



## Sığırlarda Trichophytosis'in teşhisinde ELISA'nın kullanılabilirliğinin araştırılması

Hülya Kaplan<sup>1</sup>, Oktay Keskin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretimi San. ve Tic. A.Ş., Şanlıurfa, Türkiye  
<sup>2</sup> Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 63000, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 17.07.2020, Kabul tarihi / Accepted: 02.12.2020

**Özet:** Bu çalışmada, trichophytosisin serolojik teşhisinde Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'nın kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada geliştirilen ELISA ile tanısıl duyarlılık %95,24 ve tanısıl özgüllük %100 olarak bulundu. Şanlıurfa ve civarında daha önce hastalık tespit edilen 4 sığır sürüsündeki sığırlardan alınan kan serumları ELISA ile test edildi. Buna göre toplam 360 sığır serumu örneğinin 289'u (%80,3) pozitif bulundu. Sonuç olarak ELISA'nın; tanıda kullanılan izolasyon yöntemi uzun süre aldığından, kısa sürede teşhis yapabilecek bir tanı yöntemi olduğu ve bu bağlamda hastalığın teşhisine büyük oranda katkı sağlayacağı kanısına varıldı. Ayrıca çalışmada elde edilen yüksek seropositivite oranı, serumlar her ne kadar daha önce hastalık görülen çiftliklerden alınmış olsa da, yine de hastalığın bölgede yaygın olduğunu ve gerekli kontrol önlemlerinin alınmasının önemli olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** ELISA, mantar, sığır, *Trichophyton verrucosum*, Trichophytosis.

### Evaluation of usage ELISA for diagnosis in cattle Trichophytosis

**Abstract:** The aim of this study was to determine the utility of ELISA in the serological diagnosis of trichophytosis. In this study, diagnostic sensitivity and specificity was found as 95.24% and 100%, respectively. Serum samples from four cattle facilities, in which the disease previously were seen, located in Şanlıurfa and its vicinity were tested with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). According to the results, 289 out of 360 (80.3%) serum samples were found as positive. As conclusion, it was thought that Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) could be a useful tool for serologic diagnosis of the trichophytosis since culture of the agent is a quite timely process. In this regard, it is evaluated that to use Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) will contribute highly to the diagnosis of the disease. On the other hand, high seropositivity rate obtained in the study indicates that trichophytosis is endemic in the region and the importance to take necessary control measures although these serum samples were collected from the farms previously infected with *Trichophyton verrucosum*.

**Keyword:** Cattle, ELISA, Fungi, *Trichophyton verrucosum*, Trichophytosis,

### Giriş

Mantarlar; sporla çoğalan, genellikle hareketsiz, kemoorganotrofik ve klorofil içermeyen ökaryotik organizmalardır. Morfolojik form bakımından mantarlar; filamentöz küf, tek hücreli maya ve maya benzeri bir form (psödoipliksi form) olmak üzere 3'e ayrılırlar. Pleomorfik ve küresel, eliptik formda olan mayalarda çoğalma tomurcuklanma şeklinde olur. Tomurcuklar uzar kopmazsa hif benzeri bir zincir üretirler (psödohif). Küfler ise miselyum ve üreme kısmı (sporlar) olarak 2 ana bölüme ayrılmıştır. Küf miselyumları hif olarak bilinen filamentlerden oluşur (Arda 2000).

Dermatofitozis; insan ve hayvanlarda *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* türleri tarafından meydana getirilen mantar enfeksi-

yonlarıdır. Bu türler uygun ortamda üretildiklerinde morfolojik olarak hifalar ile karakterize küflerdir (Deacon 1988). İnsan ve hayvanlarda dermatofit etkenlerinin meydana getirdiği enfeksiyonlar 'Ringworm' olarak da tanımlanmaktadır (Biberstein 2004). *Trichophyton*lar pürüzsüz duvarlı, mikrokonidia ve makrokonidia üretirler. Mikrokonidialar 2-3 µm büyüklüğünde, makrokonidialar iğ biçimli fuziform şeklinde ince duvarlıdır. *Trichophyton*lar tırnak, saçlı deri ve saçsız deride dermatofitoz enfeksiyonu oluşturabilirler. Genellikle 7-10 günde ürerler. Üreyen koloniler beyaz-krem renkte, koloni tabanı kırmızı-kahve, sarı renktedir (Simpanya 2000; Tel 2005).

