

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**KAYSERİ YÖRESİNDE SÜT SIĞIRLARINDA PARATÜBERKÜLOZUN
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER TANISI**

Proje No: VA-06-17

NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Tuba İÇA
Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Seçil ABAY
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Fuat AYDIN
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Araş. Gör. Harun HIZLISOY
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

MART 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırmadan elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesini yapan Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyometri Anabilim Dalı başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Aytaç AKÇAY’a, projenin moleküler analizlerinin bir bölümünün yapılması aşamasında laboratuvarlarını kullandığımız ve göstermiş oldukları misafirperverliklerinden dolayı Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Yahya KUYCUOĞLU ve Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Esra ŞEKER’e ve maddi ve manevi desteklerinden dolayı “Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne” teşekkürlerimizi sunarız

KAYSERİ YÖRESİNDE SÜT SIĞIRLARINDA PARATÜBERKÜLOZUN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER TANISI

Bu çalışmada, süt sığırcılığı yapılan işletmelere ait sürülerde paratüberkülozun varlığı serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırıldı.

Araştırmada Ağustos 2007-Temmuz 2008 yılları arasında kronik ishalli iki ve üzeri yaşlardaki 147 baş ineğin kan, süt ve gaitaları toplandı. Her bir ineğin memesinden alınan süt numunelerine California Mastitis Testi (CMT) uygulandı. Kan serumlarının serolojik incelenmesinde indirekt paratüberküloz ELISA testinden yararlanıldı. Süt ve dışkı numunelerinden Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP)'in moleküler tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanıldı. Süt ve dışkı numunelerinden etkenin saf bir şekilde izole edilebilmesi ve çoğaltılması amacıyla immunomanyetik separasyon (IMS) yönteminden faydalanıldı.

California mastitis test ile incelenen 147 süt numunesinin 18 (% 12.24)'i negatif, 44 (% 29.93)'ü şüpheli, 36 (% 24.48)'sı CMT (+), 28 (% 19.04)'i CMT (++) ve 21 (% 14.28)'i CMT (+++) bulundu. Serolojik amaçlı uygulanan ELISA sonucu 18 (%12.24) serumda pozitiflik saptandı. Süt ve dışkı örneklerinin PZR ile analizi sonucu sırasıyla 20 (%13.60) ve 42 (% 28.57) numunede MAP DNA'sı tespit edildi. Aynı numunelerin IMS-PZR yöntemi ile incelemeleri sonucu pozitifliğe rastlanmadı.

Bu araştırmada Kayseri yöresinde süt sığırlarında paratüberkülozun yüksek bir oranda bulunduğu görülmüştür. Paratüberkülozda mastitis semptomlarının her zaman görülmeyebileceği ve subklinik bir seyir gösterdiği saptanmıştır. Teşhiste kullanılacak laboratuvar yöntemlerinin enfeksiyonun seyrine göre hastalığın varlığının ortaya konulmasında önemli bir faktör olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ELISA, PZR, Immunomağnetik separasyon, Paratüberküloz, Sığır

SEROLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF PARATUBERCULOSIS IN DAIRY CATTLE IN KAYSERİ REGION

In this study, the presence of paratuberculosis was investigated by using serological and molecular methods in herds of dairy cattle nurturing companies.

Blood, milk and stool samples of two and older aged 145 cows with chronic diarrhea were collected for the study between August 2007 and July 2008. California Mastitis Test (CMT) was performed onto the milk samples taken from each of cow's udder. Indirect paratuberculosis ELISA test were used for serological investigation of blood serum. Polymerase chain reaction (PCR) was utilized for molecular identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from milk and stool samples. Immunomagnetic separation (IMS) method was used for the pure isolation of the agent from milk and fecal samples.

Eighteen (12.24 %), 44 (29.93 %), 36 (24.48 %), 28 (19.04 %) and 21 (14.28 %) of 147 milk samples were found to be negative, suspicious, CMT (+), CMT (++) and CMT (+++), by using of California mastitis test respectively.

According to ELISA results, 18 (12.24 %) of serum samples were positive. In PCR analysis of milk and stool samples, MAP DNA was detected from 20 (13.60 %) and 42 (28.57 %) of samples. In IMS-PCR assays of the same samples, the positivity was not detected.

In this study, paratuberculosis in dairy cattle has been found at high rates in the Kayseri region. It was detected that mastitis symptoms in paratuberculosis were subclinically and were not always observed. The using of diagnostic laboratory method may be the important factor for the revealing of the diseases was concluded.

Key words: ELISA, PCR, Immunomagnetic separation, Paratuberculosis, Cattle

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. Numuneler	11
3.1.1. Kan Örnekleri	11
3.1.2. Süt Örnekleri	11
3.1.3. Dışkı Örnekleri	12
3.2. California Mastitis Test (CMT) Ayırıcı.....	12
3.3. Primerler	12
3.4. Peptid.....	12
3.5. Streptavidin Kaplı Boncuklar	12
3.6. Pozitif Kontrol	12
3.7. CMT Testi.....	13
3.8. Serolojik Analiz	13
3.8.1. ELISA'nın Yapılışı.....	13
3.9. Moleküler Analiz	13

3.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	14
3.9.1.1. Süt ve dışkıdan <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 'in ekstraksiyonu.....	14
3.9.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nun Yapılışı.....	14
3.9.1.3. Elektroforez	14
3.9.2. İmmunomanyetik Separasyon (IMS).....	14
3.9.2.1. İmmunomanyetik boncukların hazırlanması ve MptD petid ile kaplanması ...	14
3.9.2.2. Süt ve dışkı örneklerinin hazırlanması	15
3.9.2.3. Süt ve dışkı örneklerinin IMS işlemine tabi tutulması.....	15
3.9.2.4. Boncuklardan bakterinin ayrılması ve DNA'ların ekstraksiyonun yapılması..	15
3.10. İstatistiksel Analiz	15
4. BULGULAR	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
6. KAYNAKLAR.....	38

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
CFT	: Komplement Fikzasyon Testi
CMT	: California Mastitis Testi
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAT	: Floresans Antikor Testi
FCM	: Flow Cytometer Metod
IMS-PCR	: Immunomagnetic Separation-PCR
MAI	: <i>Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare</i>
MAP	: <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i>
MIRU	: Mycobacteria Interspersed Repetitive Units
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PFGE	: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphisms
RSKK	: Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
VNTR	: Variable Number Tandem Repeat

1. GİRİŞ

Sığır yetiştiriciliği eskiden beri Kayseri ili ekonomisinin önde gelen ekonomik faaliyetlerinden biri olmuştur. Türkiye İstatistik Kurumunun 2011 yılı verilerine göre bölgede 24.046 yerli, 129.362 melez ve 96.543 kültür ırkı sığır varlığı bildirilmiştir. Bölgede son yıllarda süt ve damızlık sığırı yetiştiriciliğinde görülen artışlara paralel olarak hayvanlardaki enfeksiyöz hastalıkların sayısında da artışlar kaydedilmektedir. Büyük yatırımlar sonucu kurulan işletmelerde verimli bir yetiştiriciliğin yapılabilmesi için en önemli faktörlerden birisi de enfeksiyöz hastalıklardan arı hayvanların yetiştirilmesidir. Bu enfeksiyonlardan biri olan paratüberküloz sonucu başta süt üretiminde ve kalitesinde olmak üzere önemli ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Sürü içerisinde enfeksiyona yakalanan aşırı kaşektik ve gövdelerinde patolojik lezyon gösteren hayvanların imha edilmesi bu hayvanlardan elde edilecek gelirin düşmesine yol açmaktadır. Enfeksiyona bağlı olarak şekillenen damızlık sürülerde gebelik süresinde düzensizliklerin baş göstermesi işletme karlılığı düşmesine sebep olmaktadır.

Paratüberküloz veya Johne's hastalığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde sığırlarda önemli ekonomik kayıplara yol açan enfeksiyon olma özelliğini hala korumaktadır. İlk defa 1905 yılında Alman veteriner bakteriyolog Heinrich A. Johne tarafından izole edilmiştir. Enfeksiyon ruminantlarda, tavşan, tilki ve kanatlılarda doğal seyir gösterirken at, köpek ve

primatlarda deneysel olarak meydana getirilebilmektedir. Ruminantlarda başlıca sindirim sistemi etkilenmekte ve kontagiyöz, kronik ve ölümcül bir seyir görülmektedir. Enfekte hayvanların özellikle dışkıları ile çevreyi sürekli kontamine etmeleri önemli bir sorundur. Bu bakımdan enfekte sığırların kısa süre içerisinde tespit edilmesi önem arz etmektedir. Enfeksiyonun zoonotik bir boyutu şu an için olmamasına rağmen sığırlarda hastalığı meydana getiren *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ile insanlarda Crohn's hastalığı arasında bir ilişkinin bulunduğu bildirilmekte ve son yıllarda güncel olarak bu konu üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Hayvanlarda tedavi amacıyla uygulanabilecek antibiyotiklere karşı etkenin dirençlilik göstermesinden dolayı tedavi yapılmamaktadır. Bu bakımdan enfeksiyonun sürü içerisinde kısa sürede teşhis edilmesi, kontrol ve eradikasyon açısından önemli bir yer tutmaktadır.

Bu araştırmada, Kayseri yöresinde süt sığırcılığı yapılan işletmelere ait sürülerde paratüberkülozun varlığının saptanması amaçlanmıştır. Yıl boyunca işletmelerdeki başta kronik ishalli iki ve üzeri yaşlardaki 147 baş ineğin kan, süt ve gaitaları toplanmıştır. Kan serumları serolojik yönden incelenirken süt ve gaitaları moleküler analize tabi tutulmuştur. Serolojik yoklamalarla özellikle subklinik paratüberküloz olguları ortaya konulurken Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile etkenin süt ve gaitadan direkt tespit edilebilme düzeyi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in süt ve dışkıdaki varlığını saptamak amacıyla immunomanyetik separasyon yöntemi çalışılmış sonrası PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçların ışığı altında; rutin teşhis için yapılacak moleküler analizler için marazi madde seçimine katkıda bulunması, paratüberkülozun Kayseri bölgesine yönelik özellikleri ve bölge hayvan yetiştiriciliği üzerine olan etkileri, teşhiste uygulanacak serolojik ve moleküler yöntemlerden elde edilen sonuçların karşılaştırılması yapılmıştır. Ülkemizde paratüberkülozla ilgili olarak bölgesel düzeyde yapılan çalışmalar yeterli düzeyde değildir. Yapılan literatür taramalarında Kayseri yöresinde konu ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma Kayseri ve yöresinde sığırlarda paratüberküloza yönelik ilk çalışma olması açısından önem taşıırken ayrıca bölgede daha sonra yapılacak olan çalışmalar için kaynak niteliğindedir.

