

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UŞAK YÖRESİ SÜTÇÜ SIĞIRLARDA SUBKLİNİK  
PARATÜBERKÜLOZUN PREVALANSI**

**Vet. Hekim DENİZ YILDIRIM**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
DOÇ DR. TURAN CİVELEK**

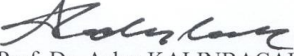
**Tez No:**

**2011 AFYONKARAHİSAR**

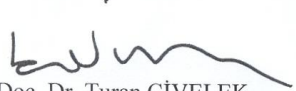
**KABUL ve ONAY**

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner)  
Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma,  
aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07.04.2011

  
Prof. Dr. Aslan KALINBACAK

Jüri Başkanı

  
Doç. Dr. Turan CİVELEK

Üye

  
Doç. Dr. Fatih M. BİRDANE

Üye

İç Hastalıkları (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Deniz  
YILDIRIM'ın "Uşak Yöresi Sütçü Sığırlarda Subklinik Paratüberkülozun Prevalansı"  
başlıklı tezi 15/04/2011 günü saat 16:00 da Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav  
Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. İsmail BAYRAM  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde desteklerini esirgemeyen, tez danışmanım Doç. Dr. Turan CİVELEK başta olmak üzere, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve personeline ve laboratuvar işlemlerin gerçekleşmesi yönünde verdiği destekten dolayı Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Kürşat Kav'a şükranlarımı sunarım.

Veteriner Hekim  
Deniz YILDIRIM

## İÇİNDEKİLER

|   | Sayfa       |
|---|-------------|
| <b>Kabul ve Onay</b>                                    | <b>II</b>   |
| <b>Önsöz</b>  | <b>III</b>  |
| <b>İçindekiler</b>                                      | <b>IV</b>   |
| <b>Simgeler ve Kısaltmalar</b>                          | <b>VII</b>  |
| <b>Şekiller</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>Resimler</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>Çizelgeler</b>                                       | <b>X</b>    |
| <b>1.GİRİŞ.....</b>                                     | <b>1</b>    |
| 1.1.Etiyoloji.....                                      | 1           |
| 1.2.Konak Yaygınlığı.....                               | 2           |
| 1.3.Prevalans.....                                      | 2           |
| 1.4.Patogenez.....                                      | 3           |
| 1.5.Bulaş.....  | 3           |
| 1.6.Klinik Tablo.....                                   | 4           |
| 1.7.Nekropsi Bulguları.....                             | 5           |
| 1.8.Ekonomik Önemi.....                                 | 5           |
| 1.9.Tanı.....   | 6           |
| 1.10.Kontrol ve Korunma.....                            | 8           |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                          | <b>10</b>   |
| 2.1. Gereç.....   | 10          |
| 2.1.1.Hayvan Meteryali Ve Örnekler.....                 | 10          |
| 2.1.2.M. Aviumsubs. paratuberculosis referans suşu..... | 10          |
| 2.1.3.Bakteriyoskopi.....                               | 10          |
| 2.1.3.1.FenollükربولFuksin (Ziehl-Neelsen).....         | 11          |
| 2.1.3.2.Asit-alkol (%3 w/v).....                        | 11          |
| 2.1.3.3.Metilen Mavisi.....                             | 11          |
| 2.1.3.4.Kültür.....                                     | 12          |
| 2.1.3.4.1.Dekontaminant-Nötralizer.....                 | 12          |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.3.4.1.a.Dekontaminat.....   | 12        |
| 2.1.3.4.1.b.Bromcreasolpurple solüsyonu.....                                  | 12        |
| 2.1.3.4.1.c.Nötralizer.....   | 13        |
| 2.1.3.4.2.Besiyeri.....   | 13        |
| <b>2.1.4.Moleküler Biyoloji.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>2.1.4.1.Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testi.....</b>                   | <b>13</b> |
| 2.1.4.1.a.Kültür ve Feces DNA ekstraksiyonu malzemeleri.....                  | 14        |
| 2.1.4.1.b.Süt numunelerinde DNA ekstraksiyonunda kullanılan malzemeler.....   | 14        |
| 2.1.4.b.1.Tris-EDTA (Etilen diamintetra asetik asit) (TE) pH 8.0.....         | 14        |
| 2.1.4.b.2.Sodyum asetat (Na-Asetat).....                                      | 14        |
| 2.1.4.b.3.Soğuk Ethanol %90 (w/v).....  | 15        |
| 2.1.4.b.4.Soğuk Ethanol %70 (w/v).....  | 15        |
| 2.1.4.c.DNA Amplikasyonu'ndakullanılan malzemeler.....                        | 15        |
| 2.1.4.1.c.1.Termalcykler.....   | 15        |
| 2.1.4.1.c.2.Primerler.....  | 15        |
| 2.1.4.1.c.2.1.M. Avium subsp. paratuberculosis IS 900 spesifik PZR primerleri | 16        |
| 2.1.4.1.d.TaqPolimeraz.....   | 16        |
| 2.1.4.1.e.Deoxynucleotide set.....  | 16        |
| 2.1.4.1.f.Film.....   | 17        |
| 2.1.4.1.g.Marker.....   | 17        |
| 2.1.4.1.h.PZR Pozitif.....  | 17        |
| 2.1.4.1.i.Agaroz jel elektroferesi için gerekli çözeltiler.....               | 17        |
| 2.1.4.1.i.1.Tris asetat (TBE) tamponu (10X).....                              | 17        |
| 2.1.4.1.i.2.Agoroz gel (% 1.5) (w/v).....                                     | 18        |
| 2.1.4.1.i.3.Etidyum bromür stok solüsyon (10 mg/ml).....                      | 18        |
| 2.1.4.1.i.4.Yükleme tamponu.....  | 18        |
| <b>3.2. YÖNTEM.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>3. 2. 1.Bakteriyoskopi.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>3. 2. 1. 1.Ziehl-Neelsen Boyama.....</b>                                   | <b>19</b> |
| <b>3.2.1.2.Kültür.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>3.2.1.2.1.Kültür için Klinik Örneklerin Dekontaminasyonu ve Kültüre</b>    | <b>19</b> |

*edilmesi..*

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.2.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....</b>                          | <b>20</b> |
| <b>3.2. 2.1.DNA İzolasyonu.....</b>                                    | <b>20</b> |
| <b>3.2.2.1.1.Feçes’den DNA İzolasyonu.....</b>                         | <b>20</b> |
| <b>3.2.3.2.1.Sütten DNA İzolasyonu.....</b>                            | <b>21</b> |
| <b>3.2.3.2.2.Ekstraksiyonu Yapılan DNA’ların Absorbans Tayini.....</b> | <b>22</b> |
| <b>3.2.2.3.PZR ile DNA amplikasyonu.....</b>                           | <b>22</b> |
| <br>   |           |
| <b>4. BULGULAR.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>4.1.Bakteriyoskopi Sonuçları.....</b>                               | <b>24</b> |
| <br>   |           |
| <b>5.TARTIŞMA.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>                                       | <b>41</b> |
| <b>7.ÖZET.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>8. SUMMARY.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>  | <b>44</b> |

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

|                  |   |
|------------------|---|
| EDTA             | Etilen daimin tetra asetik asit             |
| ELISA            | Enzim ilintili immün test                   |
| dNTP             | Deoksinükleotid set                         |
| HCl              | Hidroklorik asit                            |
| H <sub>2</sub> O | Distile su                                  |
| KCl              | Potasyum klorür                             |
| MAP              | Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis |
| NaOH             | Sodyum hidroksit                            |
| Na-Asetat        | Sodyum asetat                               |
| PCR              | Polimeraz Zincirleme Tepkimesi              |
| pTB              | Paratüberküloz                              |
| PZR              | Polimeraz zincir reaksiyon metodu           |
| TBE              | Tris asetat tamponu                         |
| ZN               | Ziehl-Neelsen                               |

**ŞEKİLLER****Sayfa**

Şekil 1. Süt örneklerinde üç farklı metotla tespit edilen pozitif vaka sayısı (O- PZR; outer PZR, N-PZR; nested PZR, K; kültür) (n=200). **35**

Şekil 2. Dışkı örneklerinde üç farklı metotla tespit edilen pozitif vaka sayısı (O- PZR; outer PZR, N-PZR; nested PZR, K; kültür) (n=200). **35**