Sığırlarda en sık görülen dermatofitoz etkeni *T. verrucosum*'dur. Klinik olarak deri lezyonları ile ka-

\* Bu makale 1. Yazarın aynı adlı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

**Yazışma adresi / Correspondence:** Hülya Kaplan, Akçakale yolu üzeri Eyyübiye Kampüsü Eyyübiye, Şanlıurfa, e-Posta: okeskin@harran.edu.tr

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0002-5400-5144 • <sup>2</sup>0000-0002-5977-7872

rakterizedir. Deride oluşturduğu lezyonlar dışında, kontrol ve önleminin pahalı ve zor olması sebebiyle sürü yönetimi ve ekonomisi açısından önemlidir. Sürü içinde bulunan hayvanlarda hastalık var ise hasta hayvanlardan sağlıklı hayvanlara yayılması çok kolaydır. *T. verrucosum* sporları buldukları ortamda yaklaşık olarak 2-3 yıl canlı kalabilirler. Zoonozdurlar. Yapılan araştırmalar sonucu İsveçli ve İsviçreli çiftçilerde sırasıyla %29 ve %74 mantar enfeksiyonu görüldüğü bildirilmiştir (Haab 1991; Carlsson 1993). *T. verrucosum* sıcak havayı, nemi ve kirliliği seven fakültatif bir etkidir. Hızlıca yayılır ve canlılığını uzun süre korur. Sığırlarda trichophytosis hem hayvan sağlığı açısından hem de zoonoz olması sebebiyle insan sağlığı açısından büyük bir problemdir. Kontrol ve tedavi için aşılama en iyi seçenektir (Morrell 2011; Davidov 2018).

Trichophytosis; enfeksiyon şiddetine ve konakçının bağışıklığına bağlıdır. Trichophytosis tespit edilen sığırlarda gözlenen belirgin klinik lezyonlar alopesi, eritema, kabuklaşma, halka biçiminde lezyonlar, vezikül ve papüllerle karakterizedir (Weber 2000). Enfekte sığırlarda görülen klinik belirtiler, lokal olarak boyun ve kafa bölgesinde gri veya beyaz değişiklikler ile karakterizedir. Görülen lezyonlar 10-50 mm boyutundadır. Lezyon görülen bölgede kıl dökülmesi ve kepekleşme çok fazladır. Hayvanlarda ortalama olarak 10-30 lezyon görülebilir ancak bu sayı 50 lezyona kadar çıkan hayvanlar da olabilir (Sayfarth 2011).

*T. verrucosum* identifikasyonu için trichophytosisli sığırların lezyonlu bölgeleri %70 alkol ile temizlenir. Daha sonra lezyonların kenar kısımlarından alınan deri kazıntıları ve kıl örnekleri Saboraud Dextrose Agar (SDA) besiyerine ekilerek inkubasyona bırakılır. Üreyen koloniler *T. verrucosum* yönünden incelenir (Çenesiz 2007).

Zahran ve ark. (2013) *T. verrucosum* enfeksiyonuna karşı yapılan aşılama öncesi ve aşılama sonrası bağışıklık cevabının belirlenmesi için humoral immüniteyi değerlendirmek amacıyla ELISA tekniğini kullanmışlardır.

Bagut ve ark. (2013), sığırlarda mantar enfeksiyonunun serolojik tanısı için bir ELISA yöntemini geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Bu amaçla direkt mikroskopi, floresan mikroskopi ve PCR ile ringworm enfeksiyonu olan hayvanlarda hastalık doğrulanmış, enfekte ve sağlıklı hayvanların serum örnekleri toplanmıştır. Antijen olarak *T. verrucosum*'a filogenetik olarak oldukça yakın olan iki farklı rekombinant proteini kullanmışlardır. Sonuçlar değerlendirildiğinde genel olarak, rekombinant antijenler ile ya-

pılan ELISA'nın enfekte olmuş hayvanlar ile sağlıklı hayvanları ayırmada başarılı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar geliştirilen ELISA'nın bir antijen ile %89,6 duyarlılık, %92,7 özgüllük, diğer antijen ile %88,1 duyarlılık ve %90,9 özgüllük değerine sahip bulunduğunu bildirmişlerdir.