1. GENEL BİLGİLER

Paratüberkülozis (Johne's disease) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) tarafından sığır, koyun ve keçiler başta olmak üzere deve, manda, antilop ve geyikler gibi birçok evcil ve vahşi hayvanda meydana getirilen enfeksiyöz ve bulaşıcı bir hastalıktır (1, 2). Hayvanlarda barsak cidarının kalınlaşması, kronik daire ve zayıflama ile karakterize olan bir enfeksiyondur. Enfeksiyona özellikle sığır yetiştirilen ülkelerde her zaman rastlamak mümkündür. Ülkemizde de devlete ve özel teşebbüse ait işletmelerde paratüberkülozun varlığı saptanmıştır (3, 4, 5, 6). Süt sığırlarında süt üretiminde ve kalitesinde meydana getirdiği ekonomik kayıplar önemli bir yer tutmaktadır (7, 8). Ayrıca MAP'ın insanlarda da Chorn's hastalığının da etiyolojisinde yer alabileceğine yönelik görüşler bulunmaktadır (9, 10). Enfeksiyona yol açan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* asido rezistans bir bakteri olup daha önceki yıllarda *Mycobacterium paratuberculosis* ve *M. johnei* olarak da isimlendirilmiştir. Etken *M. avium-Mycobacterium intracellulare* (MAI) kompleksinin bir üyesidir. Etiyolojik ajan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 0,5 x 1-2 µm boyutlarında kısa kalın yapıda çomak ve Gram pozitif bir bakteridir. İntrasellüler özelliğe sahiptir. Ziehl Neelsen boyama yöntemiyle homojen ya da granüllü bir boyama özelliği gösterir. Kültürlerde genellikle tek tek çomaklar şeklinde görülürse de barsak lezyonlarından

hazırlanan preparatlarda kümeler halinde görülür. Üretilmesi için hem sıvı hem de katı besiyerlerinde ‘‘mikobaktin’’ maddesine gereksinim gösterir. Souton gibi sıvı besiyerlerinde başlangıçta zayıf ve üstte ince bir pelikül oluşturarak ürerken sonraları bu pelikül kalınlaşır buruşuk bir şekil alır ve çalkalama ile dibe çökebilir. Katı besiyerlerinde küçük ve kabarık bir yapıda başlayan üreme daha sonra (5-6 hafta) daha fazla büyüyerek gözle kolay seçilir hale gelmektedir. Yapılan pasajlar üreme süresini 2-3 haftaya kadar indirebilir. Kolonilerin rengi başlangıçta sarı-beyaz ve üzerleri çizgilidir. Biyokimyasal aktivitesi zayıf olan *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ekzotoksine de sahip değildir. Avian tüberküline pozitif reaksiyon verir. *M. avium* subsp. *paratuberculosis*’ın bazı suşları tercihen spesifik konakçıları infekte etme özelliğine sahiptir. Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) yöntemi kullanılarak başlıca tip I ve S suşunun koyunlarda, tip II ve C suşunun da sığırlarda bulunduğu tespit edilmiştir. C suşunun sığır, keçi, devegiller ve hem ruminant hem de ruminant olmayan vahşi hayvanlar olmak üzere geniş bir konakçı kitlesinde bulunduğu saptanmıştır. S suşları başlıca koyun ve diğer küçük ruminantları infekte ederken ayrıca kırmızı geyiklerde de bulunabileceği bildirilmiştir. S ve C suşlarının koyun ve sığırlar arasında kros türler olabileceği ancak bunun çok nadir olduğu görülmüştür. Ayrıca, Norveçte keçi spesifik bir suşun ve bizonda da özgün bir suşun varlığı saptanmıştır. Paratüberkülozis evcil ve vahşi olmak üzere geniş bir hayvan kitlesinde görülmektedir. Sığır, koyun, keçi, lama, alpaka, deve, Amerikan geyiği, Kanada geyiği, büyük boynuzlu koç, bufalo, geyik ve ren geyiği gibi ruminantlarda tespit edilmiştir. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* tavşan, kedi, tilki, gelincik, sansar, porsuk, ayı, rakun, armadillo, opossum, fare ve Norveç ratı gibi ruminant olmayan hayvanlardan da izole edilmiştir. Ayrıca değişik karga türlerinde de etkenin varlığı saptanmıştır. Vahşi tavşanlarda, primatlarda ve domuzlarda hastalığın varlığı kayıt edilmiştir. Deneysel olarak at ve köpeklerde de enfeksiyon oluşturulabilmektedir. Paratüberkülozis tüm dünyada görülmektedir. İsveç ve Avustralya’nın bazı bölgelerinin hastalıktan ari olduğu kayıt edilmiştir (1).

Ruminantlarda enfeksiyonun bulaşması başlıca fekal-oral yolla olmaktadır. Enfekte hayvanların gaitaları ile çıkardıkları büyük miktardaki organizmalar su, yem, süt, mera, vs ile bulaşması sonucu sindirim yolu aracılığıyla vücuda girer (11). Klinik belirtilerin başlamasından önce çok uzun bir inkubasyon süresi sonunda hayvanlar gaitalarıyla 15-18 ay etkeni bulaştırırlar (12). Aseptomatik hayvanlar belirli aralıklarla etkenleri çıkarmaya devam ederler. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* kolostrum, süt, meme, erkek ve dişi genital organlardan izole edilmiştir. Enfeksiyonun naklinde fomitler rol oynayabildiği gibi

insektlerde mekanik vektör olarak etkili olmaktadır. Gençler erginlerden daha duyarlı olup genç yaşta alınan etkenlere rağmen inkubasyon periyodunun uzunluğuna bağlı olarak semptomlar 2-3 sene sonra görülür. Bu nedenle de sığırlarda 2-6 yaşlar arasında hastalığa rastlanılmaktadır. Yüksek süt verimli hayvanlarda enfeksiyonun görülme sıklığı diğerlerine oranla daha yüksektir (1, 13). Alkali topraklarda yetiştirilen hayvanlar arasında klinik olgulara daha az görülmektedir. Ayrıca sıcak ve nemli iklim şartlarının etkin olduğu tropik ve subtropik bölgelerde daha sık görüldüğü bildirilmektedir (13). Ancak Strickland ve ark. (14), yaklaşık 3400 baş laktasyon ve kurudaki inekte dört mevsim süresince kültürel ve serolojik olarak yaptıkları incelemede mevsimlerin enfeksiyon üzerinde bir rolünün olmadığını bildirmişlerdir. Gençler genellikle kirli memeleri emmeleri veya kontamine ahırlarda barındırılmaları esnada enfeksiyona yakalanmaktadır. Asemptomatik inekler üzerinde yapılan bir çalışmada % 3-19'unun sütlerinde ve % 9-36'sının kolostrumunda *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in bulunduğu tespit edilmiştir. Semptomatik hayvanların % 35'inde ise sütte bakterinin varlığına rastlanmıştır. İlâveten horizontal olarak aynı ahırlarda barındırılan buzağılar arasında da bulaşmaların görüldüğü bildirilmiştir. Sperma ve embriyoların bulaşmada ki rolleri hakkında tam bir bilgi bulunmamaktadır. Aynı şekilde ruminant olmayan hayvanlarda da *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in yayılımı hakkında yeterli bir bilgi bulunmamaktadır. Bu hayvanlarda da aynı şekilde fekal-oral bulaşma önemli bir yer tuttuğu düşünülmektedir. Tavşanlarda dışkı, testis, uterus, plasenta, fetüs ve sütlerinden etken izolasyonu yapılmıştır. Hem horizontal hem de vertikal bulaşmanın vahşi tavşan popülasyonunda bulunduğu görülmektedir. Bu hayvanlardan karnivorlara ve omnivorlara hastalığın nakledilmesi söz konusudur. Genetik analizler ve deneysel çalışmalar ruminant ve olmayan hayvanlar arasında hastalığın nakledilebileceğini ortaya koymuştur. Vahşi yaşamdaki canlılar çiftlikler arasında *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in yayılımında etkili bir faktör olarak görülmektedir. Paratüberküloz etkeni çevresel koşullara karşı oldukça dirençlidir ve meralarda yıllarca canlılığını devam ettirebilmektedir. Çamurlu suda 9 ay, gaitada 8-11 ay, sığır idrarında 1 haftadan fazla, musluk suyunda 17-19 ay, -14 °C'de 12 ay, 4 °C'de 5 ay ve 38 °C'de 8 ay canlılığını sürdürebilmektedir. Formalin (% 5) ve HgCl (% 0.02) 10 dakika, kreolin (% 5) 2 saat, % 5 NaOH 24 saat, fenol (1/40), alkol (% 95), kalsiyum hipoklorid (1/50), metilen mavisi (1/500) 15 dakika içinde etkenin üremesini durdurabilir (1). Inkubasyon periyodu 4 ay ile 15 yıl arasında değişmektedir. Sığırlarda klinik bulguları dört aşamada değerlendirmek mümkündür. Birinci aşama sakın enfeksiyon dönemi olarak değerlendirilmekte olup buzağı, düve ve iki yaşına kadar olan düverlerde görülmektedir. Bu

dönemde herhangi bir klinik belirtiyeye rastlanmazken hayvanların karkas ağırlıklarında ve kondüsyonlarında bir değişiklik bulunmamaktadır. Ancak hayvanlar bu dönemde dışkılarıyla etkenleri dışarı çıkarmaktadır. Klinik ve patolojik yöntemlerle enfeksiyonu tanımlamak mümkün değildir. Dışkıdan yapılacak kültür veya dokulardaki etkenlerin varlığını ortaya koyabilecek yöntemlerle teşhis yapılabilmektedir. İkinci aşama subklinik hastalık dönemidir. Yetişkin hayvanlarda tipik klinik belirtiler tespit edilememekle birlikte örneğin mastitis, infertilite gibi değişikliklere rastlanabilmektedir. Hayvanların dışkılarından yapılacak kültürlerde % 15-25 oranında etken saptanabilirken etkilenen çoğu hayvanın ise dışkı kültürlerinden negatif sonuç alınmaktadır. Teşhiste birçok serolojik testinde negatif sonuç verdiği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu dönemde teşhis yapılamadığı takdirde üçüncü aşamaya geçiş söz konusudur. Klinik hastalık olarak tanımlanan üçüncü aşamada buzağılar genellikle doğumdan hemen sonra enfeksiyona yakalanırken 2 yaştan önce nadiren klinik semptom görülebilmektedir. Enfeksiyonun en yaygın görüldüğü yaş grubu 2-6 yaşlar arasındadır. Hastalığın yayılım oranı yavaş olduğundan dolayı vakaların sporadik olarak şekillendiği görülür. Hayvanlarda iştah normal olmasına karşın kademeli bir zayıflama vardır. İlerleyen haftalarda zayıflama ve ishal gelişir. Süt veriminde azalma şekillenirken vücut ısısı, kalp atış hızı ve respirasyon normal sınırlar içerisindeydir. Çok sulu olan gaitada kan izleri, epitelial artıklar ve mukus bulunur. Dördüncü aşama ileri klinik hastalık dönemidir. Başlıca semptom ishal ve zayıflamadır. Enfeksiyonun başlangıcında halsizlik, yorgunluk, tüylerin karmakarışık bir hal alması ve intermandibular bölgede ödemler göze çarpmaktadır. Deri normal görünümünü kaybetmiş kuru bir hal almıştır. Bu aşama haftalar veya aylarca sürebilmekte şiddetli dehidrasyon, aşırı zayıflama ve aşırı kaşeksi sonucu ölüm şekillenmektedir (1). Bazı hayvanlarda kendiliğinden iyileşmeler de görülebilir. İnfeksiyona yakalanan hayvanlar her zaman paratüberküloze ait tipik semptomlar göstermeyebilir (2, 13).