**RESİMLER**

|  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| Resim 1. Feçes örneklerinde Ziehl - Neelsen boyama. Mikobakteriumlar (oklar).  | <b>24</b>    |
| Resim 2. <i>M. avium subsp. Paratuberculosis</i> pozitif kontrol, feçes ve süt numunelerinden elde edilen DNA ekstraksiyonları ile yapılan nested PZR. Outer 413 bp ve Nested 326 bpspesifik PZR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü. | <b>25</b>    |
| Resim 3. Nested PZR'ın IS900'de amplifiye ettikleri bölgelerin Primer search 1.1 ile gösterimi.  | <b>26</b>    |
| Resim 4. Feçes ve süt numunelerinde izole edilen <i>M.avium subsp. paratuberculosis</i> 'in BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slant with M J and ANV'da görüntüsü.  | <b>33</b>    |
| Resim 5. Qiagen QIAamp® DNA stool mini kit (50) (cat. No. 51504: Qiagen, Hilden, Germany).   | <b>34</b>    |

**ÇİZELGELER**

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| Tablo 1. Feçes ve Süt numunelerinin <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> yönünden çeşitli metot'larla incelenmesi.                       | <b>27</b>    |
| Tablo 2. Feçes ve süt numunelerinde <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> yönünden çeşitli metot'larla elde edilen sonuçlar ve yüzdeleri. | <b>32</b>    |

## 1. GİRİŞ

Paratüberküloz (pTB), *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*'in (MAP) neden olduğu, ruminantların ishalle seyreden kronik, yangısal ve ölümcül bir hastalığıdır. Enfeksiyon uzun süren “subklinik” evre ile karakterizedir. Enfekte sığırların birçoğunda dışkıda etken iki yaşından önce tespit edilemez. Enfeksiyonun bu erken döneminde sığırlarda, muhtemel bazı barsak hasarları meydana gelse de, paratüberkülozla ilişkili klinik bulguya rastlanmaz (Subklinik pTB) (Allaker ve Kapas, 2003; Baumgartner ve Khol, 2006). Bu dönemdeki sığırlar sürüdeki diğer hayvanları enfekte edebilme kabiliyetindedir (Baumgartner ve Khol, 2006). Klinik vakaların çoğuna 2-6 yaş arası sığırlarda rastlanır. Enfekte sığırların yaklaşık %1’lik kısmı ölür. Ortalama %50’si ise subklinik olarak yaşamına devam eder. Bu hayvanlarda verim kayıpları dışında bir bulguya rastlanmaz (Aiello, 1998).

Paratüberkülozis (Johne’s hastalığı) başlıca evcil sığır, koyun ve keçilerin bir hastalığı olarak düşünülmeyle birlikte, vahşi ve egzotik ruminant türlerini de kapsayan geniş bir çerçevede enfeksiyona neden olabilmektedir (Baumgartner ve Khol, 2006). pTB, özellikle sütçü sığır işletmelerinde ekonomik kayıpların en önemli nedenlerinden biridir (Hasanova ve Pavlik, 2006). MAP, insanlarda Crohn’s hastalığının muhtemel etkeni olup, zoonotik potansiyeli nedeniyle ayrıca önem arz eder (Anon, 2000).

### 1.1. Etiyoloji

Hastalık ilk kez, enfekte hayvanların bağırsağında 1895 yılında Johne ve Frothingham (Johne ve Frothingham, 1895) tarafından tespit edildi ve asit-faz bir basil

olarak tanımlandı. Tüberküloz basilinden farklı durmayan bu bakteri başlangıçta yanlış olarak tüberkülozun atipik bir formu olarak adlandırıldı. 1906 yılına gelindiğinde Bang (Bang, 1906) olgunun tüberküloz olmadığını tespit etti. Hastalık Bang (1906) tarafından Pseudotüberkülozis Enteritis olarak adlandırılmıştır. Zaman içerisinde hastalık Paratüberküloz veya Johne's hastalığı olarak isimlendirildi. Paratüberküloz yavaş gelişen, asit-faz bir bakteridir. Etken sığır dışkısında bir yıldan daha uzun süre canlı kalabilir. Yer üstü sularında ise canlılığını 160 gün kadar sürdürebilir. Sıfırın altında 14°C'de en az bir yıl aktif kalır (Baumgartner ve Khol, 2006).

## **1.2. Konak Yaygınlığı**

MAP'ın oldukça geniş bir konak dağılımı vardır. Başlıca ruminantların bir hastalığı olarak düşünülmeyle birlikte, muflon (Machackova ve ark., 2004), manda (Sivakumar ve ark., 2005) ve devegilleri de (Selbitz, 2002) kapsayan bir çerçevede hastalığa neden olur. Bunun yanı sıra ruminant olmayan türlerde de (kuşlar, yaban domuzu, fare, rat, tilki, ayı ve tavşan) hastalık rapor edilmiştir (Alvarez ve ark., 2005; Florou ve ark., 2005; Judge ve ark., 2005). Primat ve evcil domuzların da etkeni taşıdığı bilinmektedir. Etken bu türlerde klinik bulguya yol açmaz (Klee, 2004). MAP'ın insanlarda gözlenen Crohn's hastalığının etkeni olduğu bildirilmektedir (Nakase ve ark., 2006; Pickup ve ark., 2004).

## **1.3. Prevalans**

pTB vakalarına dünya üzerinde her kıtada rastlanmaktadır. Bununla birlikte, MAP'ın bölgesel ve ülkesel dağılımı farklılık gösterir. pTB prevalansı Almanya'da %84.7 olarak bildirilirken, Avustralya'nın bazı bölgeleri hastalıktan arı olarak rapor edilmiştir. İsveç'te pTB prevalansı oldukça düşüktür. Sütçü sürüler üzerinde yapılan çalışmalar pTB prevalansının Danimarka'da %47, Kanada'da %43, Amerika Birleşik

Devletlerin'de ise %50 olduğunu ortaya koymuştur (Collins ve ark., 1994; Jakobsen ve ark., 2000; Van leeuwen ve ark., 2001; Hacker ve ark., 2004; Holmström ve Stenlund, 2005).

#### **1.4. Patogenez**

Sığırların büyük bir kısmı yavruyken enfekte olur. Klinik paratüberkülozlu sığırların buzağılarının yaklaşık %25 intrauterin olarak enfekte doğar. Buzağılar enfeksiyona karşı daha duyarlı olmakla birlikte, düve ve yetişkin sığırlar da etkenle enfekte olabilir. MAP'ın primer yerleşim bölgesi ileumdur (Whitlock, 1996).

#### **1.5. Bulaş**

Postnatal fekal-oral bulaş hastalığın ortaya çıkışında önemli rol oynar. Yaklaşık 10 yılı bulan uzun bir inkübasyon süresi sonunda (Klee, 2004) enfekte hayvanlar büyük miktarlarda bakteriyi dışkıları ile yaymaya başlar. Bu dönemdeki hayvanlar klinik semptom göstermez. Ortalama bir gram dışkı ile bir milyon koloni MAP dışarı atılır (Whitlock ve ark., 2005). Dışkı ile bakteri yayımının 1.5 yıl yaştan önce başlamadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, son dönem çalışmalar genç buzağuların da dışkıları ile bakteriyi yaydığını ve enfeksiyonu aynı ortamdaki diğer buzağulara bulaştırdığını ortaya koymuştur (Bolton ve ark., 2005; Weber ve ark., 2005). Yeni doğan buzağular genellikle etkeni doğum sonrası oral yolla alır. Bu yolla etken geçişinde ana faktör doğumhanelerin ve anne memesinin fekal kontaminasyonudur. MAP aynı zamanda asemptomatik sığırların sütünde ve kolostrumda da bulunabilir. Bu yolla da bulaş oldukça mümkündür. Süt ve kolostrumun pastörizasyonu bulaş ihtimalini azaltır ancak tam anlamıyla ortadan kaldırmaz (Baumgartner ve Khol,

2006). MAP'in bulaşında semen ve embriyo transferi ile kontaminasyon ve vahşi ruminantların rezervuar etkileri net olarak ortaya konmamıştır (Philpott, 1993; Ayele ve ark., 2004; Judge ve ark., 2005).