Zrimsek ve ark. (1999), *T. mentagrophytes* ile enfekte tavşanlar için bir indirekt ELISA geliştirmiş ve tanısallık potansiyeli değerlendirmişlerdir.

Gudding ve ark. (1995), sığır dermatofitozisinin immunoprofilaksisini araştırmak için buzağı ve tavşanları *T. verrucosum* ile aşılamışlardır. Aşılama sonrasında hücresel yanıtı değerlendirmenin yanı sıra humoral yanıtı değerlendirmek için de ELISA ile antikor üretimini belirlemişlerdir.

Kane ve ark. (1978), *T. verrucosum*'un erken teşhisi ve tanımlanması için Trichophyton türlerini (*T. verrucosum*, *T. schoenleinii*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. megninii*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. equinum*), Brom Creosol Purple Casein Yeast extract Agara ekim yaparak 28°C'de 10 gün gözlemlemişlerdir. *T. verrucosum* ile diğer Trichophyton türlerinin karşılaştırılması sonucu *T. verrucosum*'un benzersiz sınırlı büyümesine ve geniş hidroliz zonu oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Elad ve ark. (1995), *T. verrucosum*'a karşı aşılama sonrası buzağuların serumlarında anti-*T. verrucosum* antikorlarının varlığını belirlemek için ELISA tekniğini başarıyla kullanmışlardır.

Mikaili ve ark. (2012), Trichophyton agarda ürettikleri *T. verrucosum* izolatını immunizasyon amaçlı 3 kere boyun bölgesinden kas içi uygulamışlardır. Bu aşılı hayvanlar ile aşısız kontrol grubu hayvanların serumlarında ELISA ile antikor titrelerini saptayarak humoral yanıtı değerlendirmişlerdir.

Bu çalışmada, trichophytosisin serolojik teşhisinde ELISA'nın kullanılabilirliği amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

**İzolasyon Örnekleri:** İzolasyon amacıyla Şanlıurfa ili ve çevresindeki ilçelerde bulunan işletmelerde klinik olarak trichophytosis şüpheli hayvanlarda deri lezyonları bulunan 6-12 aylık Holstein ırkı dişi hayvanlardan, lezyonlu bölgeden steriliteye uyularak deri kazıntısı ve kıl örnekleri alındı. Alınan örnekler laboratuvara getirilerek izolasyon için kullanıldı.

**Pozitif Kontrol Serumları:** Deri kazıntısı ve kıl örneği alınarak izolasyon yapılan kültür pozitif hayvanların bulunduğu enfekte çiftlikten 40 adet hayvandan, duyarlılığın saptanmasında pozitif referans olarak

kullanılmak üzere kan alınmıştır. Ayrılan serum örnekleri, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

**Negatif Kontrol Serumları:** Testin özgüllüğünün ve eşik (cutoff) değerinin saptanmasında negatif referans kontrol olarak aşısız ve trichophytosis geçmişi olmayan annelerden doğan 100 adet buzağıdan doğumdan hemen sonra kan alınarak serumları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

**Test Serum Örnekleri:** ELISA'da test edilmek üzere 4 işletmeden klinik olarak trichophytosis şüpheli 360 adet hayvandan kan alınarak serumları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

İzolasyon ve identifikasyon amacıyla, klinik olarak trichophytosis teşhisi konulan hayvanlar belirlendi. Deri kazıntıları ve kıl örnekleri alındı. Alınan deri kazıntıları ve kıl örnekleri direkt mikroskopi ve makroskopik olarak incelendi.

Direkt mikroskopi olarak; temiz bir lam üzerine Lakto fenol pamuk mavisini konulduktan sonra üzerine pens ile 5-6 kıl örneği bırakıldı ve lamelle kapatılarak mikroskop altında (200 X) incelendi. Aynı zamanda lam üzerine alınan kıl örneklerinin üzerine %10-20 KOH solüsyonu damlatılıp hafifçe ısıtıldıktan sonra 30-60 dakika beklenerek mikroskopta (200 X) incelendi (Arda 2000).