Paratüberkülozda inkubasyon periyodunun çok uzun olması ve enfekte hayvanların dışkılarıyla *M. paratuberculosis* etkenlerini sürekli çıkartmalarına bağlı olarak çevresel kontaminasyonla karşı karşıya kalınmaktadır. Johne's hastalığının kontrolünde özellikle klinik olarak semptom göstermeyen taşıyıcı hayvanların ortaya konulmasında mutlaka sahada ve laboratuarda yapılacak testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla hastalığın teşhisinde kullanılacak testlerle ilgili olarak son yıllarda birçok araştırmalar yapılmaktadır. Ancak şu ana kadar birçok faktöre (süre, sensitivitesi ve spesifitesi, ekonomik oluşu, vb) bağlı olarak teşhiste kullanılabilecek tek bir test yönteminin bulunmadığı görülmüştür. Hastalığın

patogenezi de göz önünde bulundurulduğunda teşhiste en az iki test yönteminden alınacak sonuçlara göre karar verilmesinin uygun olacağını düşünülmektedir. Klinik olarak semptom gösteren hayvanlar ile enfekte sürüler içerisinde sağlıklı görünüşte olan hayvanlarda paratüberkülozun tanımlanmasında dışkının bakteriyolojik yönden muayene edilmesi faydalı bir teşhis yöntemidir. Günümüzde canlı hayvanlardan paratüberkülozun teşhisi için en güvenilir metod gaitadan yapılacak kültür yöntemidir. Dışkı kültürünün sensitivitesi ve spesifitesi 50 veya daha fazla hayvanın bulunduğu ve enfeksiyon oranının % 20 ve üzerinde görüldüğü sürülerde % 100'lere ulaşmaktadır. Dışkı kültürlerinin önemli avantajlarından birisi klinikal belirti görülmeyen 1-3 yaşlı hayvanlardaki enfeksiyonun varlığını tespit edebilmesidir. Ancak kültür yöntemi için uygulanan prosedürlerin zahmetli olması, dışkı ile çıkarılan mikroorganizma sayısının yetersizliğinde teşhisin yapılamaması ve etkenin izole edilmesi için en az 8-16 hafta kadar bir süreye ihtiyaç duyulması gibi olumsuzluklarda bulunmaktadır (1, 2). Enfeksiyonun teşhisinde rektum mukozasından alınan kazıntıdan, süt ve gaitadan hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen metodu ile boyama yapılabilir. Tipik asido rezistans bakterilerin yapılan mikroskopik muayene ile görülmesi bu yöntemin dışkı kültürüne alternatif bir yöntem olabileceğini düşündürmüştür. Boyama yönteminin oldukça pratik olması ve bir saat içerisinde sonuç vermesi açısından avantajları bulunmaktadır. Ancak, mikroskopik muayenelerin sensitivite ve spesifitesine şüphe ile bakılmaktadır. Dışkıda bulunacak Johne's basilleri ile diğer asido rezistans bakterilerin ayırımını yapmak oldukça güçtür. Diğer bir dezavantaj enfeksiyonun aşamasına bağlı olarak dışkı ile çıkartılan bakteri sayısı da muayene sonuçlarını etkileyebilmektedir. Bu bağlamda dışkı preparatlarının *M. paratuberculosis* yönünden mikroskopik muayenesinden elde edilecek sonuçların güvenilir olmadığı kaydedilmiştir (1, 2).

Serolojik testler bakteriyolojik yöntemlere oranla daha ekonomik olmaları ve kısa sürede sonuç vermeleri açısından teşhiste önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu testlerin de sensitivite ve spesifite yönünden dezavantajlarının bulunduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (15, 16, 17). Sığır paratüberkülozunda subklinik enfeksiyonların teşhisinde komplement fiksasyon testi (CFT), agar jel immunodiffüzyon ve iki farklı ticari Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) testi olmak üzere dört serolojik test kullanılmaktadır. Testlerin spesifiteleri % 95-99 arasında değişmekte olup yüksek bir değere sahiptir. En ideal şartlarda dışkılarıyla etken çıkarmayan ve çıkaran sığırların serumlarının ELISA ile incelenmesi sonucu sırasıyla % 14-47 ve % 40-65 arasında düşük bir sensitivitenin elde edildiği bildirilmiştir. Testlerin sensitivitesi bizzat sürüdeki enfeksiyonun prevalansındaki

artışa paralel olarak artmakta bunun tam tersi olarak prevalans azaldığında ise azalmaktadır. Bundan dolayı test sensitivitenin düşük tespit edildiği durumlarda mutlaka ikinci bir test ile sonuçların desteklenmesi gerekmektedir. Komplement fiksasyon testi sığır paratüberkülozunun teşhisinde son zamanlara kadar en yaygın kullanılan testler arasında yer almıştır. Bazı ülkeler hayvan ithalatından önce serumların CFT'inden negatif sonuç alınmasını zorunlu tutmuşlardır. Ancak CFT'inde görülen hatalı negatiflik ve hatalı pozitiflikten dolayı bu ülkeler ayrıca intradermal Johnin testi veya dışkının bakteriyolojik analizlerinden herhangi birisinden de negatif sonuç alınmasını mecburi kılmışlardır. Klinik hastalıkların teşhisinde CFT'inin sensitivitesinin yaklaşık % 90 ve spesifitesinin % 70 olduğu bildirilmiştir. Subklinik olguların tanımlanması amacıyla kullanıldığında doğruluk oranının düştüğü saptanmıştır. Agar jel immunodiffuzyon testi klinikal paratüberküloz olgularının saptanmasında % 96'lık bir sensitivite ve % 94'lül bir spesifiteye sahiptir. Bu test özellikle klinikal paratüberkülozun teşhisinde en uygun yöntem olarak değerlendirilmektedir. Subklinik enfeksiyonun tanımlanması bakımından dışkı kültürü ile karşılaştırıldığında 1/3 oranında duyarlılığa sahip olduğu bildirilmektedir. Testin avantajları arasında 48 saatlik gibi kısa bir sürede sonucun alınması, ucuz olması ve doğru sonuç elde edilmesi gibi başlıca kriterler bulunmaktadır. Tüberkülozlu hayvanlarda pozitif sonuç vermesinden dolayı test tüberkülozdan ari sürülerde kullanılmalıdır. Floresans antikor testi (FAT) paratüberkülozun teşhisinde kullanılabilir. Ancak *M. avium* ve *M. paratuberculosis* antijenlerinin birbirinden ayırımını yapamamaktadır. Komplement fiksasyon testinin *M. paratuberculosis* ve *Corynebacterium renale* antijenlerini tespit edemediği durumlarda FAT'nden başarılı sonuçlar alınmaktadır. Her iki testin bir arada kullanılması erken ve subklinik enfeksiyonların tanımlanmasında fayda sağlamasına rağmen elde edilecek sonuçların güvenilirliğinde şüpheler bulunmaktadır. Serum örneklerinin değerlendirilmesinde en sıklıkla enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testi kullanılmaktadır. Farklı birçok ELISA test yöntemi birçok araştırmacı (16, 18, 19, 20, 21, 22) tarafından çalışılmıştır. Normal ELISA testinin sensitivitesi yüksek olmasına rağmen spesifitesinin düşük olduğu, modifiye ELISA testlerinin ise tam tersi sonuç (sensitivitesi % 57, spesifitesi % 98.9) verdikleri bildirilmiştir (23). Serolojik teşhisle ilgili olarak çıkartılabilecek genel sonuç; hayvandaki enfeksiyonun aşaması uygulanacak test yönteminden elde edilecek sonuçlar üzerine bizzat etki etmektedir. Genellikle subklinik ve az miktarda dışkı ile etken çıkarımının sözkonusu olduğu durumlarda serolojik testlerden negatif sonuç alınmaktadır. Birçok bu aşamadaki sığırdaki humoral antikor yanıtı tanımlanabileceği sınırların altındadır. Hayvanda enfeksiyon olmasına rağmen serolojik

testlerden negatif sonuçlar alınmaktadır. Etkene karşı oluşan antikorların tanımlanması amacıyla hayvanlardan alınan süt örneklerinin Hendrick ve ark. (20), süt örneklerini de ELISA testine tabi tutmuşlar ve kültür yöntemi ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar açısından süt ile yapılan ELISA testini uygun ve daha ucuz olduğunu saptamışlardır. Ancak diğer araştırmacılar paratüberküloz etkenine karşı oluşan antikorların tespitinde kullanılan süt ve serum ELISA sonuçları arasında korelasyon bulunmadığını bildirmişlerdir (24). Adaska ve Anderson (18), ABD’de 1950 serum örneğini ELISA ile incelemeleri sonucu 89 (% 4.6) sığırı pozitif bulmuşlardır. Hirst ve ark. (25), 10280 sığır üzerinde yaptıkları çalışmada 424 (% 4.12) iki yaş üzerindeki sığırdaki pozitiflik tespit etmişlerdir. Diğer bir serolojik yöntem olarak flow cytometer metod (FCM)’u Eda ve ark. (26), tarafından kullanılmıştır. Araştırmacılar testin sensitivite ve spesifitesinin % 95’in üzerinde olduğunu ve FCM’ünü dışkı kültürü ve ticari bir ELISA ile kıyasladıklarında daha erken aşamada enfeksiyonun teşhisinin konulması açısından avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Son yıllarda özellikle canlı hayvanlarda enfeksiyonun kısa sürede teşhisi amacıyla rutin olarak moleküler analiz yöntemlerinden yararlanılmaktadır (27). Moleküler yöntemlerin avantajları yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Kültürel yöntemler 12 haftayı aşan bir sürede sonuç vermesine rağmen moleküler yöntemlerden üç gün içerisinde sonuç elde edilmesi en önemli avantajları olarak görülmektedir. Moleküler tekniklerin rutin kullanım alanları analiz ücretlerinden dolayı sınırlı kalmaktadır. Ayrıca, sensitivitelerinin düşüklüğü, yöntemin uygulandığı laboratuvarların alt yapı durumu, özellikle testi gerçekleştiren personelin beceri ve tecrübe noksanlığı diğer sorunlar olarak ortaya çıkmaktadır. Laboratuvarlarda incelenen örneklerdeki gen ürünlerinin kontaminasyonu sonucu hatalı pozitif sonuçların elde edilmesi sık görülen olgular arasında yer almaktadır. Sahada klinik örneklerden paratüberkülozun teşhis edilmesi ve epidemiyolojik çalışmalar amacıyla klinikal izolatlardan suş spesifik tiplendirilmesi amacıyla kısa sürede sonuç veren ve güvenilir moleküler metodlar için çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla MAP izolatlarının tiplendirilmesinde Djønne ve ark. (28), IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP); Motiwala ve ark. (29), multiplex PCR typing; Rajeev ve ark. (30), real-time PCR, O’Reilly ve ark. (31), immunomagnetic separation-PCR (IMS-PCR); Romano ve ark. (32), variable number tandem repeat (VNTR)-Mycobacteria interspersed repetitive units (MIRU) typing; Stabel ve Bannantine (33), Nested PCR; Stevenson ve ark. (34), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)’den yararlanmışlar ve kullandıkları yöntemin etkinliğini savunmuşlardır. Araştırmacılar

analizlerde etkenin saptanması amacıyla en fazla dışkı numunelerinden (21, 27, 33, 35) yararlanılırken süt numunelerinin de (36, 37) analizlerde kullanılmışlardır.

Günümüzde enfeksiyonun daha kısa sürede ve güvenilir bir şekilde teşhis edilmesi ve neticesinde gerekli önlemlerin alınabilmesi amacıyla şu an için bakteriyolojik, serolojik, alerjik ve moleküler testlerden yararlanılmaktadır. Şu an için tek bir test yönteminin teşhis için yeterli olmadığı mutlaka iki test uygulaması sonucunda kararın verilmesi görüşü ağır basmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Numuneler: Kayseri merkez ve ilçelerinde süt sığırcılığı yapılan işletmelerden ishal, durgunluk, mastitis, sütte azalma ve renk değişikliği, vb semptomlar tespit edilen 2 ve üzeri yaşılarıdaki 147 adet ineğin kan, süt ve gaitaları toplandı. Hayvanların yaşıları anamnez bulgusu olarak kayıt edildi.

3.1.1. Kan Örnekleri: Serolojik analizlerde kullanılacak kanlar ineklerin *Venae jugularis*'den antikoagulanlı vakumlu kan alma tüplerine alındı. Laboratuara soğuk zincirde getirilen kan numuneleri 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Çıkartılan serumlar kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.1.2. Süt Örnekleri: Her bir ineğin memesinden alınan süt numunelerine California Mastitis Testi (CMT) uygulandı. Testten elde edilen CMT skoru kaydedildi. Daha sonra meme başları % 70'lik alkol ile dezenfekte edilerek ve sağılabılır meme loplalarının her birinden aseptik

şartlarda süt numuneleri steril bir tüpe alındı. Süt numuneleri laboratuara soğuk zincirde taşındı. Moleküler analizlerde kullanılacak sütler kullanılmaya kadar -20 °C’de saklandı.

3.1.3. Dışkı Örnekleri: Hayvanların dışkıları rektumdan alınarak steril gaita toplama kaplarına konuldu. Soğuk zincirde laboratuara getirilen dışkılar moleküler analizlerde kullanılmaya kadar -20 °C’de saklandı.