## **1.6. Klinik Tablo**

Paratüberküloz yavaş yayılım gösteren bir hastalıktır. Bir sürünün pTB ile enfekte olarak tanımlanması için yıllar geçmesi gerekebilir. İyi yönetilen sürülerde enfeksiyon oranları daha düşüktür. Klinik vakaların çoğu 3-6 yaş arası sığırlarda ortaya çıkar. Genç enfekte sığırlar ise klinik bulgu göstermez (Subklinik pTB/sessiz enfeksiyon). Bu dönemde hastalığın ortaya konması oldukça zordur. Subklinik enfekte erişkin hayvanlarda da pTB'ye ilişkin gözlenebilir klinik bir bulgu yoktur. Bu dönem hayvanlarda pTB, MAP'e karşı oluşan spesifik antikorların tespiti ve fekal kültürde bakterinin varlığının ortaya konması ile teşhis edilebilir (Baumgartner ve Khol, 2006).

Enfekte sığırlarda hastalığa ilişkin ilk klinik bulgu genellikle buzağılama sonrası ortaya çıkar (Klee, 2004). Kronik veya aralıklı, zaman zaman normal kıvam ve yapıda gözlenen diyare hastalık için ilk bulgudur. Yanı sıra; kıl yapısında kabalaşma, deride kuruma ve iştah normal olmasına rağmen kronik kilo kaybı ilk semptomlardandır. Bu dönem sığırların hemen hemen tümünde fekal kültür pozitif sonuç verir, spesifik antikor tespiti ile hastalık teşhis edilebilir (Baumgartner ve Khol, 2006). İlerleyen dönemde enfekte sığır oldukça zayıflar. Mandibula düzeyinde aralıklı olarak oluşan ödamatöz şişlikler gözlenir. Süt verimi düşer. Hastalığın terminal döneminde projektıl diyare ve kaşeksi tipiktir. Hastalığın bilinen bir tedavisi yoktur (Baumgartner ve Khol, 2006).

### **1.7. Nekropsi Bulguları**

Sığırlarda nekropsi bulguları, barsaklarda diffuz granümatöz değişiklikler, enteritis ve nonnekrotik fibrozisdir. Hayvan oldukça zayıflamış, yağ depoları atrofiye olmuştur. İntermandibular ödem ve vücut boşluklarında seröz effüzyon tipiktir. Lezyonlar genellikle gastrointestinal sistem ve bölgesel lenf nodülleri ile sınırlı kalmıştır. Barsak mukozası ve özellikle ileum mukozasında kalınlaşma görülür. Barsak kıvrımlarında beyin benzeri görünüm tipiktir.

### **1.8. Ekonomik Önemi**

pTB süt sığırlarında gözlenen en masraflı ve yaygın hastalıklardan biridir. pTB aynı zamanda besi sığırı endüstrisini de etkiler. Klinik pTB'nin nihai sonucu ölüm olmakla birlikte, hastalık yol açtığı verim kayıpları, artan tedavi masrafları ve ilişkili olduğu infertilite, mastitis ve diğer subklinik hastalıklar nedeniyle önemli ekonomik kayıplara yol açar. Hayvan yetiştiricilerinin hastalığın varlığını kabul etmemeleri ve şüpheli olguları gizlemeleri nedeniyle hastalığın neden olduğu genel ve ekonomik etkiler net olarak ortaya konabilmiş değildir. Bu nedenle hastalığın gerçek prevalansının ortaya konması mümkün olmamıştır. pTB'nin Amerika Birleşik Devletlerinde neden olduğu ekonomik kaybın yıllık 1.5 milyar dolar olduğu rapor edilmiştir (Whitlock ve ark., 2005).

## 1.9. Tanı

Klinik pTB olguları genellikle semptomlar, anamnez ve nekropsisi sonuçları ile tanınır. Asemptomatik olgularda ise tanı amaçlı laboratuvar testlerden faydalanmalıdır. Bununla birlikte özellikle genç hayvanlarda kullanılabilir ve sensitivitesi yüksek bir test bulunmamaktadır. MAP'ın teşhisinde; Ziehl-Neelsen boyama, fekal kültür, Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) metodu ve antikor düzeylerini tespit eden ELISA gibi birçok farklı test metodu kullanılmaktadır. Teşhis amaçlı komplement fikzasyon, interferon gamma test, jel presipitasyon ve Johnin test'de kullanılabilir (Baumgartner ve Khol, 2006).

Klinik pTB olgularında dışkıda MAP'ın mikroskopik tespiti amacıyla Ziehl-Neelsen boyama yapılabilir. Bu metod Veteriner pratikte doğrulama amaçlı kullanılan en ucuz ve kolay yöntemdir (Nielsen ve ark., 2001). Subklinik enfekte olgularda ise bu metodun sensitivitesi oldukça düşüktür.

Dışkı ve doku (barsak, karaciğer lenf düğümü) örneklerinde ise bakteriyal kültür MAP'ın teşhisinde en yaygın olarak kullanılan testdir. Altın standart olarak değerlendirilir. MAP için kullanılan bakteriyal kültürün inkübasyon süresi 8-16 hafta arasında değişir (Kalis ve ark., 1999). Likid besi yerlerinin kullanımı ile bu süre 23 güne kadar indirilmiştir (Böttcher ve Gangl, 2005). Dışkı ve doku örneklerinin spesifitesi oldukça yüksek olmakla birlikte, fekal yayılımın geç başlaması ve MAP'ın bölgesel lenf yumrularına geç ulaşması nedeniyle sensitivitesi oldukça düşüktür. Teşhis maliyetlerini azaltmak ve daha yüksek spesifite ve sensitivite için aynı yaştaki en az beş farklı sığırdan alınan gaita örneklerinden hazırlanan havuz örnek bakteriyal kültür amacıyla kullanılabilir. Bu metodla elde edilen sonuçların spesifitesi %86 ve sensitivitesi ise %96 olarak bildirilmiştir (Collins ve ark., 2005).



PZR, bakteriyel kültür sonuçlarını doğrulamak ve yanı sıra bakterinin spesifik IS900 sekansını belirlemek amacıyla doku, süt ve kan örneklerinde kullanılabilir. PZR'nin avantajı, %90 düzeyinde olan yüksek spesifitesi ve 24 saatten kısa bir zamanda sonuç elde edilebilmesidir. Bununla birlikte simple (basit) PZR metodu %53 gibi düşük bir sensitiviteye sahiptir. Bu metotta canlı ve cansız MAP hücreleri arasında ayırım yapma imkanı yoktur (Kalis ve ark., 1999). Günümüzde kullanıma hazır birçok farklı PZR kiti ticari olarak mevcuttur. PZR, pTB'nin teşhisinde kullanılan ve modifiye edilerek geliştirilebilen bir metottur (Örn., Nested PZR) (Civelek ve ark., 2009).

ELISA günümüzde dünya üzerinde MAP'a karşı oluşan spesifik antikorların tespiti ile pTB'nin teşhisinde kullanılan en yaygın yöntemdir (Kalis ve ark., 1999). Genellikle kan (serum) örneklerinde kullanılmakla birlikte, sütte de teşhis amaçlı kullanılabilir (Khol ve ark., 2005). ELISA ile örnek analizleri hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilir. Ticari test kitlerine göre değişmekle birlikte, ELISA'nın spesifitesi ve sensitivitesi sırasıyla %84.7-99.8 ve %27.8-44.5 arasında değişir (Collins ve ark., 2005; Khol ve ark., 2005). MAP'la enfekte olan hayvanlarda şekillenen geç humoral cevap bu test metodunun başlıca dezavantajıdır. Özellikle genç ve yeni enfekte hayvanlarda antikor düzeylerindeki artışın yavaş olması yanlış negatif sonuçlara neden olabilir (Klee, 2004). Bununla birlikte ELISA, sürü MAP kontrol programlarında kullanılacak en ucuz ve en uygulanabilir testlerden biridir. Öte yandan, bireysel anlamda hayvanlarda teşhis amaçlı kullanılacaksa elde edilen sonuç dikkatli yorumlanmalıdır.

pTB'nin teşhisinde kullanılan tanı araçlarında büyük bir ilerleme sağlanmış olmakla birlikte, özellikle genç hayvanlarda ve enfeksiyonun erken dönemlerinde teşhis ve tanının doğruluğu tartışmalıdır. pTB'nin teşhisinde başarıya ulaşmada en önemli anahtar, doğru tanı aracının seçimi ve/veya birden fazla metodun birlikte kullanımı ile hayvanların ve sürünün gözden geçirilmesidir (Baumgartner ve Khol, 2006).

