (% 64,2) hayvana ait materyallerden saf olarak izole edilirken, 15 (% 35,7) hayvana ait örneklerden ise *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve bazı Gram negatif bakterilerle birlikte üredi.

Bu çalışmada, *C. pseudotuberculosis* izole edilen 42 hayvan dikkate alındığında, sensitivite ve spesifite en yüksek olarak ekzotoksin ve sonike ELISA teknikleri birlikte değerlendirildiğinde tespit edildi (Tablo 4).

Tartışma

C. pseudotuberculosis ile infekte ve reaktör hayvanların tespitine yönelik güvenilir, pratik bir indirekt teşhis yönteminin geliştirilmesi yönünde bir çok çalışma

Tablo 4. Koyunlarda *C. pseudotuberculosis* antikorlarının tespitinde, ekzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinin sensitivite (Sn)/spesifite (Sp) ölçüleri.

Serum	Toksin ELISA		Sonike ELISA		Toksin+Sonike ELISA		Dot-blot ELISA	
	Sn (%)	Sp (%)	Sn (%)	Sp (%)	Sn (%)	Sp (%)	Sn (%)	Sp(%)
Aşısız (n: 131)	86,3	63,7	84,2	60,3	87,7	65,9	81,8	66,6
Aşılı (n: 62)	84,4	65,7	83,3	64,9	91,6	66,6	84,2	61,7
Toplam (n: 193)	82,9	65,9	80,0	64,2	93,3	70,8	83,3	65,5

yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu etkenin ekzotoksinine karşı oluşan antikorları saptamaya yöneliktir. Söz konusu testlerin spesifite ve sensitivitelevlerinin düşük olmasının yanında, özellikle hemoliz testlerinin standardizasyonları da güçtür (3,6). KLA'in teşhisinde ELISA tekniğinin kullanımı son yıllarda artış göstermektedir. ELISA'da kullanılan antijenler farklı tekniklerle hazırlanmaktadır (6,15-17). Bu çalışmada, ekstrakte edilen lipid tabakası dışındaki 3 farklı sonike antijen Maki ve ark. (11)'nin bildirdiği şekilde hazırlanarak, satranç tahtası yöntemi ile denendi. En iyi sonuç veren antijenin, 6 saat dietilelerle ekstraksiyon ve 3 dk sonikasyon yapılarak elde edilen antijen olduğu saptandı. Ayrıca antijenlerin protein miktarlarının literatür verisiyle yakın değerlerde olduğu görüldü (6).

Chikamatsu ve ark. (18), klinik olarak sağlıklı görünen ve KLA'e karşı aşılanmamış 1186 koyun kan serumundan 466 (% 39,3)'sının toksin ELISA, 330 (% 27,8)'unun da immumodifüzyon testle pozitif sonuç verdiğini ve testler arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada pseudotuberculosis klinik semptomları gösteren toplam 52 koyundan 48 (% 92,3)'i toksin ELISA, 42 (% 80,7)'si de HIT ile pozitif bulunmuştur (15). Ellis ve ark. (16) ise enfeksiyona ait klinik bulgular gösteren 104 koyundan 63 (% 60,5)'ünü ekzotoksin ELISA, 78 (% 75,0)'ünü de sonike ELISA ile pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, aşılanmamış koyunlara ait pozitif serum oranlarının (Tablo 2), diğer araştırmacıların bulgularından daha düşük olduğu görülmektedir (15,16,18). Chikamatsu ve ark. (18)'nin yaptığı çalışmada elde edilen yüksek pozitiflik oranı, hayvanların yaşı ile ilgili olabilir. Söz konusu çalışmada süt kuzusu dahil, oldukça farklı yaştaki hayvanlar değerlendirilmiştir. Diğer iki çalışmada ise materyaller, klinik olarak KLA semptomları gösteren

koyunlardan alınmıştır. Bu durumda söz konusu araştırmalarda pozitif hayvan sayısının yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur.