3.2. California Mastitis Test (CMT) ayıracı: Sığırların mastitisli meme loblarının belirlenmesinde kullanılan CMT ayıracı 1 lt olacak şekilde laboratuvar ortamında aşağıdaki formülasyona göre hazırlandı (38).

Anyonik deterjan	100 ml
Distile su	900 ml
Brom creasol purple eryiği (1/300)	50 ml
pH: 6,8 olacak şekilde ayarlandı.	

3.3. Primerler: Süt ve dışkı numunelerinden *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*’in amplifikasyonunda IS900 P90 ve P91 primerleri kullanıldı (Tablo 1). (39)

Primer adı	Sekans dizisi (5’-3’)	Moleküler ağırlık
P90	GAAGGGTGTTCGGGGCCGTC	400 bp
P91	GAGGTCGATCGCCCACGTGAC	

3.4. Peptid: Çalışmada IMS’de kullanılacak bocukları kaplamak amacı ile biyotinli MptD (GKNHHHQHHRPQ) peptidi kullanıldı. (Kinexus Bioinformatics Corporation, Kanada)

3.5. Streptavidin Kaplı Boncuklar: IMS işleminde streptavidin kaplı boncuklar (DynaMyOne Streptavidine Beads, Invitrogen) kullanıldı. Bu boncuklar daha sonra MptD peptidi kaplandı.

3.6. Pozitif Kontrol: Çalışmada Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)’nun optimizasyonu amacı ile pozitif kontrol olarak Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Tüberküloz - Paratüberküloz ve Ruam Teşhis Laboratuvarından temin edilen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (RSKK 647) suşu kullanıldı.

3.7. CMT Testi: Testin yapılışı ve değerlendirilmesi Middleton ve ark. (38)'nın bildirdiği yöntemle yapıldı. İneğin her meme lobu için ayrı yuvarlak biçimde bölümleri bulunan CMT kabına ayrı ayrı süt örnekleri alındı. İlk süt atıldıktan sonra her meme lobundan ilgili bölüme yaklaşık 2 ml kadar süt sağıldı. Tüm gözlerde kabın en dışkı halkasına gelecek şekilde eşit miktarda süt bulunması sağlandı. Daha sonra her bir bölüme içindeki süt miktarı ile eşit olacak şekilde CMT ayırıcından ilave edildi. Kap yatay düzlem içinde yavaşça dairevi hareketler ile çevrilerek süt ve ayırıcın iyice karışması sağlandı. Testin sonucu ve sütlerin mastitis durumları jelöz bir tabakanın oluşumu ve akışkanlığına göre negatif, şüpheli, +, ++ ve +++ olarak değerlendirildi.

3.8. Serolojik Analiz: Paratüberküloz enfeksiyonuna karşı serumlarda antikor varlığının tespiti amacıyla Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) testi uygulandı. Bu amaçla *Mycobacterium paratuberculosis* Antikor Test Kiti (Institut Pourquier, France) kullanıldı. Testin yapılışı kiti üreten firmanın bildirdiği yöntemle yapıldı.

3.8.1. ELISA'nın Yapılışı: Kitler çalışmadan en az 1-2 saat önce dışarı çıkarılarak oda derecesinde bekletildi. Mikropleyitin A1-A2 kuyucuğuna 100'er µl dilüe edilmemiş negatif kontrol serum konuldu. A3-A4'e kuyucuğuna ise 100'er µl dilüe edilmemiş pozitif kontrol serum ilave edildi. Her göze 1/500 oranında dilüe edilmiş sığır serumlarından 100'er µl ilave edilerek oda ısısında 30 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda mikropleyitin içindeki sıvı bir küvete boşaltıldı ve kuyucuklar üç kere distile su ile yıkandı. Her kuyucuğa 100'er µl dilüe edilmemiş konjugat ilave edilip mikromikser'de karışımı sağlandı ve mikropleyitler 30 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama aşaması yukarıda belirtildiği gibi tekrarlandı. Mikropleyitin her çukurcuğuna dilüe edilmemiş substrat solusyonundan 100'er µl ilave edilip mikromikser'de karışımı sağlandıktan sonra 15 dk inkübasyona tabii tutuldu. Süre sonunda mikropleyitin her kuyucuğuna 100'er µl stop solusyonu ilave edildi. Test sonuçları 650 nm'de ELISA reader (BioTek ELx808, United States) okundu.

3.9. Moleküler Analizler: Sığırlarda MAP etkenlerin taranması süt ve dışkı örneklerinde PZR ile gerçekleştirildi. Dışkı ve süttten direk ve IMS sonrası PZR olmak üzere iki farklı yöntem kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan metodların işleyiş sırası ve açıklamaları şekil 1'de verilmiştir.

3.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in süt ve dışkı numunelerinden izole edilebilmesi amacı ile PZR üç basamakta gerçekleştirildi.

3.9.1.1. Süt ve dışkıdan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in ekstraksiyonu: Sütten ve dışkıdan bakterilerin ekstraksiyonu amacıyla Fermentas ve ENZA ekstraksiyon kitleri kullanıldı. Ekstraksiyon işlemleri kitin önerdiği protokole göre gerçekleştirildi.

3.9.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nın Yapılışı: Toplam 50 µl'lik hacimlerde hazırlanacak olan PZR miksi içerisine 10 x PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ % 1 Triton X-100), 250 µM dNTP mix, 2 U Taq DNA polimeraz enzimi, 20 pmol P90 ve P91 primerleri ilave edildi. Hazırlanan karışımın üzerine son olarak 5 µl hedef DNA ilave edildikten sonra PZR amplifikasyonu için 94 °C'de 1 dk ön denatürasyon, 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 55 °C'de 1 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dk ekstensiyon basamaklar 30 siklus halinde gerçekleştirildi.

3.9.1.3. Jel Elektroforez: Amplifiye olan ürünler % 1,5'lik agaroz jelde 90 voltta 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu.

3.9.2. İmmunomanyetik Separasyon (IMS): Sütten ve dışkıdan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in saf bir şekilde izole edilebilmesi ve PZR yapılabilmesi amacı ile IMS kullanıldı. İmmunomanyetik separasyon işlemi 4 basamakta gerçekleştirildi (39, 40).

3.9.2.1. İmmunomanyetik boncukların hazırlanması ve MptD petid ile kaplanması: Ticari olarak temin edilen IMS boncukları (M-280 Dynabeads, UK) prezervatif maddenin ortadan kaldırılması amacı ile PBS/BSA (% 0.1 Bovine serum albumin ilave edilmiş PBS pH 7.4) ile yıkandı. Bu amaçla ependorfa alınan 500 ml boncuk immunomanyetik separatöre (MPC-M; Dynal) konularak 1-2 dk döndürüldü. Mıknatısa yapışan boncuklara dikkat edilerek ependorf içerisindeki sıvı aspire edildi. Üzerine PBS (pH 7.4) konularak hafifçe vortekslendi. Bu işlem 2 kez tekrarlanarak boncukların yıkanma işlemi (PBS/BSA) gerçekleştirildi. Kitin (Dynal MyOne Streptavidine Beads) kullanım kılavuzuna uygun olarak boncukların bağlayabileceği peptid miktarı (1 mg boncuk için yaklaşık 400 pmol peptid) hesaplandı ve peptid boncuğa ilave edilerek 30 dakika oda ısısında IMS aletinde hafifçe döndürüldü. Daha

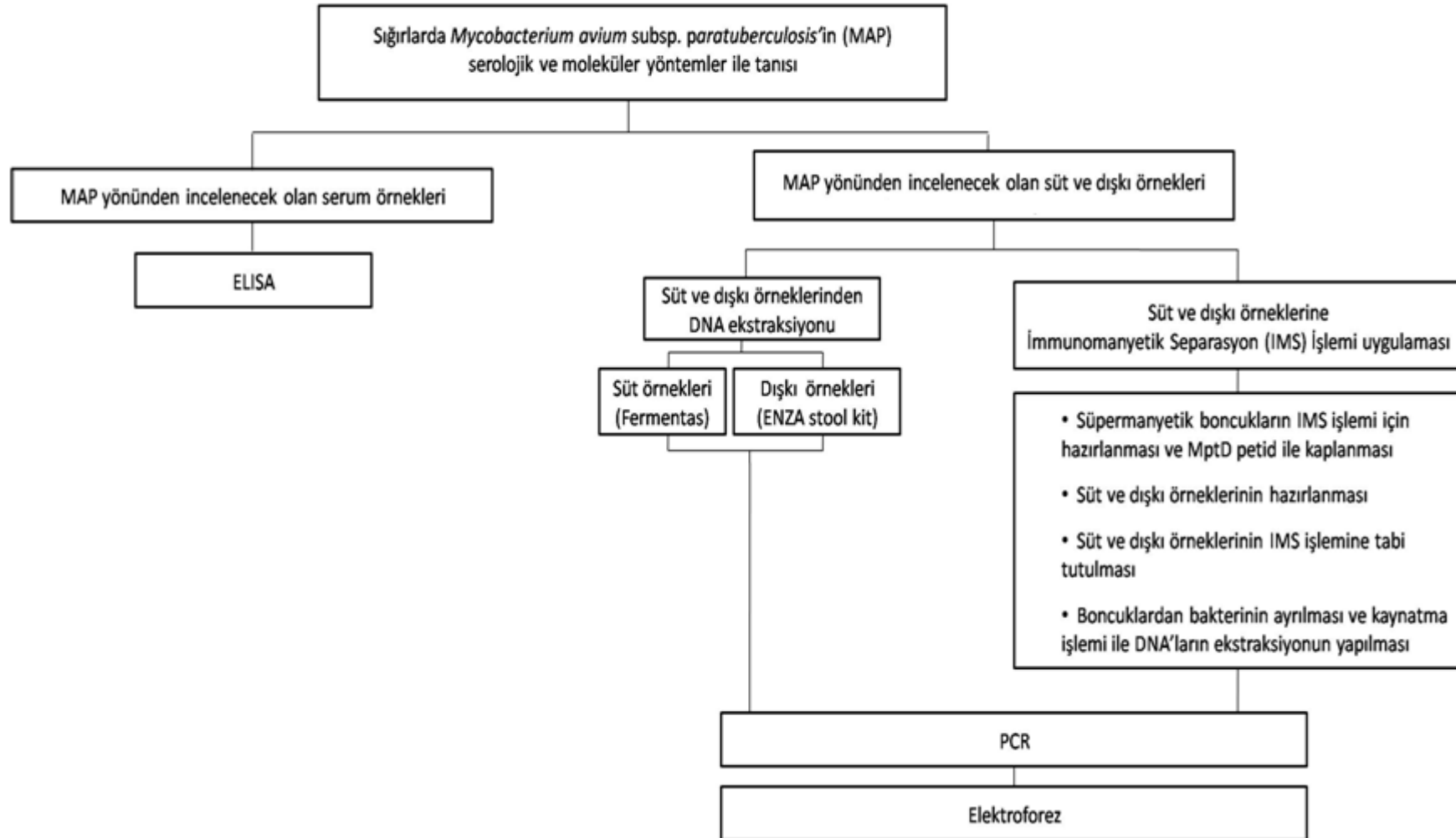
sonra alete mıknatıs takılarak boncukların ependorfun duvarına yapışması sağlandı. Boncukların dışında kalan sıvı atılarak boncuklar 2-3 kez PBS ile yıkandı. Hazırlanan boncuklar IMS işleminde kullanılmak üzere sulandırıldı ve -20 °C’de saklandı.

3.9.2.2. Süt ve dışkı örneklerinin hazırlanması: 1-2 g dışkı örnekleri 1:5 oranında % 0.05 oranında tween 20 ile sulandırılmış PBS ile karıştırıldı. 300 x g’de 3 dakika santrifüj işleminin ardından 1 ml süpernatant temiz bir ependorfa alınarak üzerine 10 µl peptid kaplı boncuk ilave edildi (41). Süt örnekleri ise 1 ml olacak şekilde ependorfa alındı. Üzerine 10 µl peptid kaplı boncuk ilave edildi.