## 1.10 Kontrol ve Korunma

pTB tanısı zor olan ve tedavi edilemeyen bir hastalıktır. Bu nedenle hastalığın kontrolünde, MAP pozitif sürü sayısının azaltılması ve MAP negatif sürülere bulaşın önlenmesi son derece önemlidir. MAP pozitif hayvanlar sürüden elimine edilmeli ve şüpheli sürü farklı zaman dilimlerinde birkaç farklı testin kombinasyonu ile olası subklinik vakaların teşhisi yönüyle kontrol altında tutulmalıdır. Bu proje çerçevesinde; >1.5 yıl yaşlı hayvanlar altı aylık dönemlerde ELISA, bakteriyel kültür ve dışkıda PZR metodu ile olası enfeksiyonlar yönünden kontrol edilmelidir. Pozitif çiftliklerde alınacak olan ek hijyenik tedbirler ile hastalığın diğer sürülere yayılması önlenebilir. Alınan hijyenik önlemler başlıca sürüde bulunan buzağılara, yeni doğanlara ve satın alma yoluyla çiftliğe getirilen yeni bireylere hastalığın bulaşını engellemeyi amaçlar. Doğumhanede ve doğum anında uygulanan hijyen prosedürü ve yeni doğanın anneden ayrılması, antijen ve antikor negatif ve pozitif annelerden doğan yavruların farklı yerlerde barındırılması ile hastalıktan kısmen de olsa korunmuş olunur. Yeni doğan buzağuların beslenmesinde antijen ve antikor negatif annelerden alınan kolostrum kullanılmalıdır. Damızlık amaçlı negatif bireylerin kullanılması önerilir. Eradikasyon programı uygulanan çiftlikte ilk iki yıl boyunca besleme sırasında genç ve yaşlı hayvanlar ayrılmalıdır. MAP'in bulaşmasını önlemek amacıyla su kaynaklarına yakın tarlalarda hayvan gübresi kullanılmaması önerilir. Yavru ve genç hayvanlar için kullanılan teknik ve diğer iş ekipmanı ayrı olmalı, genel temizlik haricinde dezenfeksiyon kurallarına mutlak uyulmalıdır. Avrupa kıtasında çiftlik hayvanı ticaretinde pTB'nin durumuna ilişkin yasal bir sınırlama bulunmamaktadır. Çiftlik hayvanlarının hareketlerine sınırlama getirilmesi ve mevcut sürülerin ciddi test prosesleri ile pTB varlığı yönünden araştırılması, MAP'ten ari bölgelerin oluşması ve pTB'nin yayılmasının önlenmesi yönünden son derece önemlidir. >1.5 yaşlı ve test sonucu negatif sürüler tespit edilmelidir (Baumgartner ve Khol, 2006). Avusturya yasal çerçevede klinik pTB'yi ihbarı mecburi hastalıklar listesine alan ve klinik semptom gösteren hayvanları itlaf eden ve uygulanacak dezenfeksiyon prosesini kanuni olarak belirlemiş ilk ülkedir (Van leeuwen ve ark., 2001).

pTB sütçü sĞirlarda ciddi verim kayıplarına neden olan en önemli enfeksiyöz nedenlerden biridir. Ülkemizde de pTB ile ilgili çalışmalar yapılmakta ve güncelliğini korumaktadır (Civelek ve ark., 2009; ztrk ve ark., 2010). Mevcut alışmalar genellikle hastalığın bölgesel yaygınlığını ortaya koymaya yönelik olarak yürütülmüştür (etinkaya ve ark., 1999). Bununla birlikte, subklinik enfekte hayvanların yoğunluğu klinik pTB'nin gözlenme oranı ile direk ilişkilidir. Subklinik pTB'li hayvanlar hastalığı sağlıklı olanlara bulaştırma eğiliminde olmaları nedeniyle önemlidir. Hastalığın zoonotik potansiyeli ve pastörizasyona dayanıklılığı göz önünde bulundurulduğunda, özellikle sütçü sığır yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı bölgelerde subklinik enfeksiyon varlığının ortaya konması ayrıca önem arz eder. Sunulan araştırma ile Uşak yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberkülozun prevalansının ortaya konulması amaçlandı. Uşak yöresi süt sığırlarında subklinik pTB'nin prevalansını ortaya koyan bilimsel bir rapora rastlanmamıştır (Web of Science).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. GEREÇ

#### 2.1.1. Hayvan Materyali ve Örnekler

Sunulan araştırmanın hayvan materyali, Uşak il merkezi ve merkez köylerinde (Çamyazı (n=44), Beylerhan (n=14), Kaşbelen (n=36), Aşağıkaracahisar (n=4), Köprübaşı (n=12), Güneli (n=21), Sarıdere (n=2), İkisaray (n=12), Bozkuş (n=8), Karahasan (n=32), Karaağaç (n=3), Çevre (n=9), Selvioğlu (n=3)) süt sığırı yetiştiriciliği yapılan 31 işletmeden rastgele örnekleme yöntemi ile seçildi. Çalışma materyalini; siklik faaliyetleri devam eden, paratüberküloz yönünden aşılammamış, optimum vücut kondüsyon skoruna (BCS; 2.75-3.50) (Edmonson ve ark., 1989) ve süt verimine sahip, 3-7 yaşlı ve sağlıklı toplam 200 adet multiparoz Holştayn sütçü sığır oluşturdu. Çalışma örneği olarak her hayvandan dışkı ve süt numuneleri uygun şekilde steril taşıma kapları içerisine toplandı. Örnekler soğuk zincirde analiz için laboratuvara gönderildi.

#### 2.1.2. *M. avium subs. paratuberculosis* referans suşu

Araştırmada, bir adet referans suş pozitif kontrol olarak, *M. avium subs. paratuberculosis* 316 F Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma enstitüsünden, Ankara temin edildi.

### 2.1.3. Bakteriyoskopi

#### 2.1.3.1. Fenollü karbol Fuksin (Ziehl-Neelsen)

|              |        |
|--------------|--------|
| Bazik fuksin | 3 gr   |
| Etanol (%95) | 100 ml |
| Fenol        | 5 gr   |
| Distile su   | 100 ml |

Bazik fuksin bir havan içerisinde, üzerine azar azar alkol ilave edilerek ezildi (Solüsyon 1). Kristal haldeki fenol 45–50 °C'ye ısıtılarak eritildi üzerine distile su eklenerek homojen bir karışım elde edildi (Solüsyon 2). 10 ml solüsyon 1.90 ml solüsyon 2 ile karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Boya solüsyonu hazırlandıktan sonra koyu renkli kapaklı şişelere aktarıldı. 24 saat bekletildikten ve filtre edildikten sonra kullanıldı.

#### 2.1.3.2. Asit-alkol (%3 w/v)

|              |       |
|--------------|-------|
| HCl (%37,5)  | 3 ml  |
| Etanol (%95) | 97 ml |

### 2.1.3.3. Metilen Mavisi

|                |        |
|----------------|--------|
| Metilen mavisi | 0.3 gr |
| Distile su     | 100 ml |

Metilen mavisi havanda ezildikten sonra distile su eklenerek eritildi. Boya solüsyonu süzöldükten sonra koyu renkli şişelere aktarıldı.

### 2.1.3.4. Kültür

#### 2.1.3.4.1. Dekontaminant-Nötralizer

Költüre edilecek dışkı ve süt, homojenize edildikten sonra, kontaminasyonları inaktive etmek için dekontaminant ve nötralizer solüsyonları ile muamele edildi (Petroff, 1915; Erganiş, 1994; Palamino ve Portales, 1998; Ambrosio ve ark., 2008).