Makroskopik olarak; laboratuvara getirilen deri kazıntıları SDA besiyerine ekildi ve 20-25°C'de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. Üreyen koloniler 3-4 günde bir gözlemlendi. İnkubasyon sonunda toplanan kültürler identifikasyon amacıyla *T. verrucosum* spesifik besiyerlerine ekimleri yapılarak 20-25°C'de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda üreme saptanan mantar kolonilerinin; üreme hızları, morfolojileri, yüzey renkleri, tabandaki pigmentleri ve mikroskopik incelemede hiflerin yapısı, makrokonidyum ve mikrokonidyumların varlığı göz önüne alınarak identifikasyonları gerçekleştirildi (Kiraz 1988; Thomas 2018). Oluşan kolonilerin makroskopik ve mikroskopik morfolojileri değerlendirilerek etkenlerin identifikasyonları yapıldı (Çenesiz 2007).

***T. verrucosum* Suşunun Antijen Üretimi İçin Çoğaltılması:** İdentifikasyon ve izolasyon sonucu üreyen *T. verrucosum* kolonilerden Tiamin ve İnositol ile hazırlanmış SDA besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda SDA üzerinde üreyen *T. verrucosum* kültürleri steril pens ile steril şişe içine toplandı. Toplanan *T. verrucosum* kültürlerinin canlılık sayımı için dilüsyonları yapıldı (Rybnikár ve ark. 2007).

**ELISA Antijenin Hazırlanması ve Belirlenmesi:** ELISA için en uygun antijenin belirlenmesi amacıyla 3 farklı şekilde antijen hazırlandı.

Bu amaçla üretimi yapılan canlı *T. verrucosum* suşu 50 ml cam şişelere aktararak 3'e bölündü.

1. Antijenin hazırlanmasında üretilen *T. verrucosum* antijeni 121°C'de otoklav edildi.

2. Antijenin hazırlanmasında dondurma-çözdürme metodu kullanıldı. Bu amaçla üretilen antijen sıvı azot (-196°C) tankı içerisine 30 dakika, sonrasında oda koşullarında 30 dakika olacak şekilde 4 kere dondurulup çözdürülerek hazırlandı.

3. Antijenin hazırlanmasında dondurma-çözdürme metodu bu kez -20°C'de gerçekleştirildi. Bu yöntemde bekleme süreleri 60 dakika olarak belirlendi.

Sonuç olarak; 3 farklı şekilde hazırlanmış olan *T. verrucosum* antijenleri ile ELISA çapraz titrasyon (checkerbord) yapıldı. Bu amaçla antijenin ve serumun iki katlı dilüsyonları kullanıldı ve en uygun antijen dilüsyonu belirlendi. Belirlenen bu antijen dilüsyonunu antijenlerin ELISA pleytlerini kaplamada kullanıldı.

**İndirekt ELISA:** Çalışmada kullanılacak olan ELISA solid faz antijeni antijen kaplama tampon solüsyonu içinde 1/50 oranında sulandırılarak 96 gözlü tabanlı maxisorppolistiren pleytlere (NUNC 692620) 100 µl olacak şekilde taksim edildi. Daha sonra antijenle kaplanan pleytlar 4°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında pleytlar %0,05 Tween 20 içeren phosphate buffered saline (PBS) (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Daha sonra %3 yağsız süt tozu ile hazırlanan PBS solüsyonu ile 1 saat süre ile çalkalayıcıda blokladılar. Bloklama sonrası pleytlar 4 kez yıkandıktan sonra 1/100'lük dilüsyonları yapılan pozitif ve negatif kontrol serumları pleyt kuyucuklarına 100 µl olacak şekilde konuldu. Pleytların üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile çalkalayıcı üzerinde inkübasyonları yapıldı. Pleytlar tekrar 4 kez aynı yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, horseradishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini dilüsyon çözeltisinde üretici firmanın belirttiği dilüsyonda dilüe edilerek tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytlar tekrar 4 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0,03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edildi. Pleytlar oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek pleytlar otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Testin eşik değerinin belirlenme-



sinde negatif absorbans değerlerinin ortalaması artı 3 standart sapma alındı. Belirlenen eşik değeri, farklı işletmelerden alınan test serumlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

## Bulgular

Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ve çevresindeki ilçelerde bulunan işletmelerde klinik olarak trichophytosis tanısı konulan hayvanlardan alınan deri kazıntısı ve kıl

örnekleri ile kan serumları kullanıldı. Testin özgüllüğü ve eşik değerinin belirtilmesinde negatif referans kontrol olarak aşısız ve trichophytosis geçirmiş olmayan annelerden doğan 100 adet buzağıdan alınan kan serumları kullanıldı.