3.9.2.3. Süt ve dışkı örneklerinin IMS işlemine tabi tutulması: Süt ve dışkı örnekleri 4 °C’de bir gece IMS aletinde hafifçe karıştırıldı. Bu sürenin sonunda IMS aletinin mıknatısı takılarak 10 dakika çalıştırıldı (42). Böylece boncukların ependorfun duvarına yapışması sağlandı. Aspirat çekilerek boncuklar 2-3 kez PBS/BSA karışımı ile yıkandı. Bu örneklerden 10 µl temiz bir lam alınarak kurutuldu. Akridin oranj (acridine orange) boyaması için örnekler saklandı.

3.9.2.4. Boncuklardan bakterinin ayrılması ve DNA’ların ekstraksiyonun yapılması: Örneklerin üzerine % 0.1 SDS ilave edilerek kaynatıldı. Böylece boncuğa bağlı biyotin moleküllerinin ayrılması sağlandı. 10000 rpm’de 5 dk santrifüj ardından elde edilen süpernatant PCR işleminde kullanıldı.

3.10. İstatistiksel Analiz: Araştırmada kullanılacak olan ELISA ve PZR yöntemlerinden elde edilecek sonuçlar arasındaki uyumluluk Cohen’s Kappa testi ile değerlendirildi. Numunelerin alındığı hayvanların yaşları ile paratüberküloz enfeksiyonun görülme oranları arasında istatistiki olarak bir ilişkinin olup olmadığı Pearson Chi-Square testi kullanılarak incelendi (43).



Şekil 1. Çalışmada kullanılan serolojik ve moleküler metodların uygulama şeması.

3. BULGULAR

California mastitis test ile incelenen 147 süt numunesinin 18 (% 12.24)'i negatif, 44 (% 29.93)'ü şüpheli, 36 (% 24.48)'sı CMT (+), 28 (% 19.04)'i CMT (++) ve 21 (% 14.28)'i CMT (+++) bulundu (Tablo 1). Negatif, şüpheli ve (+) skor elde edilen hayvanlarda mastitis semptomları gözlemlenmedi.

Tablo 1. Sütlerin CMT ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar

CMT Skoru	Sonuç (%)
Negatif	18 (% 12.24)
Şüpheli	44 (% 29.93)
+	36 (% 24.48)
++	28 (% 19.04)
+++	21 (% 14.28)

Paratüberküloz şüpheli iki ve üzeri yaştaki 147 hayvanın yaşları anamnez bulgusu olarak alındı. Bu hayvanlardan 52'sinin 2-4 yaş, 68'inin 5-7 yaş, 22'sinin 8-10 yaş, 5'inin 11 ve üzeri yaş grubunda yer aldıkları kayıt edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Paratübeküloz şüpheli sığırların yaş dağılımları

Yaş Grupları	Numune alınan hayvan sayısı
2-4	54
5-7	68
8-10	22
11 ve üzeri	3
Toplam	147

Süt numunelerine uygulanan CMT sonucu “ negatif ” skor elde edilen 18 sığırın kan serumlarının ELISA ile incelenmesi neticesinde 2 (% 11.11) serumun şüpheli ve 16 (% 88.89) serumun negatif olduğu tespit edildi. Aynı sığırlara ait süt ve dışkı numunelerinin PCR sonuçları ise sütlerde pozitiflik saptanmazken 5 (% 27.78) dışkıda pozitiflik belirlendi. Süt ve dışkı numunelerinin IMS-PCR analizlerinden pozitiflik elde edilemedi (Tablo 3).

Tablo 3. California mastitis test sonucu negatif skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
1	9425	-	0.131	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
2	7598	-	0.710	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
3	8003	-	0.099	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
4	6578	-	0.046	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
5	3604	-	0.630	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
6	3500	-	0.105	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
7	4399	-	0.063	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
8	3355	-	0.492	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
9	9638	-	0.089	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Tablo 3. California mastitis test sonucu negatif skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları (devamı)

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
10	6476	-	0.063	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
11	1446	-	0.061	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
12	8848	-	0.772	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
13	5798	-	0.075	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
14	7865	-	0.090	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
15	4476	-	0.099	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
16	5863	-	0.512	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
17	7075	-	0.084	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
18	8589	-	0.064	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

California mastitis test ile ‘‘ şüpheli ‘‘ skor elde edilen 44 sığırın kan serumlarına uygulanan ELISA sonucu 3 (% 6.82) serumdan şüpheli ve 41 (% 93.18) serumdan negatif sonuç elde edildi. Bu sığırlarından 6 (% 13.64)’sının dışkısında PCR ile pozitiflik saptandı. IMS-PCR analizi sonucu ise pozitiflik elde edilemedi (Tablo 4).

Tablo 4. California mastitis test sonucu şüpheli skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
1	0049	±	0.122	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
2	8931	±	0.149	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
3	3874	±	0.203	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
4	3078	±	0.112	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
5	7002	±	0.085	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Tablo 4. California mastitis test sonucu şüpheli skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları (devamı)

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
6	5925	±	0.044	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
7	4852	±	0.728	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
8	7727	±	0.087	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
9	5400	±	0.133	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
10	3893	±	0.122	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
11	8021	±	0.476	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
12	1219	±	0.099	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
13	4457	±	0.064	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
14	4364	±	0.071	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
15	1507	±	0.081	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
16	6045	±	0.092	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
17	7776	±	0.173	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
18	1590	±	0.076	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
19	8511	±	0.157	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
20	0910	±	0.108	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
21	6481	±	0.199	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
22	3003	±	0.639	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
23	8370	±	0.080	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
24	9529	±	0.189	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
25	6495	±	0.165	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
26	3497	±	0.059	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
27	5667	±	0.076	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
28	5063	±	0.776	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
29	0439	±	0.160	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Tablo 4. California mastitis test sonucu şüpheli skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları (devamı)

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
30	2939	±	0.134	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
31	1936	±	0.120	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
32	7200	±	0.173	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
33	5906	±	0.088	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
34	6451	±	0.044	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
35	7651	±	0.069	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
36	3666	±	0.742	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
37	2010	±	0.069	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
38	0760	±	0.086	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
39	3087	±	0.076	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
40	3154	±	0.104	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
41	5298	±	0.050	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
42	5605	±	0.650	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
43	2244	±	0.250	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
44	3242	±	0.106	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Süt numunelerine uygulanan CMT sonucu ‘+’ + ‘+’ skor elde edilen 36 sığırın kan serumlarının ELISA’ya tabi tutulması neticesinde 2 (% 5.56) serumun pozitif, 3 (% 8.33) serumun şüpheli ve 31 (% 86.11) serumun negatif olduğu belirlendi. Süt ve dışkı numunelerinin PCR ile incelenmesi sonucu 3 (% 8.33) süt numunesinde ve 6 (% 16.67) dışkı numunesinde pozitiflik tespit edildi. Süt ve dışkı numunelerinin IMS-PCR analizlerinden pozitiflik elde edilemedi (Tablo 5).

Tablo 5. California mastitis test sonucu ‘+’ skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
1	6655	+	0.168	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
2	3573	+	0.119	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
3	1819	+	0.243	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
4	3721	+	0.164	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
5	4646	+	0.212	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
6	8627	+	0.801	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
7	9092	+	0.210	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
8	4136	+	0.278	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
9	2581	+	0.260	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
10	0538	+	0.254	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
11	5725	+	0.173	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
12	7977	+	0.166	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
13	9950	+	0.096	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
14	1691	+	0.800	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
15	6157	+	0.259	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
16	6350	+	0.128	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
17	1328	+	0.142	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
18	8745	+	0.365	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
19	7302	+	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
20	6820	+	0.098	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
21	9144	+	0.282	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
22	7928	+	0.116	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
23	6099	+	0.350	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
24	7296	+	0.240	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Tablo 5. California mastitis test sonucu ‘ + ’ skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları (devamı)

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
25	4085	+	0.784	ŞÜPHELİ	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
26	8451	+	0.364	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
27	4922	+	0.214	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
28	5304	+	0.126	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
29	8177	+	0.390	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
30	3131	+	1.637	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
31	7660	+	0.266	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
32	3533	+	0.275	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
33	3931	+	0.357	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
34	3374	+	0.696	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
35	2109	+	0.248	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
36	3311	+	0.189	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Süt numunelerinin CMT ile incelenmeleri sonucu ‘ ++ ’ skor saptanan 28 sığırın kan serumlarının ELISA tabi tutulması sonucu 6 (% 21.43) pozitif, 6 (% 21.43) şüpheli ve 16 (% 57.14) negatif serum sonucu alındı. Aynı sığırlara ait süt ve dışkı numunelerinin yapılan PCR analizlerinde 6 (% 21.43) süt ve 13 (% 46.43) dışkı numunesinin pozitif olduğu görüldü. IMS-PCR analizlerinde süt ve dışkı numunelerinde pozitiflik tespit edilemedi (Tablo 6).

Tablo 6. California mastitis test sonucu ‘++’ skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
1	0402	++	0.744	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
2	9329	++	0.211	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
3	6215	++	3.851	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
4	9827	++	0.214	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
5	9733	++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
6	4277	++	0.503	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
7	4431	++	0.157	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
8	3508	++	0.094	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
9	4288	++	2.144	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
10	3925	++	0.164	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
11	5425	++	0.720	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
12	1159	++	0.100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
13	1089	++	2.209	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
14	5141	++	0.765	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
15	3766	++	0.363	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
16	7174	++	0.323	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
17	2846	++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
18	8807	++	0.444	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
19	2432	++	0.071	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
20	1756	++	0.370	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
21	5540	++	0.718	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
22	3223	++	0.288	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
23	6171	++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
24	6100	++	0.737	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF

Tablo 6. California mastitis test sonucu ‘ ++ ’ skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları (devamı)

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
25	4217	++	0.156	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
26	6941	++	0.226	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
27	7458	++	0.750	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
28	1052	++	0.325	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

California mastitis test skoru ‘ +++ ’ olarak belirlenen 21 sığırın kan serumlarına uygulanan ELISA sonucu 10 (% 47.62) serumun pozitif, 2 (% 9.52) serumun şüpheli ve 9 (% 42.86) serumun negatif olduğu görüldü. Bu sığırların sütlerinin direkt PCR ile incelenmesi sonucu 11 (% 52.38)’inin pozitif ve 10 (% 47.62)’unun negatif olduğu saptandı. Analize alınan 21 dışkı numunesinin 12 (% 57.14)’si pozitif ve 9 (% 42.86)’u negatif tespit edildi. Süt ve dışkı numunelerinin IMS-PCR analizlerinden pozitiflik elde edilemedi (Tablo 7).

Tablo 7. California mastitis test sonucu ‘ +++ ’ skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
1	4760	+++	0.120	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
2	9732	+++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
3	7098	+++	0.271	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
4	7504	+++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
5	5976	+++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
6	3473	+++	0.102	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
7	6462	+++	0.100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
8	7367	+++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF

Tablo 7. California mastitis test sonucu ‘+++’ skor elde edilen numunelerin serolojik ve moleküler test sonuçları (devamı)

Sıra No	Kulak No	Numuneler						
		Süt	Serum		Süt		Dışkı	
		CMT Skoru	ELISA OD	Sonuç	Direkt PCR	IMS-PCR	Direkt PCR	IMS-PCR
9	2781	+++	2.570	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
10	6403	+++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
11	1262	+++	0.729	ŞÜPHELİ	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
12	1655	+++	0.170	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
13	2391	+++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
14	1499	+++	0.092	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
15	7997	+++	OUT	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
16	8296	+++	0.095	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
17	6254	+++	2.719	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
18	2680	+++	0.112	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
19	Küpesiz	+++	0.839	ŞÜPHELİ	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
20	9626	+++	3.770	POZİTİF	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
21	4500	+++	0.107	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Serolojik amaçlı uygulanan ELISA sonucu 18 (%12.24) serumun pozitif, 16 (% 10.88) serumun şüpheli ve 113 (% 76.87) serumunda negatif olduğu belirlendi. Süt ve dışkı örneklerinin PZR ile analizi sonucu sırasıyla 20 (% 13.60) ve 42 (% 28.57) numunede MAP DNA’sı tespit edildi (Tablo 2). Aynı numunelerin IMS-PZR yöntemi yapılan incelemelerinde pozitifliğe rastlanmadı (Tablo 8).