#### 2.1.3.4.1.a. Dekontaminat

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| NaOH (Sodyum Hidroksit)      | 20 gr    |
| Steril distile su            | 917.5 ml |
| Bromkreasol purple solüsyonu | 4.5 ml   |

**2.1.3.4.1.b. Bromcreasol purple solüsyonu**

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Bromcreasol purple | 1.2 gr |
| Etanol (%95)       | 50 ml  |
| Distile su         | 50 ml  |

**2.1.3.4.1.c. Nötralizer**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| HCl (%37,5)       | 82.5 ml |
| Steril distile su | 1000 ml |

**2.1.3.4.2. Besiyeri**

Klinik örneklerden *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'i üretmek için BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slant with M J and ANV (Cat No: 8015750, USA) besiyeri ticari ürün olarak temin edilerek kullanıldı.

**2.1.4. Moleküler Biyoloji****2.1.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testi**

**2.1.4.1.a. Kültür ve Dışkı DNA ekstraksiyonu malzemeleri**

Kültür ve dışkı numunelerinden DNA ekstraksiyonu için Qiagen QIAamp® DNA stool mini kit (50) (Cat. No. 51504: Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı.

**2.1.4.1.b. Süt numunelerinde DNA ekstraksiyonunda kullanılan malzemeler****2.1.4.1.b.1. Tris-EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (TE) pH 8.0**

|            |                        |
|------------|------------------------|
| 10 Mm Tris | 0.12 gr                |
| 1 Mm EDTA  | 0.37 gr                |
| SDS        | 100 gr                 |
| Distile su | 1000 ml'ye tamamlandı. |

**2.1.4.1.b.2.Sodyum asetat (Na-Asetat)**

|            |                        |
|------------|------------------------|
| Na-Asetat  | 0.25 gr                |
| Distile su | 1000 ml'ye tamamlandı. |

**2.1.4.1.b.3. Soğuk Ethanol %90 (w/v)**



|            |   |
|------------|---|
| Etanol     | 90 ml                                     |
| Distile su | 100 ml'ye tamamlandı, -20 °C'de saklandı. |

#### **2.1.4.1.b.4. Soğuk Ethanol %70 (w/v)**

|            |   |
|------------|---|
| Etanol     | 70 ml                                     |
| Distile su | 100 ml'ye tamamlandı, -20 °C'de saklandı. |

#### **2.1.4.1.c. DNA amplifikasyonu'nda kullanılan malzemeler**

##### **2.1.4.1.c.1. Thermal cycler**

Eppendorf Master Gradient Thermalcycler (Eppendorf, Germany) kullanıldı.

##### **2.1.4.1.c.2. Primerler**

##### **2.2.4.1.c.2.1. M. avium subs. paratuberculosis IS 900 spesifik PZR primerleri**

Primer olarak *M. avium subs. paratuberculosis*'in PZR çalışmaları için çok sık olarak kullanılan hedef bölge MAP için spesifik IS900 gen bölgesi (*M. paratuberculosis* IS900A sequence on the EMBL GenBank DNAsequence database, accession number X16293) kullanıldı. PZR çalışmaları Nested PZR şeklinde uygulandı ve Gen bölgesine yönelik seçilen oligonükleotid primerleri;  
**MAPOF1**: 5'-GAAGGGTGTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3', Outer  
**MAPOR1**: 5'-GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGTGAC-3', Outer  
**MAPNF1**: 5'-CAGGGACGTCGGGTATGGCTTTCA-3', nested  
**MAPNR1**: 5'-CGTCACCGCCGCAATCAACTCCAG-3', nested

Ryan ve ark 2002 bildirdiği şekilde ThermoScientific (Almanya) sentezletirildi. Primerler 100µM'lık oranında sulandırıldı. PZR çalışmalarında son konsantrasyon 1 µM olacak şekilde kullanıldı.

#### **2.1.4.1.d Taq polimeraz**

Taq DNA polimeraz (Fermentas 5 U/µl, EP0402) kullanıldı.

#### **2.1.4.1.e. Deoxynucleotide set**

dNTP set(Fermentas 4x100 µl/mol, R0185), istenilen molaritede distile su ile sulandırılarak kullanıldı.

**2.1.4.1.f. Film**

Sony T 300 Cybershot dijital fotoğraf makinesi ve filtre (Sarı renkli, USA) ile kombine edilerek kullanıldı.

**2.1.4.1.g. Marker**

Fermentas 100 bp (3000 bp) SM321 1/2/3 plus 0.5 µl DNA Ladder olarak kullanıldı.

**2.1.4.1.h. PZR Pozitif**

*M. avium subsp. paratuberculosis* 316 F, suşlarından hazırlanan DNA ekstraksiyonları kullanıldı.

**2.1.4.1.I. Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler****2.1.4.1.i.1. Tris asetat (TBE) tamponu (10X)**

|  |         |
|--|---------|
| Tris base                              | 60.5 g  |
| Borik asit                             | 30.85 g |
| Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O | 3.72 g  |

H<sub>2</sub>O (Distile su) 1 L'ye tamamlandı.

Kullanıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı.

#### **2.1.4.1.i.2 Agoroz gel (% 1.5) (w/v)**

|        |           |
|--------|-----------|
| Agaroz | 3 g (w/v) |
| TBE    | 200 ml    |

#### **2.1.4.1.i.3. Etidyum bromür stok solüsyon (10 mg/ml)**

|                |         |
|----------------|---------|
| Etidyum Bromür | 20 mg   |
| Distile Su     | 1.98 ml |

Karanlıkta muhafaza edildi ve stok solüsyon agaroz jele 0.5 µg/ml oranında katıldı

#### **2.1.4.1.i. 4. Yükleme tamponu**

6X Loading dye solution (MBI Fermentas, R0411)

Örneklerin jele yüklenmesi için 22 göze sahip (20x0.1x8) taraklarda: 1.4 µl (6x) yükleme tamponu ile 7 µl PZR ürünü kullanılmıştır.

## **3.2. YÖNTEM**

### **3.2.1. Bakteriyoskopi**

#### **3.2.1.1. Ziehl-Neelsen Boyama**

- a) Hazırlanan preparatlar 10 dakika Etil alkol ile tespit edildi.
- b) Lam üzerine 10 ml karbol fuksin solüsyonu konularak alttan 4-5 dakika ısıtıldı.
- c) Boya dökülerek asit-alkolde 30 sn renksizleştirildi.
- d) Su ile yıkandı.
- e) Preparat üzerine metilen mavisi dökülerek 10-15 sn boyandı.
- f) Preparat yıkanarak kurutuldu, mikroskopta (LEITZ, Laborlux 12 Bioküler ışık mikroskobu) immersiyon objektifte incelendi. Mikobakteriumlar pembe, diğer mikroorganizmalar ve zemin mavi renkte gözlendi (Arda 1997).

#### **3.2.1.2. Kültür**

##### **3.2.1.2.1. Kültür için Klinik Örneklerin Dekontaminasyonu ve Kültüre edilmesi**

Ziehl-Nelseen ve Nested PZR'da pozitif bulunan dışkı ve süt numunelerinden ekim yapılmadan önce diğer kontaminant mikroorganizmaları inaktive etmek için, 10-20 gr numune cam homojenizatör içinde ezildi. Eşit miktarda dekontaminant ile

5-10 saniye karıştırılarak oda ısısında 10 dakika tutuldu. Üzerine eşit miktarda nötralizer ilave edilerek 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Sedimentin bir kısmı direkt mikroskopi için preparat hazırlamada kullanılırken, bir kısmı da BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slant with M J and ANV (USA, Cat No: 8015750) besiyerine ekilerek 37 °C'de 6–8 hafta inkübasyona bırakıldı. Tüplerin kapakları haftada 2-3 kez açılarak oksijenlenmesi sağlandı (Petroff, 1915; Erganiş, 1994; Palamino ve Portales, 1998; Ambrosio ve ark., 2008). Tüm bu işlemler Class II Biyogüvenlik Kabini altında gerçekleştirildi.