**Klinik Örnekler:** Şanlıurfa ve çevresinde bulunan işletmelerde tespit edilen Trichophytosis'li hayvanların lezyonlu bölgelerinden yöntemine uygun olarak deri kazıntısı ve kıl örnekleri laboratuvara getirildi.

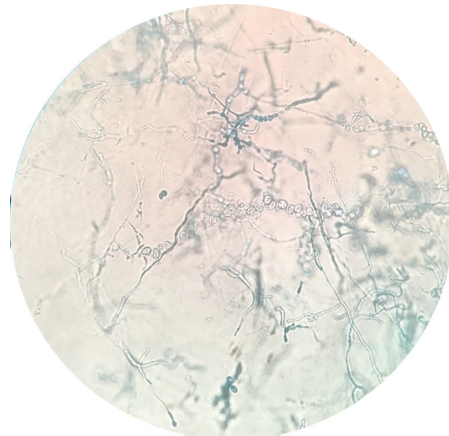


**Resim 1.** İşletmelerde Klinik Olarak Trichophytosis Teşhisi Konulan Hayvanlar (Fotoğraf: H. Kaplan)

**Mikroskopik İnceleme:** *T. verrucosum* etkeni makrokonidia ve mikrokonidilar şeklinde görüldü. Miseller renksiz, dallanmış, düz veya kıvrımlı, fare kuyruğu şeklinde gözlemlendi. Mikrokonidyumlar ise, oval, yuvarlak veya armut biçiminde olduğu görüldü.

**Makroskopik İnceleme:** Oluşan koloni rengi, yapısı, alt ve üst yüzey rengi dikkatlice incelendi, mantar atlasında bulunan bilgilerle karşılaştırıldı ve uygunluğu ispat edildi.

**ELISA Antijenin Belirlenmesi:** Hazırlanan 3 farklı antijenin çapraz titrasyon sonuçları birbirine benzer sonuçlar verdiği için güvenlik nedeni ile canlı olmayan otoklav edilen suş (1.antijen) ELISA solid faz antijeni olarak seçildi.



**Resim 2.** Mikroskopta (X1000) *T. verrucosum* Etkeni Mikrokonidilar ve Makrokonidialar (Fotoğraf: H. Kaplan)

**Serum Örnekleri:** Şanlıurfa ili ve çevresinde bulunan işletmelerde (A, B, C, D) klinik olarak tespit edilen; trichophytosisli ve sağlıklı hayvanlardan temin edildi. Hayvanlardan kan örnekleri alınarak serumlar çıkarıldı ve bu serumlar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edildi.

**Eşik Değerinin Hesaplanması:** Çalışmada negatif kontrol serumlarının OD değerlerinin ortalaması artı 3 standart sapma ELISA için eşik değeri olarak hesaplandı. Hesaplanan bu değer test edilen serumların sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

Çalışmada pozitif referans olarak kullanılan 40 pozitif serumun 38'i belirlenen eşik değeri dikkate alınarak ELISA ile pozitif olarak bulundu. Testin ta-

nısal duyarlılığı (Gerçek pozitif sayısı/Gerçek pozitif sayısı + Yanlış negatif sayısı)x100 formülü ile hesaplandı ve duyarlılık (sensitivite)= %95,24 olarak bulundu.

Çalışmada negatif referans olarak kullanılan 100 serumun hiçbirisi eşik değeri üzerinde OD değeri vermedi. Testin tanınabilirliği (Gerçek negatif sayısı/Gerçek negatif sayısı + Yanlış pozitif sayısı) x100 formülü ile hesaplandı ve özgüllük (spesifite)= %100 olarak belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre test edilen 360 adet serumdan 289 (%80,3) adedi pozitif, 71 (%19,7) adedi ise negatif olarak değerlendirildi (Tablo 1).