Tablo 8. Numunelerin serolojik ve moleküler testlerle incelenmesi sonucu elde edilen analiz sonuçları

Numuneler	Serolojik			Moleküler			
	ELISA			Direkt PCR		IMS-PCR	
	Pozitif	Şüpheli	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Serum	18	16	113	-	-	-	-
Süt	-	-	-	20	127	0	147
Dışkı	-	-	-	42	105	0	147

Moleküler analizler sonucu 147 dışkı numunesinden 42 (% 28.57)'sinin MAP pozitif olduğu görüldü. Bu 42 hayvana ait ELISA sonuçlarının süt ve dışkı PCR sonuçları ile karşılaştırıldığında ELISA'da negatif sonuç elde edilen 8 sığırın, süt numunesinde MAP saptanamazken dışkı numunelerinin hepsinden (% 100) pozitif sonuç alındı. Şüpheli sonuç saptanan 16 seruma ait hayvanların süt ve dışkılarından sırasıyla direkt PCR'da 2 (% 12.50) ve 16 (% 100) numunede pozitiflik gözlemlendi. Serolojik incelemede pozitif bulunan 18 serumun tümünün süt ve dışkı numunelerinin direkt PCR sonuçlarının pozitif olduğu belirlendi (Tablo 9).

Tablo 9. Numunelerin ELISA ve Direkt PCR testleri ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar

Sıra No	Kulak No	Numuneler		
		ELISA	Süt	Dışkı
1	3003	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF
2	3355	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF
3	3374	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF
4	3604	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF
5	4277	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF
6	5605	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF
7	5863	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF
8	8021	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF
9	0402	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF

Tablo 9. Numunelerin ELISA ve Direkt PCR testleri ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı)

Sıra No	Kulak No	Numuneler		
		ELISA	Süt	Dışkı
10	1262	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
11	1691	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
12	3666	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
13	4085	ŞÜPHELİ	POZİTİF	POZİTİF
14	4852	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
15	5063	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
16	5141	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
17	5425	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
18	5540	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
19	6100	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
20	7458	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
21	7598	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
22	8627	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
23	8848	ŞÜPHELİ	NEGATİF	POZİTİF
24	Küpesiz	ŞÜPHELİ	POZİTİF	POZİTİF
25	1089	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
26	2391	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
27	2781	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
28	2846	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
29	3131	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
30	4288	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
31	5976	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
32	6171	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
33	6215	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
34	6254	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF

Tablo 9. Numunelerin ELISA ve Direkt PCR testleri ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı)

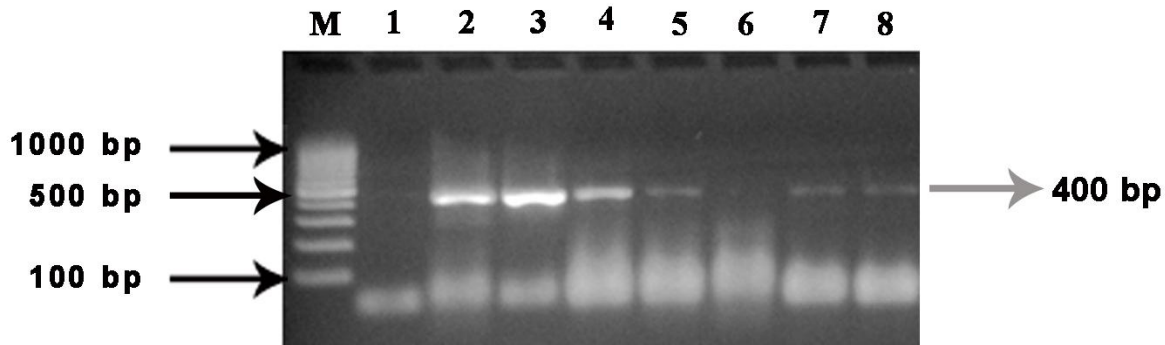
Sıra No	Kulak No	Numuneler		
		ELISA	Süt	Dışkı
35	6403	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
36	7302	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
37	7367	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
38	7504	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
39	7997	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
40	9626	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
41	9732	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
42	9733	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF

Paratüberküloz enfeksiyonu üzerine hayvan yaşlarının etkisinin ortaya konulması amacıyla dışkı PCR test sonucu pozitif 42 hayvanın yaş grupları incelendi. Buna göre 2-4 yaş arası 54 sığırdan 13 (% 24.07)'ü pozitif iken 41 (% 75.93)'i negatif bulundu. Yaş grubu olarak 5-7 arası olan 68 sığırın 22 (% 24.07)'si pozitif ve 46 (% 67.65)'sı negatif tespit edildi. Kronik ishal semptomu bulunan 8-10 yaş arası 7 (% 31.82) sığır pozitif ve 15 (% 68.18) sığır ise negatif saptandı. İleri yaşlardan 11 ve üzerindeki 3 sığırın incelemesinde ise pozitifliğe rastlanmadı. Yaş grupları ile enfeksiyon arasındaki ilişki Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. MAP pozitif olan sığırların yaş grubu dağılımları

Yaş Grupları (Yıl)	Pozitif Sığır Sayısı (%)	Negatif Sığır Sayısı (%)	Toplam Sığır Sayısı
2 - 4	13 (24.07)	41 (75.93)	54
5 - 7	22 (32.35)	46 (67.65)	68
8 – 10	7 (31.82)	15 (68.18)	22
11 ve üzeri	0 (0)	3 (100)	3
Toplam	42	105	147

Süt ve dışkı örneklerinin PZR ile analizi sonucu sırasıyla 20 (%13.60) ve 42 (% 28.57) numunede MAP DNA'sı tespit edildi (Resim 1). Aynı numunelerin IMS-PZR yöntemi yapılan incelemelerinde pozitifliğe rastlanmadı.



Resim 1: Jel Elektoroforez sonucu elde edilen bantların görüntüsü (% 1,5 'lik Agaroz Jel) M: Marker (100 bp DNA ladder), 1: Negatif kontrol (Steril distile su), 2: Pozitif kontrol [*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (RSKK 647)], 3-5, 7, 8: Pozitif örnek, 6: Negatif örnek

Araştırmada süt ve dışkı PZR testleri ile ELISA ve dışkı PZR testlerinden elde edilen sonuçlar arasında bir uyumluluğun bulunup bulunmadığı değerlendirildi. Buna göre süt ve dışkı PZR testlerinden elde edilen sonuçlar arasında orta düzeyde uyum saptandı ($K : 0,565$, $p < 0,001$) (Tablo 11). Serum ELISA sonuçları ile dışkı PZR sonuçları arasında ise iyi düzeyde uyumun bulunduğu görüldü ($K: 0,783$, $p < 0,001$) (Tablo 12).

Tablo 11. Süt PZR ve dışkı PZR sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

			DIŞKI PZR		Total
			-	+	
SÜT PZR	-	Count	105	22	127
		% Süt PZR	82,7%	17,3%	
		% Dışkı PZR	100,0%	52,4%	
	+	Count	0	20	20
		% Süt PZR	0 %	100,0 %	
		% Dışkı PZR	0 %	47,6 %	
	Total	Count	105	42	147

Cohen's kappa coefficient (K): 0,565 ($p < 0,001$)

Tablo 12. Serum ELISA ve dışkı PZR sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

			DIŞKI PCR		Total
			-	+	
SERUM ELISA	-	Count	105	8	113
		% Serum ELISA	92,9%	7,1%	
		% Dışkı PZR	100,0%	30,8%	
	+	Count	0	18	18
		% Serum ELISA	0%	100,0%	
		% Dışkı PZR	0%	69,2%	
	Total	Count	105	26	131

Cohen's kappa coefficient (K): 0,783 (p<0,001)

Numunelerin alındığı hayvanların yaşları ile paratüberküloz enfeksiyonun görülme oranları üzerine yaşın etkisi istatistik olarak önemli bulunmamıştır (P>0,05) (Tablo 13).

Tablo 13. Yaş gruplarının enfeksiyon üzerine etkisinin istatistiksel değerlendirilmesi

			Dışkı PCR		Total
			-	+	
Yaş	2-4	Count	41	13	54
		%	75,9%	24,1%	
	5-7	Count	46	22	68
		%	67,6%	32,4%	
	8- üzeri	Count	18	7	25
		%	72,0%	28,0%	
Total		Count	105	42	147
		% within Yaş	71,4%	28,6%	

Pearson Chi-Square : 1,016 P>0,05

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Paratüberkülozis (Johne's disease) ruminantlarda bağırsaklarda kronik granulomatöz yangısal değişikliklerle karakterize bir enfeksiyon olup dünyanın birçok bölgesinde hala etkisini göstermektedir. Enfeksiyon genel olarak ruminantlarda görülmesine rağmen en sık 2-6 yaş arasındaki sığırlarda karakteristik semptomlarla seyretmektedir. Başlıca semptom ishal ve zayıflama olup bunun dışında meme ve genital sistemin etkilenmesine bağlı olarak ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Paratüberkülozda saptanan klinik bulgular diğer birçok hastalıktaki bulgularla benzerlik göstermektedir. Sürü bazında beslenmeye gerekli önem verilmesine rağmen hayvanlarda kondüsyon kaybının şekillendiği veya verimliliğin düştüğü gözlenebilmektedir. Hayvanlarda mastitis şekillenmekte olup süt veriminde azalma ve bileşiminde değişiklikler meydana gelmektedir (1, 44).

Paratüberküloza bağlı meydana gelen mastitislerin değerlendirilmesine yönelik çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Mevcut çalışmalar daha çok enfeksiyonun süt verimi üzerindeki etkisinin ortaya konulduğu çalışmalardır (45, 46, 47). McNab ve ark. (48), paratüberkülozlu hayvanlarda somatik hücre sayısında artışın varlığını bildirirken DeLisle ve ark. (49), tam aksini hücre sayısında azalmanın meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 2 yaş üzerinde kronik ishal gözlenen 147 sığırın süt örnekleri California Mastitis Test (CMT) kullanılarak mastitis yönünden incelenmiştir. Numunelerin 18 (% 12.24)'i negatif, 44 (% 29.93)'ü pozitif, 85 (% 57.83)'ü ise sonuç vermemiştir.

29.93)'ü şüpheli, 36 (% 24.48)'sı CMT (+), 28 (% 19.04)'i CMT (++) ve 21 (% 14.28)'i CMT (+++) bulunmuştur. CMT uygulaması sonrası negatif skor elde edilen 18 sığırın 4 (% 22.22)'ünün sütünden ve 5 (% 27.78)'inin dışkılarından PCR yöntemiyle paratüberküloz yönünden pozitiflik saptanmıştır. Bu sonuçlara göre hayvanlarda paratüberküloz bulunmasına rağmen mastitisin yönünden negatif oldukları görülmüştür. Paratüberküloz olduğu saptanan ‘‘ + ‘‘, ‘‘ ++ ‘‘ ve ‘‘ +++’’ skor elde edilen sırasıyla 6 (% 16.67), 13 (% 46.43) ve 12 (% 57.54) olmak üzere toplam 31 (% 73.81) sığırdan mastitis tespit edilmiştir. Bu hayvanlarda mastitisin primer etkeni MAP olabileceği gibi olgularının sekonder etkenlerce de meydana getirilebileceği düşünülmektedir. Özellikle paratüberkülozda subklinik mastitisin patofizyolojisi ile ilgili bilgilerin şu an yeterli olmaması bu konu ile yeni araştırmalara ihtiyacın bulunduğunu göstermektedir (44).