### **3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

#### **3.2.2.1. DNA İzolasyonu**

##### **3.2.2.1.1. Dışkı'dan DNA İzolasyonu**

*M. avium* subsp. *paratuberculosis* 316 F referans kültürü ile sığırlardan alınan dışkı örnekleri (soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılan) (200 mg dışkı numunesi) 2 ml steril eppendorf tüplerine alınarak üzerine 1.4 ml kitle beraber gelen ASL bufer solüsyonu eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 1 dakika vortekslendi ve 95°C'de 5 dakika süre ile termal blokta (VWR 460-3208, USA) inkübe edildi. Süre sonunda numuneler 15 saniye vortekslenerek 14.000xg de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlenen numunelerin süpernatantlarından 1.2 ml alınarak 2 ml eppendorf tüplerine konuldu. Kitle gelen InhibitEX tabletlerinden herbirine birer adet ilave edilerek oda ısısında 1-2 dakika tabletler eriyinceye kadar vortekslendi. Numuneler tekrar 14000Xg'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatantlarından 200 µl alınarak

içerisinde 15µg proteinaz K içeren 1.5 ml eppendorf tüplerine ilave edilerek üzerlerine 200 µl AL bufer'inden ilave edilerek 70°C'de 10 dakika inkübe edilerek üzerlerine tekrar 200 µl %96'lık etil alkolden ilave edildi. Numuneler QiAamp spin kolona içerisine aktarılıp kapakları kapatılıp 14000Xg'de bir dakika santrifüj edilerek filtratları atıldı. QiAamp spin kolon tekrar 2 ml eppendorf tüplerine yerleştirildi ve üzerlerine 500 µl bufer AW1 ilave edilerek tekrar bir dakika 14.000xg'de santrifüj edildi ve filtratlar atıldı. Daha sonra QiAamp spin kolon yeniden 2 ml santrifüj tüplerine yerleştirildi ve bu defa üzerine 500 µl AW2 ilave edildi ve 14000Xg'de üç dakika santrifüj edildi ve filtratlar tekrar atıldı. Son olarak QiAamp spin kolon tekrar 1.5 ml santrifüj tüplerine yerleştirildi ve üzerine 200 µl AE bufer ilave edilerek oda ısısında bir dakika inkübe edildi ve 14000Xg'de bir dakika santrifüj edilerek QiAamp spin kolon atıldı. Böylece 1.5 ml eppendorf tüpünde DNA'lar ekstrakte edilmiş oldu ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### **3.2.2.1.2. Sütten DNA İzolasyonu**

Sığırlardan alınan 10 ml'lik süt numüneleri 20.000 rpm'de 1 saat santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Tüplerin dibindeki peletler 1 ml distile su ile süspanse edilerek 1 dakika vortekslenerek 500 µl'lik volümler halinde ependorf tüpüne aktarıldı. Santrifüj ile 13.000Xg'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Tüpdeki peletlere 300 µl Tris-EDTA ilave edilerek vortekslendi. Tüpler 95°C'de 15 dk termal blokta inaktive edildi ve oda ısısında soğutuldu. Tüplere 300 µl Tris-HCl ile satüre edilmiş Fenol ilave edilerek 4-5 dk elle alt-üst edildi ve 13.000Xg'de 10 dk. santrifüj edilerek üst sıvı başka bir ependorf tüpe aktarıldı. Aktarım yapılan ependorf tüpdeki DNA için presipitasyon işlemine geçildi. 0.1 volüm 3 M Na-Asetat ve 2.5 volüm saf etanol ilave edildi. Süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra -20°C'de bir saat bekletildi. Süspansiyon 13.000 g'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Süspansiyona 300 µl %90'lık ve %70'lik etanol ilave edildi. Bu basamaklar arasında süspansiyonlar 13.000 g'de 5 dk santrifüj edildi ve her

defasında süpernatant atıldı. Peletlere 50 µl distile su ile 60°C' de bir saat DNA denatüre edilerek PZR'da kullanıldı.

### 3.2.2.2. Ekstraksiyonu Yapılan DNA'ların Absorbans Tayini

Ekstraksiyonu yapılan DNA örneklerinin saflık ve miktar tayinleri 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansiteli (OD) spektrofotometre (Eppendorf, Model 6131) kullanılarak yapıldı. Distile su blank olarak kullanıldı. 50 µl DNA örneği distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. 260 nm (OD260) ve 280 nm (OD280) dalga boylarında ölçümleri yapıldı. DNA örneklerinin konsantrasyonları ng/ml cinsinden elde edildi.

OD260 ve OD280 değerlerine göre hesaplanan DNA miktarları birbiri ile oranlanarak (OD260/OD280), 1.8-2.0 arasında bulunanlar PZR'de kullanıldı. DNA miktarı düşük çıkan örneklerde ekstraksiyon tekrarlandı.

### 3.2.2.3. PZR ile DNA amplifikasyonu

Nested PZR ile DNA amplifikasyonu iki aşamalı olarak uygulandı. Outer PZR için *M. avium subsp. paratuberculosis* türlerinde bulunan IS900 gen bölgesi üzerinde 413 bp fragmenti kodlayan **MAPOF1**: 5'-GAAGGGTGTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3' ve **MAPOR1**: 5'-GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGTGAC-3' primerleri ile *M. avium subsp. paratuberculosis* 316 F referans, dışkı ve süt numunelerinden elde edilen DNA ekstraksiyonlarına uygulandı. PZR ürünleri agaroz jelde görüntüledikten sonra pozitif ve negatif numunelerden 1 µl alınarak gen bölgesinde 326 bp'lik fragmenti kodlayan **MAPNF1**: 5'-



CAGGGACGTCGGGTATGGCTTTCA-3' ve **MAPNR1**: 5'-CGTCACCGCCGCAATCAACTCCAG-3' primerleri ile Nested PZR uygulandı.

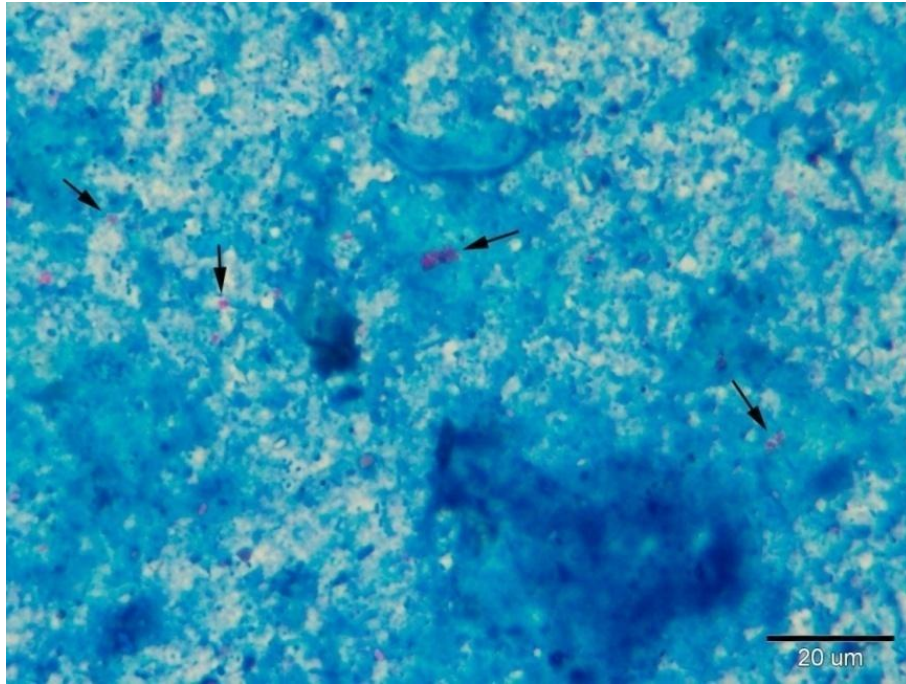
Outer PZR için Amplifikasyon, 50 µl PZR tamponunda gerçekleştirildi. PZR tamponu; 5 µl PCR buffer (KCl'li), 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTP set (10 mM), 1 µl (1 µM) her bir primer (MAPOF1, MAPOF1), 0.25 µl (1.25 U) Taq DNA polimeraz, 33,75 µl steril ultra saf su ve 5 µl hedef DNA içerdi. Hedef DNA, PZR-*thermal cycler* cihazında 95 °C'de 15 dakika ön denatürasyon, 30 siklus 94 °C'de bir dak., 58 °C bir dak., 72 °C üç dak. ve 72 °C iki dak. son zincir uzaması ile çoğaltıldı (Ryan ve ark 2002). 5 µl DNA, 1 µl loading dye solüsyonu ile boyandı. 5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1.5 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Pozitif ve Negatif numunelerden Nested PCR amplifikasyonu için 1 µl alındı ve reaksiyon 25 µl PZR tamponunda gerçekleştirildi. PZR tamponu; 2.5 µl PCR buffer (KCl'li), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µl dNTP set (10 mM), 0.5 µl (1 µM) her bir primere (**MAPNF1**, **MAPNR1**), 0.25 µl (1.25 U) Taq DNA polimeraz, 18,55 µl steril ultra saf su ilave edildi. Hedef PZR ürünü, PZR-*thermal cycler* cihazında 95 °C'de 15 dakika ön denatürasyon, 30 siklus 94 °C'de bir dak., 55 °C bir dak., 72 °C üç dak. ve 72 °C iki dak. son zincir uzaması ile çoğaltıldı (Ryan ve ark 2002). Marker olarak 1000 bp DNA ladder, pozitif kontrol olarak *M. avium subsps. paratuberculosis* 316 F referans suşunun DNA ekstraksiyonu kullanıldı.