**Tablo 1.** ELISA Sonuçlarının İşletmelere Göre Dağılımı

İşletme adı	A	B	C	D	Toplam
Pozitif serum sayısı ve % oranı	71 %78,9	76 %82,6	84 %95,45	58 %64,44	289 %80,3
Negatif Serum sayısı ve % oranı	19 %21,1	16 %17,4	4 %4,54	32 %35,55	71 %19,7
Toplam Serum Sayısı	90	92	88	90	360

## Tartışma ve Sonuç

Sığırlarda ringworm olarak bilinen dermatofitozisin en yaygın olarak görülen etkeni zoofilik bir dermatofit olan *T. verrucosum*'dur. *T. verrucosum*'un buzağılarda en önemli morbidite faktörlerinden biri olduğu bildirilmiş olmasının yanı sıra, koyun, keçi ve atlarda da enfeksiyon oluşturur. Sığırlardaki trichophytosis aynı zamanda insanlara zoonotik geçişi nedeniyle önem taşır. Bugüne kadar, sığırlarda trichophytosisse karşı immün yanıtın değerlendirilmesine yönelik az sayıda çalışma yapılmıştır. Deneysel enfeksiyonlar veya aşılama çalışmalarından sonra hem humoral, hem de hücreyel yanıtı değerlendiren birkaç çalışma bulunmaktadır. Dermatofitozis olgularında vücutta antikor yanıtının gelişimi, hastalığın tanısında serolojik teşhisi kullanma imkân sağlar. Ulaşılabilen literatür verilerine göre, hayvanlarda dermatofitozis olgularında antikor yanıtlarının değerlendirilmesi için ELISA teknikleri geliştirilmiştir, ancak sığırlarda *T. verrucosum* tanısı amacıyla spesifik antikorların saptanmasına yönelik çalışmalar yok denecek kadar azdır. (Bagut ve ark. (2013))

Zrimsek ve ark. (2002), *Trichophyton mentagrophytes* ile enfekte tavşanlarda tanınabilirliğini değerlendirmek amacıyla bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar *T. mentagrophytes* ile enfekte olmuş tavşanlarda ELISA ile humoral yanıtın değerlendirilmesinin, standart yöntemlerden daha

erken ve daha uygun bir dermatofitoz teşhisine katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Zrimsek ve Drobnic-Kosorok (2002), kedilerde ve tavşanlarda *Microsporum canis* ve *T. mentagrophytes*'e karşı oluşan spesifik IgG yanıtının saptanması için iki indirekt ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Bu amaçla enfekte 20 kedi ve 25 tavşana ait serum örneğini test etmişlerdir. Araştırmacılar tavşanlarda ELISA ile mevcut klasik teşhis yöntemlerine göre daha erken ve uygun teşhis sağladığını, kedilerde spesifik antikorların saptanması ile de doğru tedaviye çok erken başlamanın mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

Brouta ve ark. (2003), *M. canis* majör fungal antijenlerini saptamaya yönelik olarak çalışmada ELISA ile humoral yanıtı ölçmüşler ve antijenleri başarı ile tespit etmişlerdir.

Peano ve ark. (2005), köpeklerde *M. canis* tarafından oluşturulan dermatofitozislerin teşhisi için geliştirdikleri ELISA'nın duyarlılığını %83,3, özgüllüğünü %95,2 olarak bildirmişler ve testin duyarlılığının direkt mikroskopi ve kültür tekniklerinden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Zahran ve Abdeen (2013), hazırladıkları *T. verrucosum* aşısının tavşanlarda deneysel olarak araştırılması için humoral immün yanıtı değerlendirmek için ELISA'dan yararlanmışlardır.

Santana ve ark. (2018), semptomatik ve asemptomatik dermatofitozisli kedilerde serolojik tanı için bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar geliştirdikleri testin duyarlılığını %94 bulurken özgüllüğü %75 olarak hesaplamışlardır.

Elad ve Segal (1995), yapmış oldukları aşılama çalışmasında oluşan humoral yanıtın değerlendirilmesi için ELISA tekniğini kullanmışlar ve aşılama ile hücrel immun yanıt yanında humoral yanıtın da uyarıldığını bildirmişlerdir.