Enfeksiyonun doğal döngüsü ile birlikte subklinik enfekte hayvanları tanımlayacak duyarlı ve spesifik bir testin bulunmaması kontrol programlarını yetersiz kılmaktadır. Halihazırda enfeksiyonun teşhisinde kullanılmakta olan testler hücrel ve humoral yanıtın ortaya konulmasına yönelik olup avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Paratüberkülozun geç aşamasında oluşan antikorların tanımlanması amacıyla uygulamalarının pratik olması ve kısa sürede sonuç vermeleri bakımından serolojik testlerin büyük avantajları bulunmaktadır. Ancak bu testler enfeksiyonun erken aşamasında veya subklinik formda oluşabilecek antikorları sınırlı düzeyde tanımlamaktadır. Humoral immün yanıt etkenin vücuttan çıkarılmaya başlamasından sonra etkisini göstermektedir. Çevresel *Mycobacterium* türlerine karşı ortaya çıkan kros reaksiyonlar serolojik testlerin spesifitesini azaltmaktadır.

Enfeksiyona karşı gelişen humoral antikorlar ELISA ile tespit edilebilmektedir. İmmün cevap enfeksiyonun oldukça geç evrelerinde görülmesine karşın, yine de klinik belirtiler görülmeye başlamadan önce ortaya çıkmaktadır. Dışkılarında çok az etken bulunduran hayvanlarda ELISA ile % 15 oranında pozitiflik saptanırken klinik belirti göstermeye başlayan hayvanlarda bu oranın % 87 civarında olduğu bildirilmiştir. Bu verilere göre dışkı örneklerinin kültürü ve ELISA ile yapılan taramalarda erken dönemde etkeni yakalama şansının düşük olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi kültürün sensitivitesinin düşük olması ve ELISA'nın ise erken pozitiflikleri belirleyememesidir. Donat ve ark. (50), paratüberkülozun teşhisinde ELISA testlerinin etkinliğinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Paratüberkülozun Avrupadaki seroprevalansı üzerine birçok araştırma mevcuttur. Serolojik olarak ELISA ile yapılan seroprevalans çalışmalarında en düşük Slovenya'da % 0.4, en yüksek Almanya'da % 24.1 olarak kayıt edilmiştir (51). Dünyanın değişik bölgelerinde de konu ile ilgili araştırmalar mevcuttur. ABD'de Adaska ve Anderson (18), 1950 serum

örneğinden 89 (% 4.6)'unda ve Hirst ve ark. (25), iki yaş üzerindeki 10280 sığırdan 424 (% 4.12)'ünde pozitiflik tespit etmişlerdir. Szteyn ve Wiszniewska-Laszczych (52), Polonya'da iki yaş üzerindeki 3961 sığırdan % 3.48'lik bir seroprevalans saptamışlardır. Kolombiyada Fernández-Silva ve ark. (17), % 10.1 oranında pozitiflik belirlemişlerdir. Ülkemizde Makav ve Gökçe (4), Kars yöresinde subklinik paratüberkülozun prevalansını % 3.5 bulurken Öztürk ve ark. (6) Burdur bölgesinde % 6.2 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada Kayseri bölgesinde paratüberküloz şüpheli hayvanlardan alınan 147 adet kan örneğinin ELISA ile incelenmesi sonucu % 12.24 oranında pozitiflik ve % 10.88'lik ise şüpheli durum saptanmıştır. Araştırmamızda elde edilen serum pozitiflik oranının birçok araştırmacının elde ettiklerinden yüksek olduğu görülmüştür. Bu değerin yüksek olmasının nedenleri arasında bizzat paratüberküloz yönünden şüpheli ve iki yaş üzerindeki hayvanlardan numune alınması bulunmaktadır. Öztürk ve ark. (6) iki yaş üzerinde 465 sığırdan prevalansı % 6.2 bulunurken değişik yaş grubuna göre seroprevalansın % 3.6 ile % 19.73 oranında değişkenlik gösterdiğini ve özellikle prevalansın 3 yaşlı olanlarda en yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Fernández-Silva ve ark. (17), % 14.9 olarak en yüksek seroprevalansı 8.1-10.9 yaş grubunda saptarken 3-5 yaş grubunda % 6.8 ve 5.1-8 yaş grubunda ise % 13.2 bulmuşlardır. Bhide ve ark. (53), toplam 262 paratüberküloz üzerinde yaptıkları çalışmada 3-5 yaş arasında 29 sığırdan enfeksiyonu saptayamazken 6-10 yaş arasında 217 sığırdan 25 (% 11.52)'inde pozitiflik belirlemişlerdir. Araştırmacılar özellikle 11 ve üzerindeki 16 sığırdan 5 (% 31.25)'inde en yüksek oranı tespit etmişlerdir. Çalışmamızda dışkı PCR test sonucu pozitif 42 hayvanın yaş dağılımlarının incelenmesi sonucu 2-4, 5-7 ve 8-10 yaş gruplarında sırasıyla 13 (% 24.07), 22 (% 24.07) ve 7 (% 31.82) pozitiflik tespit edilmiştir. İleri yaşlardan 11 ve üzerindeki 3 sığırın incelemesinde ise pozitifliğe rastlanmamıştır. Çalışmamızda da paratüberkülozun 5-7 yaşlarında daha yoğun bir şekilde görüldüğü belirlenmiştir. Mevcut çalışmalarda paratüberkülozun sığırlarda genellikle iki ve üzeri yaşlarda görüldüğü bildirilmektedir. Ancak birçok çalışmada pozitifliğin saptandığı yaş grupları arasındada farklılık bulunduğu kayıt edilmiştir. Bu farklılıkların MAP etkenlerinin coğrafik dağılımı, sığırların yetiştirilme şartları, hayvanların verimsel özellikleri, vb nedenlerden kaynaklanığını düşünülmektedir.

Moleküler yöntemler kısa sürede sonuç vermesi, spesifite ve sensitivitesinin yüksek olması gibi nedenlerden ötürü kültür yöntemine göre izolasyonu güç mikroorganizmaların saptanmasında kolaylık sağlamaktadır. IS900 bölgesi MAP'lar için selektif bir gen bölgesi olmasından ötürü birçok araştırmacı bu bölge sekansından dizayn ettikleri çeşitli primerleri kullanarak etkenleri PZR ile identifiye etmişlerdir (54, 55, 56, 57, 58, 59). Bu durumda dışkı

örneklerinin PZR ile incelenmesi sensivite ve spesifitesinin yüksek olmasından dolayı erken dönem tanılarda oldukça faydalı olduğu bildirilmiştir (60).

Fransa da 1041 sığır dışkısında yapılan kültürel incelemede 72, moleküler incelemede 77 adet pozitiflik saptanmıştır (55). İrlanda da yine dışkılarından yapılan incelemede kültür yöntemi ile % 7.9 pozitiflik saptanırken, PZR ile % 36 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (56). Hindistan da dışkıdan yapılan kültürel incelemede pozitiflik oranı % 52.5 bulunmuştur. Aynı örneklerin PZR incelemesinde ise pozitiflik değerlerinin % 90 civarında olduğu saptanmıştır (58). Bu çalışmada güvenilir sonuçlar vermesi nedeni ile IS900 bölgesinden dizayn edilen primerler ile sütte ve dışkıda MAP etkenlerine ait DNA'lar araştırılmıştır. Analize alınan toplam 147 adet süt ve dışkı numunesinin sırasıyla % 13.60 ve % 28.57'sinde PZR ile MAP DNA'sı tespit edilmiştir. Yıldırım ve Civelek (5), Uşak bölgesinde süt sığırlarında subklinik paratüberkülozun prevalansını süt ve dışkı numunelerinde Outer ve Nested PZR tekniği incelemiştir. Araştırmacılar süt numunelerinde sırasıyla % 5.5 ve % 17.5 dışkı numunelerinde ise sırasıyla % 9.5 ve % 20 bulmuşlardır.

Dışkıdan direkt PCR sonucu 42 (% 28.57) sığırdan pozitiflik tespit edilmiştir. Bu hayvanların direkt PCR ve ELISA sonuçları karşılaştırıldığında serolojik olarak pozitiflik elde edilen 18 hayvanın süt ve dışkılarında MAP'ın bulunduğu görülmüştür. Şüpheli sonuç alınan 16 seruma ait hayvanların süt ve dışkılarından sırasıyla direkt PCR'da 2 (% 12.50) ve 16 (% 100) numunede pozitiflik saptanmıştır. ELISA'da antikor tespit edilemeyen 8 hayvanın dışkı numunelerinin hepsinde MAP belirlenirken bu hayvanların sütlerinde etkene rastlanmamıştır. Kan, süt, ve dışkı örneği incelenen 42 hayvana ait veriler değerlendirildiğinde, serolojik olarak pozitif olan hayvanların tümünde süt ve dışkılarında da etken belirlenmiştir. Buna göre kan, süt ve dışkıda aynı anda etkene ve antikorlara rastlanma olasılığı % 42.86 olarak saptanmıştır. Dışkılarından pozitif sonuç alınan hayvanların sekizinde antikor yanıtının olmadığı ve 16'sında ise şüpheli olduğu görülmüştür. Bu aşamada etkenler dışkı ile çıkarılmaya devam etmekte olduğu ve kullanılan teşhis yöntemi ile tanımlanabildikleri görülmüştür. Dışkıdaki pozitifliğe rağmen serumlarından negatif ve şüpheli sonuçlar alınmasının nedenleri arasında enfeksiyonun erken aşamasına bağlı olarak humoral yanıtın yeterince aktif olmadığı düşünülmektedir.

Dışkıdan kültürel yöntemle etkenin izolasyonu veya moleküler yöntemler arasında yer alan real-time PCR uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır. Kültür yöntemleri teşhiste altın standart olarak kabul edilmekle birlikte sonuçların uzun bir sürede alınması açısından dezavantaj olarak görülmektedir. Moleküler tekniklerden real-time PCR'ın pahalı bir yöntem

olması ve MAP enfeksiyonlarında prepatent periyotta uygulanabilirliğinin olmaması da bu tekniğin dezavantajı olarak değerlendirilmektedir.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*'in süt numunelerinden ilk izolasyonu diğer patojen mikroorganizmalara göre çok uzun zaman almaktadır. Bu süre yaklaşık 20 haftadır. MAP için kullanılan çok selektif bir besi yerinin bulunmaması ve var olan besiyerlerindeki rekontaminasyon olasılıkları ilk izolasyonunu güçleştirmektedir (57). Aseptik Johne hastalığı olan sığırlarda 50 ml sütte yaklaşık 2-8 CFU titrede etkene rastlanmaktadır. Bu miktarın son derece az olması etkenin sütte izolasyon şansını da düşürmektedir. İmmuno manyetik separasyon yöntemi MAP'ların ilk izolasyonlarında karşılaşılan bu güçlükleri ortadan kaldırabilecek alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Böylece süütün içerisindeki heterojen bakteriler elimine edilebilmekte ve MAP'lar saflaştırılabilmektedir. IMS yöntemi bakteri yüzey antijenleri ile boncukların etrafının kaplandığı spesifik antikorların birleşmesi esasına dayalı bir teşhis metodudur. Şüpheli örnekler (su, süt, vb), spesifik antikor kaplı paramanyetik boncuklar ile süspanse edilmektedir. İnkübasyon periyodunun ardından örneklerin içerisindeki bakteriler kendilerine spesifik antikorlar ile birleşmektedir. Örneklerin içerisinde bulunduğu ependorf manyetik bir alana maruz bırakıldığında antijen-antikor-boncuk kompleksi ependorfun duvarına yapışmaktadır (57). Örneğin sıvı kısmı dökülerek yıkama işlemi yapılmakta ve böylece örnek içerisindeki şüpheli mikroorganizmalar saflaştırılmaktadır. IMS işleminde kullanılan boncukların poliklonal tavşan anti-*M. paratuberculosis* antikorları ile kaplanması gerekmektedir (41, 61). Bu çalışmada ticari olarak üretimi yapılan poliklonal MAP antikorları üretici firmanın kapanması nedeni ile temin edilememiştir. Bu nedenle boncukların kaplanmasında faj temelli bir yöntem kullanılmıştır.