C. pseudotuberculosis aşısı ile aşılanmış koyunlardaki antikor titreleri ekzotoksin ve sonike ELISA ile incelenerek, toksin ELISA ile daha fazla hayvanda antikor yanıtı saptandığı bildirilmiştir (9,17). Bu çalışmada da ekzotoksin ELISA ile pozitif saptanan serum sayısının, sonike ELISA ile pozitif bulunan serum sayısından yüksek olması (Tablo 3) diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlikler göstermektedir. Bu benzerlik hayvanların toksoit aşılarla aşılanmış olması ile ilgili olabilir.

Prodhan ve ark. (10), 145 adet 2 yaşlı keçi serumundan 27 (% 18,6)'sini dot-blot ELISA, 36 (% 24,8)'sini da sinerjik hemoliz inhibisyon (SHI) test ile pozitif bulmuşlardır. Testler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli bulunduğu çalışmada ayrıca, KLA'in teşhisinde dot-blot ELISA'nın SHI testinden daha güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada dot-blot ELISA ile pozitif olarak değerlendirilen serum örneklerinin (Tablo 1), Prodhan ve ark. (10)'nin oranından daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu fark, her iki çalışmada çalışılan serumların farklı hayvan türlerine ait olması, sürülerde KLA prevalensinin koyun ve keçilerde muhtemelen farklı oranlarda olması ile açıklanabilir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan antijen ile Prodhan ve ark. (10)'nin kullandıkları antijenin aynı olmaması, elde edilen bulguların farklılığına neden olabilecek bir başka faktör olarak düşünülebilir.

C. pseudotuberculosis antikorlarının saptanmasında kullanılan testlerin sensitivite, spesifite ve güvenilirlikleri ile ilgili oldukça farklı sonuçlar bildirilmiştir (10,11,18-20). Ekzotoksin ve sonike ELISA ile ilgili bu çalışmada elde edilen bulgular (Tablo 4), bazı araştırmalarla uyumlu bulunurken (11,20), sensitivitenin bazı çalışmalardan

(18,19) daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, bu çalışmada kullanılan antijenlerin daha ileri düzeyde purifiye edilmesinden kaynaklanmış olabilir. Bu araştırmada dot-blot ELISA ile ilgili sensitivite ve spesifite sonuçlarının, Prodhan ve ark. (10)'nın bulgularından daha düşük olması, araştırmacıların çalışmalarını farklı hayvan türü ile yapmış olmaları veya hayvanların subklinik bir *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonu geçiriyor olmaları ile ilişkili olabilir.

Bu çalışmada her üç test, aşı ve aşızsız koyunlarda etkene karşı oluşan antikorların saptanması amacıyla standardize edildi. Gerçekleştirilen bu araştırma ile Türkiye'de, pseudotuberculosis ile ilgili olarak her üç teknik gerek ayrı ayrı ve gerekse birlikte olarak ilk kez kullanılmış oldu. Yapılan yazılı literatür taramasında, *C. pseudotuberculosis* antikorlarının saptanmasında sonike antijen kullanılarak yapılan dot-blot ELISA tekniğinin, ilk

kez bu çalışmada gerçekleştirilmiş olduğu görüldü. Bu teknikle ilgili çalışmaların daha fazla sayıda örnekle ve diğer testlerle karşılaştırmalı olarak yapılması sonucunda, KLA'le ilgili yeni bir teknik olarak dot-blot ELISA kullanılabilecektir. KLA'in teşhisinde sonike ve ekzotoksin ELISA tekniklerinin birlikte kullanılması durumunda, testlerin spesifite ve sensitivitelerinin daha yüksek olduğu ortaya konuldu. Ayrıca ekzotoksin ELISA'nın, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinden daha güvenilir sonuçlar verdiği görüldü. Dot-blot ELISA'nın hastalığın teşhisinde ilave bir teşhizata ihtiyaç duymaması nedeniyle bir çok laboratuvar da yapılabileceği kanısına varıldı.