Mikaili ve ark. (2012), sığırlarda canlı *T. verrucosum* ile immunizasyon sonucunda oluşan antikorların saptanması amacıyla ELISA tekniği kullanmışlar ve immunizasyon yapılan hayvanların serum OD değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bagut ve ark. (2013), sığırlarda *T. verrucosum* tarafından oluşturulan dermatofitozislerin teşhisi amacıyla bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar bu amaçla *T. verrucosum*'a %98 yapısal benzerlik gösteren *Trichophyton rubrum*'a ait iki rekombinant antijen kullanmışlardır. Trichophytosisli olduklarını direkt mikroskopi, floresan mikroskopi ve Polymerase Chain Reaction (PCR) ile doğruladıkları 135 sığırdan aldıkları serum örnekleri ile hastalık geçmişi bulunmayan ve herhangi bir deri lezyonu taşımayan 55 sığır serumunu kontrol serumu olarak kullanmışlardır. Kullanmış oldukları bir antijenle yapılan ELISA'nın duyarlılığını %89,6, özgüllüğünü %92,7 bulurken, ikinci antijen için özgüllük %96,8, özgüllük %78,4 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bu sonuçlara göre geliştirdikleri ELISA tekniğinin epidemiyolojik çalışmalarda, aşılama veya aşılama yöntemlerinin sonuçlarını değerlendirmede kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada otoklavlanmış etken ile hazırlanmış antijen ile yapılan ELISA'da duyarlılık %95,24, özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlar araştırmacıların bildirdiği oranlara kısmen yakın olsa da özellikle özgüllük belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Bunun da negatif kontrol serumu olarak kullanılan serum örneklerinden veya antijenin faklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sığırlarda iklim, mevsim, yaş gibi faktörlere bağlı olarak çiftlikten çiftliğe değişiklik göstermekle beraber çiftliklerde trichophytosis prevalansı araştırmacılar tarafından %10-100 arasında bildirilmektedir (Papini ve ark. 2009). Bu çalışmada işletmelere göre pozitiflik oranı %58-84 arasında saptanırken genel olarak incelenen 360 adet serumdan 289 (%80,3) adedi pozitif, 71 (%19,7) adedi ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitiflik oranının yüksek seviyelerde ol-

masının nedeni incelenen serum örneklerinin etken izolasyonu yapılarak trichophytosis olduğu doğrulanan sürülerden toplanmış olması, hayvanların bir yaşın altında olması ve bölge ikliminin hastalık çıkışına yatkın olması gibi etkenlere bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sığırlarda trichophytosisin serolojik teşhisi için bir ELISA geliştirmenin amaçlandığı bu çalışmada duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek seviyede bir ELISA tekniği oluşturulmuştur. Geliştirilen bu ELISA ile hastalıklı sürülerden alınan serumların incelenmesi ile işletmelerde trichophytosis pozitifliğinin oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Trichophytosis sürülerde yaygın olarak bulunduğu sürü performansını düşürmekte, tedavi ve deri hasarları nedeniyle ekonomik kayıplara yol açmakta, ancak buzağılarda ölümler de oluşturabilmektedir. Bu nedenle gerek şüpheli durumlarda hastaların tespiti gerekse epidemiyolojik çalışmalar amacıyla ELISA ile seropozitifliğin saptanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca etkenin zoonoz özelliği de göz önüne alınırsa, sürü ile bağlantılı kişiler için bir risk taşıyan hasta hayvanların erken teşhisi ve tedavisi gerek hayvan sağlığı gerekse insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Erken tedavi ile hastalığın neden olduğu yanlış tedavi giderleri, performans kayıpları gibi ekonomik kayıplara yol açan birçok faktör de etkisiz hale getirilebilecektir.

**Etik Kurulu Kararı:** Dollvet A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DOLLVET-HADYEK) 23.11.2016 tarih ve 2016/35 Karar No'lu Etik Kurulu Kararı

**Teşekkürler:** Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17055 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Maddi Destek ve Çıkar İlişkisi:** Yazarların maddi destek veren Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü ile herhangi bir çıkar ilişkisi bulunmamaktadır.

## Kaynaklar

- Arda M. (2000) *Temel Mikrobiyoloji*. 2. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi, s.315-367.
- Bagut ET, Cambier L, Heinen MP, Cozma V, Monod M, Mignon B. (2013) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Ringworm Infection in Cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 20(8), 1150-1154.
- Biberstein EL, Hirsh DC. (2004) Dermatophytes. Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RL, eds. *Veterinary Microbiology*. Blackwell Publishing Co, Oxford. pp.273-284.
- Brouha F, Descamps F, Vermout S, Monodi M, Losson B. (2003) Humoral and cellular immune response to a *Microsporium canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol.* 41, 495-501.