Faj sergileme tekniği teşhis amacı ile kullanılabilecek güçlü bir moleküler yöntemdir. Bakteriyofaja ait viral yapısal proteinler ya da peptidler rekombinant tekniklerle çoğaltılarak paramanyetik boncukların etrafına kaplandıklarında MAP'ların teşhisi amacı ile kullanılabilmektedir (42). fMptD fajından elde edilen MptD peptidi (62) (GKNHHHQHHRPQ) sentezletilerek MAP'ların IMS-PZR yöntemi ile tanısında kullanılmıştır. Fajın MptD parçası bakteri yüzeyindeki Mpt ile ligasyon yapmaktadır. MptD, MAP'ların yüzeyinde bulunan transporttan sorumlu bir proteindir (63). Bu çalışmada IMS yönteminde kullanılan paramanyetik boncuklar MptD peptidi ile kaplandı ve süt ve dışkı örnekleri incelendi. Bununla birlikte konvansiyonel PZR'da pozitiflik saptanan örneklerde IMS-PZR ile pozitiflik saptanamadı. Çalışmada kullanılan peptidin ticari bir firma tarafından Kanada da sentezlenmesinin ardından, laboratuvara ulaşma aşamasına kadar geçen transport süresi ve koşulları peptidin etkinliğini düşürmüş olabileceği düşünülmektedir.

Moleküler çalışmalarla MAP'lar dışkı ve sütte aynı anda saptanabilmektedir. Çek cumhuriyetinde dışkıda pozitiflik saptanan hayvanlarda sütte de % 10 - % 19.7 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Bu bulgular infekte sütçü sığırlarda subklinik olarak çiğ sütte de etkenin bulunabileceğini göstermiştir (54). Dünyanın çeşitli ülkelerinde inek sütlerinde % 2.8 ile 35 arasında değişen oranlarda pozitiflik bildirilmiştir (64). Bu çalışmada 20 süt örneğinin PCR ile incelenmesi sonucu % 13.60'ında sütte etken DNA'sına rastlanmıştır. Bu bulgu enfeksiyonun özellikle geç dönemlerinde hayvanlarda dışkı ile saçılımı yanısıra sütün de MAP etkenlerinin saçılmasında önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, Kayseri yöresinde süt sığırlarında paratüberkülozun yüksek bir oranda bulunduğu görülmüştür. Teşhiste kullanılacak laboratuvar yöntemlerinin hastalığın varlığının ortaya konulmasında önemli bir faktör olabileceği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Paratuberculosis (Johne's Disease). In: Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (eds.): Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats, Pigs and Horses. 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2007; 1017-44.
2. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing Company MPG Boks Ltd, Bodmin, Cornwall, 2002; 167-9.
3. Çetinkaya B, Muz A, Ertaş HB, Öngör H, Sezen İY, Gülcü HB. Süt ineklerinde paratüberkülozun prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. Tr J Vet Anim Sci 2000; 24: 371-9.
4. Makav V, Gökçe E. Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19 (5): 913-6.
5. Yıldırım D, Civelek T. Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak region. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19 (1): 121-6.
6. Ozturk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, Gunlu S, Guldali Y, Turutoglu H. Seroprevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Israel J Vet Med 2010; 65: 53-7.

7. Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M, Duffield TF. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227(8): 1302-8.
8. Losinger WC. Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *J Dairy Res* 2005; 72(4): 425-32.
9. Shanahan F, O'Mahony J. The mycobacteria story in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(7): 1537-8.
10. Wilks C. MAP, Crohn's and Johne's disease. *Aust Vet J* 2005; 83(10): 582.
11. Berghaus RD, Farver TB, Anderson RJ, Jaravata CC, Gardner IA. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. *J Dairy Sci* 2006; 89(3): 963-70.
12. OIE. Paratuberculosis Johne's Disease. 2007; 1-6.
13. Aytuğ CN, Görgül S, Tuncer ŞD, Alaçam E, Gökçen H, Yılmaz K. Sığır Hastalıkları. TÜMVET Hayvancılık ve Veteriner Hizmetleri San. Tic. Ltd. Şti., Bursa, 1991; 292-97.
14. Strickland SJ, Scott HM, Libal MC, Roussel AJ Jr, Jordan ER. Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2005; 88(7): 2432-40.
15. Nagata R, Kawaji S, Mori Y. Use of enoyl coenzyme A hydratase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for the serological diagnosis of Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 155: 253-8.
16. Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, Galvin J. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust Vet J* 2004; 82(9): 569-73.
17. Fernández-Silva JA, Abdulmawjood A, Akineden O, Bülte M. Serological and molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle of dairy herds in Colombia. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43 (8): 1501-7.
18. Adaska JM, Anderson RJ. Seroprevalence of Johne's-disease infection in dairy cattle in California, USA. *Prev Vet Med* 2003; 60(3): 255-61.
19. Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(6): 685-92.
20. Hendrick SH, Duffield TE, Kelton DE, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226(3): 424-8.
21. McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW, Sockett DC. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet Microbiol* 2005; 110(1-2): 105-11.

22. Muskens J, Elbers AR, van Weering HJ, Noordhuizen JP. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50(8): 372-7.
23. Eda S, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Scott MC, Speer CA. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 837-844.
24. Klausen J, Huda A, Ekeröth L, Ahrens P. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. *Prev Vet Med* 2003; 58(3-4): 171-8.
25. Hirst HL, Garry FB, Morley PS, Salman MD, Dinsmore RP, Wagner BA, McSweeney KD, Goodell GM. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection among dairy cows in Colorado and herd-level risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225(1): 97-101.
26. Eda S, Elliott B, Scott MC, Waters WR, Bannantine JP, Whitlock RH, Speer CA. New method of serological testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Johne's disease) by flow cytometry. *Foodborne Pathog Dis* 2005; 2(3): 250-62.
27. Ellingson JL, Koziczowski JJ, Anderson JL. Comparison of PCR prescreening to two cultivation procedures with PCR confirmation for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in U.S. Department of Agriculture fecal check test samples. *J Food Prot* 2004; 67(10): 2310-4.
28. Djonne B, Pavlik I, Svastova P, Bartos M, Holstad G. IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats and cattle in Norway. *Acta Vet Scand* 2005; 46(1-2): 13-8.
29. Motiwala AS, Strother M, Amonsin A, Byrum B, Naser SA, Stabel JR, Shulaw WP, Bannantine JP, Kapur V, Sreevatsan S. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5): 2015-26.
30. Rajeev S, Zhang Y, Sreevatsan S, Motiwala AS, Byrum B. Evaluation of multiple genomic targets for identification and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates using real-time PCR. *Vet Microbiol* 2005; 105(3-4): 215-21.
31. O'Reilly CE, O'Connor L, Anderson W, Harvey P, Grant IR, Donaghy J, Rowe M, O'Mahony P. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(9): 5138-44.
32. Romano MI, Amadio A, Bigi F, Klepp L, Etchehoury I, Llana MN, Morsella C, Paolicchi F, Pavlik I, Bartos M, Leao SC, Cataldi A. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol* 2005; 110(3-4): 221-37.

33. Stabel JR, Bannantine JP. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4744-50.
34. Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40(5): 1798-804.
35. Christopher-Hennings J, Dammen MA, Weeks SR, Epperson WB, Singh SN, Steinlicht GL, Fang Y, Skaare JL, Larsen JL, Payeur JB, Nelson EA. Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real-time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. J Vet Diagn Invest 2003; 15(2): 87-93.
36. Paolicchii FA, Zumarraga MJ, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Alito A, Romano M. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2003; 50(1): 20-6.
37. Tasara T, Stephan R. Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Appl Environ Microbiol 2005; 71(10): 5957-68.
38. Middleton JR, Hardin D, Steevens B, Randle R, Tyler JW. Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. J Am Vet Med Assoc 2004;224(3): 419-23.
39. Khare S, Ficht TA, Santos RL, Romano J, Ficht AR, Zhang S, Grant IR, Libal M, Hunter D, Adams LG. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1075-81.
40. Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. Appl Environ Microbiol 1998; 64(9): 3153-8.
41. Mason, O, Marsh IB, Whittington RJ. Comparison of immunomagnetic bead separation-polymerase chain reaction and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep faeces. Aust Vet J 2001; 79(7): 497-500.
42. Stratmann J, Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF. Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in milk. J Clin Microbiol 2002; 40(11): 4244-50.
43. Koepsell TD, Weiss NS. Epidemiologic Methods: Studying the Occurrence of Illness (1st ed). Oxford University Press, USA, 2003: 219-21.

44. McKenna SL, Keefe GP, Tiwari A, VanLeeuwen J, Barkema HW. Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can Vet J* 2006; 47(11): 1089-99.
45. Aly SS, Anderson RJ, Whitlock RH, Fyock TL, McAdams SC, Byrem TM, Jiang J, Adaska JM, Gardner IA. Cost-effectiveness of diagnostic strategies to identify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* super-shedder cows in a large dairy herd using antibody enzyme-linked immunosorbent assays, quantitative real-time polymerase chain reaction, and bacterial culture. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24(5): 821-32.
46. Diéguez FJ, Arnaiz I, Sanjuán ML, Vilar MJ, Yus E. Management practices associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and the effects of the infection on dairy herds. *Vet Rec* 2008; 162(19): 614-7.
47. Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Fetrow J, Oakes JM. The associations between culling due to clinical Johne's disease or the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Prev Vet Med* 2007; 80(2-3): 166-78.
48. McNab WB, Meek AH, Martin SW, Duncan JR. Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Can J Vet Res* 1991;55: 356-61.
49. DeLisle GW, Milestone BA. The economic impact of Johne's disease in New Zealand. In: Milner A, Wood P, eds. *Johne's disease*. East Melbourne: CSIRO 1989:41-5.
50. Donat K, Schlotter K, Erhardt G, Brandt HR. Prevalence and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. *Vet Rec* 2014;174(5): 119.
51. Nielsen SS, Toft N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med* 2009; 88 (1):1-14.
52. Sztejn J, Wiszniewska-Laszczych A. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy herds in Żuławy, Poland. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2012; 125 (9-10): 397-400.
53. Bhide M, Chakurkar E, Tkacikova L, Barbuddhe S, Novak M, Mikula I. IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. *Vet Microbiol* 2006; 112(1): 33-41.
54. Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(3): 1210-14.
55. Chevallier B, Versmisse Y, Blanchard B. Development of a PCR test to detect *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in bovine faeces. *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis*, p 247-50, 2003, Madison, Wisconsin.

56. Douarre PE, Cashman W, Buckley J, Coffey A, O'Mahony JM. Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. Gut Pathog 2010; 2(1): 11.
57. Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(9): 3153-8.
58. Soumya MP, Pillai RM, Antony PX, Mukhopadhyay HK, Rao VN. Comparison of faecal culture and IS900 PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in bovine faecal samples. Vet Res Commun 2009; 33(7): 781-91.
59. Whittington RJ, Marsh I, Turner MJ, McAllister S, Choy E, Eamens GJ, Marshall DJ, Ottaway S. Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. J Clin Microbiol 1998; 36(3): 701-7.
60. Gasteiner J, Awad-Masalmeh M, Baumgartner W. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. Vet Microbiol 2000; 77(3-4): 339-49.
61. Khare S, Ficht TA, Santos RL, Romano J, Ficht AR, Zhang S, Grant IR, Libal M, Hunter D, Adams LG. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in bovine milk and Feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1075-81.
62. Stratmann J, Strommenger B, Goethe R, Dohmann K, Gerlach GF, Stevenson K, Li LL, Zhang Q, Kapur V, Bull TJ. A 38-kilobase pathogenicity island specific for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* encodes cell surface proteins expressed in the host. Infect Immun 2004; 72(3): 1265-74.
63. Stratmann J, Dohmann K, Heinzmann J, Gerlach GF. Peptide aMptD-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in bulk milk samples. Appl Environ Microbiol 2006; 72(8): 5150-8.
64. Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. Vet Med 2008; 53(6): 283-306.