## 4. BULGULAR

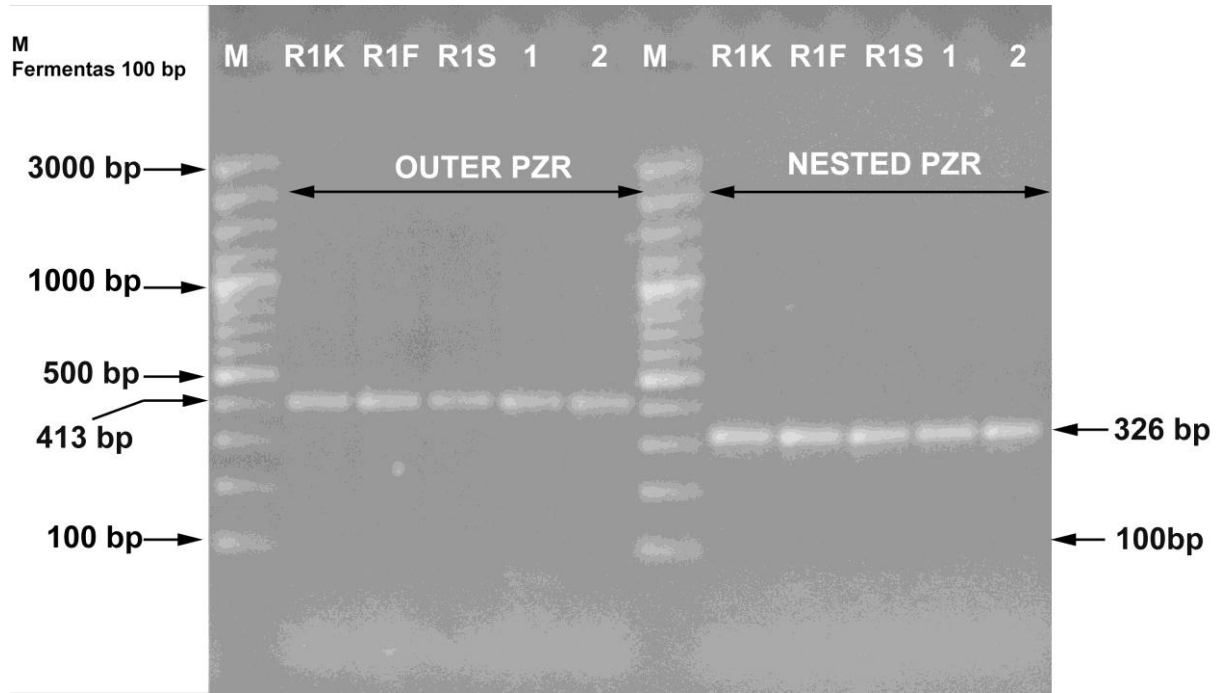
### 4.1. Bakteriyoskopi Sonuçları

Ziehl Neelsen boyama ile bakteriyoskopi sonucu, **200 adet sığırdan alınan** dışkı ve süt numunelerinde mikobakterium şüpheli pembe renkte, küçük basiller görüldü (Resim 1.)

**Resim 1.** Dışkı örneklerinde Ziehl - Neelsen boyama. Mikobakteriumlar (oklar).



**Resim 2.** *M. avium subsps. paratuberculosis* pozitif kontrol, dışkı ve süt numunelerinden elde edilen DNA ekstraksiyonları ile yapılan nested PZR. Outer 413 bp ve Nested 326 bp spesifik PZR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.



**M:** 100 bp DNA gen Ladder (SM321, Fermentas), **R1K:** *M. avium subsps. paratuberculosis* 316F kültürde ekstrakte edilen DNA, **R1F:** *M. avium subsps. paratuberculosis* 316F dışkıya katılarak ekstrakte edilen DNA, **R1S:** *M. avium subsps. paratuberculosis* 316F süte katılarak ekstrakte edilen DNA, **1:** Dışkıdan izole edilen DNA ekstraksiyonu, **2:** Sütten ekstrakte edilen DNA ile Nested PZR ürünleri.

**Resim 3.** Nested PZR'in IS900'de amplifiye ettikleri bölgelerin Primer search 1.1 ile gösterimi.

IS 900-1451 bp

(1)tccttacctttctt**gaagggtgttcggggccgtcgettaggcttcgaattgccagggacgtcgggtatggctttca**  
**tgtggttgctgtgttgatggccgaaggagattggccgcccggtcccgcgacgactgaccgctaattgagag**  
**atgcgattggatcgetgtgtaaggacacgtcggcgtggtcgtctgctgggtgatctggacaatgacggttacgga**  
**ggtggttgggcacaacctgtctgggcgggctggacgccgtaaggccgaccattactgcatggttattaacgac**  
**gacgcgcagcagattgctctcgcagcgggtggccaacgacgagggccgcgtgctggagttgattgcggcggtgac**  
**gacgttggccgatggaggcgaggtcacgtggggcatcgacctcaacgcc**ggcggcgccgcggttgctgatgccttg  
ctcatcgtgccgggcagcggctgcttatattcccgggcgcacggccatcacgccgggtagttaccgcggcgaag  
gcaagaccgacgc.....cccaagccgtcctgcct  
ggccccgccgctcaacgtcctgtggccatgctgcgcgaccacgtgtctaccacccgcaaccactaccgcggc  
ggcttgacaacgtcattgagaat(1451).







Çizelge 1. (Devamı)

| No  | Ziehl-Neelsen Boyama | Dışkı      |        | Kültür | Ziehl-Neelsen Boyama | Süt        |        | Kültür |
|-----|----------------------|------------|--------|--------|----------------------|------------|--------|--------|
|     |                      | Nested PCR |        |        |                      | Nested PCR |        |        |
|     |                      | Outer      | Nested |        |                      | Outer      | Nested |        |
| 133 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 134 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 135 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 136 | +                    | +          | +      | -      | +                    | -          | +      | -      |
| 137 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 138 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 139 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 140 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 141 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 142 | +                    | +          | +      | -      | +                    | -          | +      | -      |
| 143 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 146 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 147 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 148 | +                    | -          | +      | -      | -                    | -          | +      | -      |
| 149 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 150 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 151 | +                    | +          | +      | +      | +                    | +          | +      | +      |
| 152 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 153 | +                    | -          | +      | -      | +                    | -          | +      | -      |
| 154 | -                    | -          | +      | -      | -                    | -          | +      | -      |
| 155 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 156 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 157 |                      |            |        |        |                      |            |        |        |
| 158 | +                    | +          | +      | -      | +                    | -          | +      | -      |
| 159 | +                    | +          | +      | +      | +                    | -          | +      | -      |
| 160 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 161 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 162 | +                    | +          | +      | -      | +                    | +          | +      | -      |
| 163 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 164 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 165 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 166 | +                    | +          | +      | +      | +                    | +          | +      | +      |
| 167 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 168 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 169 | +                    | +          | +      | +      | +                    | +          | +      | +      |
| 170 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 171 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 172 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 173 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 174 | +                    | +          | +      | +      | +                    | +          | +      | +      |
| 175 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 176 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 177 | -                    | -          | -      | -      | -                    | -          | -      | -      |
| 178 | +                    | +          | +      | +      | +                    | -          | +      | -      |