- Carlsson J. (1993) Risken for ringworm hos notkreatur och miiniska. *Sven Vet Tidn.* 45, 467-471.
- Çenesiz S, Cevat N, Yarım GF, Arslan HH, Çiftçi A. (2007) Trikofitozisli ineklerde serum adenozin deaminaz aktivitesi (ADA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 54, 155-158.
- Davidov I, Radinovic M, Kovacevic Z, Erdeljan M, Galfi A, Ilić S. (2018) Trichophytosis in Beef Cattle. *VJRS.* 18(2), 428-445.
- Deacon JW. (1988) *Introduction to modern mycology.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. pp.1-239.
- Elad D, Segal E. (1995) Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *J Vacc.* 13(1), 83-87.
- Gudding R, Lund A. (1995) Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. *Can Vet J.* 36, 302-306.
- Haab C. (1991) *Epidemiologie der Trichophytie beim Mastkalb* (Inaugural Dissertation). Switzerland, Zurich: University of Zurich. p.77.
- Kane J, Smitka C. (1978) Early Detection and Identification of *Trichophyton verrucosum*. *J Clin Microbiol.* 8(6), 740-747.
- Kiraz M. (1988) Dermatofitlerin tür tanısı ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Doktora tezi, İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Mikaili A, Chabili M, Ghashghaie A, Mostafaie A. (2012) Immunization against bovine dermatophytosis with live *Trichophyton verrucosum*. *Afr J Microbiol Res.* 6(23), 4950-4953.
- Morrell J, Stratman E. (2011) Primary Care and Specialty Care Delays in Diagnosing Infection Related to Cattle Exposure. *J Agromedicine.* 16(4), 244-250.
- Papini R, Nadoni S, Fanelli A, Mancianti F. (2009) High Infection Rate of *Trichophyton verrucosum* in Calves from Central Italy. *Zoonoses Public Health.* 56(2), 59-64.
- Peano A, Rambozzi L, Gallo MG. (2005) Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for the serodiagnosis of canine dermatophytosis caused by *Microsporum canis*. *Vet Dermatol.* 16, 102-107.
- Rybníkář A, Oborilova E. (2007) Clinical assessment of postinfection, postcontact and postvaccination immunity manifestation after experimental inoculation of calves with *Trichophyton verrucosum* culture. *Mycoses.* 51, 236-242.
- Santana AE, Taborda CP, Severo JS, Rittner GMG, Munoz JE, Larsson Jr CE. (2018) Development of enzyme immunoassays (ELISA and Western blot) for the serological diagnosis of dermatophytosis in symptomatic and asymptomatic cats. *Med Mycol.* 56, 95-102.
- Sayfarth F, Roediger C, Graser Y, Erhard M, Burmester A, Elsner P. (2011) Case report: *Trichophyton verrucosum* infection after needlestick injury with an attenuated live vaccine against cattle ringworm. *Mycoses.* 54(6), 870-876.
- Simpanya MF. (2000) Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. Kushwaha RKS and Guarro J. eds. *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi.* Rev Iberoam Micol. Bilbao. pp.1-12.
- Tel OY. (2005). Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Thomas JW, Hayden RT, Larone DH. (2018) *Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification.* 6th edition. ASM Press, USA. pp.270-280.
- Weber A. (2000) Mycozoonoses with special regard to ringworm of cattle. *Mycoses.* 43(1), 20-22.
- Zahrán RN, Eman AA. (2013) Evaluation of the Immune Response to *T. verrucosum* Vaccines. *Am J Immunol.* 9 (4), 139-147.
- Zrimsek P, Drobnic-Kosorok M. (2002) Diagnostic Value of ELISA Tests for the Detection of Specific Antibodies in Cats and Rabbits with Dermatophytosis. *J Biotechnol.* 40(3), 171-175.
- Zrimsek P, Kos J, Pinter L, Drobnic-Kosorok M. (1999) Detection by ELISA of the humoral immune response in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*. *Vet Microbiol.* 70(1-2), 77-86.