Koyunların pseudotuberculosis ile ilgili olarak, ekonomik ve pratik olan ELISA tekniklerinin hastalığın rutin teşhisinde ve ayrıca bir tarama testi olarak da laboratuvar çalışmalarında kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Stoops, S.G., Renshaw, H.W., Thilsted, J.P.: Ovine Caseous Lymphadenitis: Disease Prevalence, Lesion Distribution and Thoracic Manifestations in a Population of Mature Cullled Sheep from Western United States. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45: 557-561.
2. Batey, R.G., Speed, C.M., Kobes, C.J.: Prevalence and Distribution of Caseous Lymphadenitis in Feral Goats. *Aust. Vet. J.* 1986; 63: 33-36.
3. Brown, C.C., Olander, H.J.: Caseous Lymphadenitis of Goats and Sheep: A Review. *Vet. Bull.* 1987; 57: 1-11.
4. Aydın, N.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* ovis Suşlarının ve Ekzotoksinlerinin Antijenik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay. 331. 1977; Doktora Tezi. Ankara.
5. Kuria, J.N.K., Holstad, G.: A Seroepidemiological Investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Sheep Flocks in Southern Norway. *Acta Vet. Scand.* 1989; 30: 107-108.
6. Ter Laak, E.A., Bosch, J., Bijl, G.C., Screuder, B.E.C.: Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunoblot Analysis Used for Control of Caseous Lymphadenitis in Goats and Sheep. *Am. J. Vet. Res.* 1992; 53:1125-1132.
7. Keskintepe, H.: Stabilization of *Corynebacterium ovis* Antigens for Serum Agglutination Test. *Firat Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1976; 3: 84-93.
8. Doty, R.B., Dunne, H. W., Hokanson, J.F., Reid, J.J.: A Comparison of Toxins Produced by Various Isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the Development of a Diagnostic Skin Test for Caseous Lymphadenitis of Sheep and Goats. *Am. J. Vet. Res.* 1964; 25: 1679-1684.
9. Piontkowski, M.D., Shivers, D.W.: Evaluation of a Commercially Available Vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for Use in Sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988; 212: 1765-1768.
10. Prodhan, M.A.M., Olander, H.J., Gardner, I.A.: A Comparison of Dot-Blot Assay with the Synergistic Haemolytic Inhibition Test in Goats Naturally Infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Res. Comm.* 1993; 17: 193-196.
11. Maki, L.R., Shen, S.H., Bergstrom, R.C., Stetzenbach, L.D.: Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infections in Sheep Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46: 212-214.
12. Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V.: Biyoistatistik. s. 156-159. Hatiboğlu Yay. Ankara. 1997.
13. İzgür, M., Akan, M., İlhan, Z.: Koyunlarda Kazeöz Lenfadenitis Olgularından İzole Edilen Etkenler. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1999; 46: 43-50.
14. Thrusfield, M.: *Veterinary Epidemiology*. Butterworth Co. London. 1986, p. 175-185.
15. Kuria, J.N.K., Holstad, G.: Serological Investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Sheep- Correlation between the Haemolysis Inhibition Test and the ELISA Test. *Acta Vet. Scand.* 1989; 30: 109-110.
16. Ellis, J.A., Hawk, D.A., Mills, K.W., Pratt, D.L.: Antigen Specificity and Activity of Ovine Antibodies Induced by Immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991; 28: 303-316.

17. Paton, M.W., Sutherland, S. S., Rosa, I.R., Hart, R.A., Mercy, A.R., Ellis, T.M.: The Spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection to Unvaccinated and Vaccinated Sheep. Aust. Vet. J. 1995; 72: 266-269.
18. Chikamatsu, S., Zhao, H.K., Kikuchi, N., Hiramune, T.: Seroepidemiological Survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Sheep in Japan Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunodiffusion. Jpn. J. Vet. Sci. 1989; 51: 887-890.
19. Sutherland, S.S., Ellis, T.M., Paton, M.J., Mercy, A.R.: Serological Response of Vaccinated Sheep after Challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Aust. Vet. J. 1992; 69: 168-169.
20. Sutherland, S.S., Ellis, T.M., Mercy, A.R.: Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Sheep. Aust. Vet. J. 1987; 64: 263-266.