**Çizelge 2.** Dışkı ve süt numunelerinde *M. avium subsp. paratuberculosis* yönünden çeşitli metot'larla elde edilen sonuçlar ve yüzdeleri.

| Sonuç     | Ziehl-Neelsen Boyama | Dışkı Nested PCR |         | Kültür  | Ziehl-Neelsen Boyama | Süt Nested PCR |         | Kültür  |
|-----------|----------------------|------------------|---------|---------|----------------------|----------------|---------|---------|
|           |                      | Outer            | Nested  |         |                      | Outer          | Nested  |         |
|           |                      | +/ n (200)       | 34/200  |         |                      | 19/200         | 40/200  |         |
| -/n (200) | 166/200              | 181/200          | 160/200 | 192/200 | 169/200              | 189/200        | 165/200 | 195/200 |
| ?/n(200)  | 2/200                | -                | -       | -       | 5/200                | -              | -       | -       |
| %+        | %17                  | %9.5             | %20     | %4      | %15.5                | %5.5           | %17.5   | %2.5    |
| %-        | %82                  | %90.5            | %80     | %96     | %82                  | %94.5          | %22.5   | %97.5   |
| %?        | %1                   | -                | -       | -       | %2.5                 | -              | -       | -       |

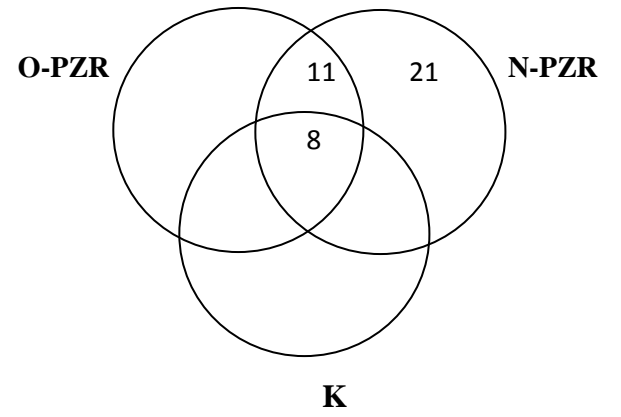
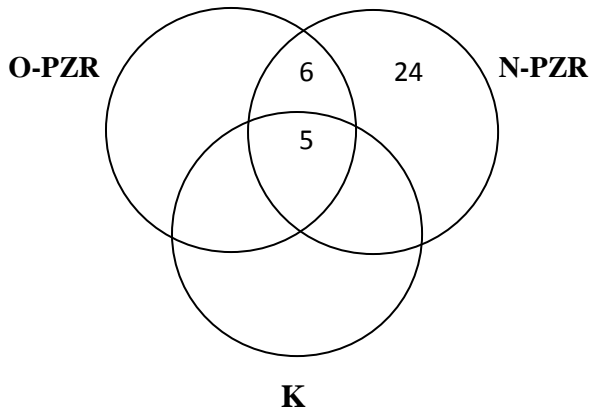
+: pozitif, ?:Şüpheli, -: Negatif

**Resim 4.** Dışkı ve süt numunelerinde izole edilen *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slant with M J and ANV'da görüntüsü.



**Resim 5.** Qiagen QIAamp® DNA stool mini kit (50) (cat. No. 51504; Qiagen, Hilden, Germany).





**Şekil 1.** Süt örneklerinde üç farklı metotla tespit edilen pozitif vaka sayısı (O-PZR; outer PZR, N-PZR; nested PZR, K; kültür) (n=200).

**Şekil 2.** Dışkı örneklerinde üç farklı metotla tespit edilen pozitif vaka sayısı (O-PZR; outer PZR, N-PZR; nested PZR, K; kültür) (n=200).

## 5. TARTIŞMA

MAP, Johne's hastalığının etiyolojik ajanıdır. pTB özellikle süt sığırları işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olur (Coelho ve ark., 2007; Nielsen ve Toft, 2009; Moghadam ve ark., 2010). pTB'li hayvanlar etkeni başlıca dışkı ve süt ile dış çevreye yayarlar (Moghadam ve ark., 2010). Subklinik pTB'li hayvanlar hastalığı sağlıklı bireylere bulaştırma eğilimlerinden dolayı ayrıca önemlidir. Türkiye'de pTB'nin varlığı uzun yıllardır bilinmesine rağmen, hastalık ve hastalığın prevalansı üzerine yürütülmüş bilimsel çalışma sayısı oldukça azdır (Fırat ve ark., 1978; Vural ve Atala, 1988; Çetinkaya ve ark., 1999; İkiz ve ark., 2005; Civelek ve ark., 2009). Uşak yöresi süt sığırlarında hastalığın prevalansı üzerine gerçekleştirilmiş bilinen bir bilimsel rapor ise mevcut değildir (Web of Science). Sunulan çalışmada yoğun olarak süt sığırları yetiştiriciliği yapılan Uşak yöresinde subklinik pTB'nin prevalansının ortaya konulması amaçlandı.

Sunulan çalışmada *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, dışkı ve süt örneklerinde, direk bakteriyoskopi (Ziehl-Neelsen boyama) tekniği ve Ziehl-Neelsen'de pozitif bulunan numunelerde ise kültür ve PZR (Outer ve Nested) teknikleri ile belirlendi. Çalışma için optimal süt verimi ve BCS'ye sahip, klinik olarak sağlıklı ve 3-7 yaşlı Holştayn süt sığırları (n=200) seçildi.

Uşak yöresi süt sığırlarında subklinik pTB'nin prevalansı, dışkı örneklerinde; Ziehl-Neelsen boyama ile %17, Outer PZR tekniği ile %9.5, Nested PZR tekniği ile %20, Bakteriyolojik Kültür sonuçlarına göre %4, süt örneklerinde ise; Ziehl-Neelsen boyama ile %15.5, Outer PZR tekniği ile %5.5, Nested PZR tekniği ile %17.5 ve Bakteriyolojik Kültür sonuçlarına göre %2.5 olarak tespit edildi.

Konvensiyonel IS900 PZR primerleri kullanılarak real-time PZR ile MAP'ın teşhisi yapılabilir. Bu maksatla, zaman içerisinde, en uygun ve güvenilir metodu belirlemek amacıyla farklı stratejiler geliştirilmiştir (Khare ve ark., 2004; Ayele ve ark., 2005; Tasara ve Stephan, 2005; Herthnek ve Bolske, 2006). Nested PZR metodunun ilk kez 1993 yılında, MAP'ın teşhisinde fekal kültür ve PZR'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada, kullanıldığı görülmektedir (Collins ve ark.,1993). Nested-PZR tekniği bu yıldan sonra ve özellikle Crohn's hastalığında MAP'ın teşhisi amacıyla ve pTB ile ilgili diğer birçok bilimsel araştırmada metot olarak yer almıştır. (Lisby ve ark.,1994; Ryanve ark., 2002; Gao ve ark., 2002; Fang ve ark., 2002; Bull ve ark., 2003; Autschbach ve ark., 2005; Pinedo ve ark., 2008; Meadus ve ark 2008; Civelek ve ark., 2009). Dışkı örneklerinde MAP'ın teşhisinde kullanılan PZR testleri son yıllarda önemli ölçüde gelişim göstermiş ve sensitiviteeleri yükselmiştir. Yeni yöntemler, küçük miktarlarda ki fekal MAP'ın teşhisine dahi imkan tanımaktadır. Sensitivedeki artışın ana nedeni ise DNA ekstraksiyon ve purifikasyon prosedürlerinin geliştirilmiş olmasıdır (Moghadam ve ark., 2010).

Nested PZR metodu, konvensiyonel/basit PZR metoduna göre, enfekte hayvanların tespitinde daha duyarlıdır (Gao ve ark., 2009; Moghadam ve ark., 2010). Her iki metodun da etken tespit oranlarının dışkı örneklerinde, süt örneklerine göre, daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Dışkı Nested PZR %49.3; basit PZR %45.3, Süt Nested PZR %32; basit PZR %27.3) (Moghadam ve ark., 2010). Bu sonuçlar sunulan çalışma verileri ile paralellik arz etmektedir (Dışkı Nested PZR %20; outer PZR %9.5, Süt Nested PZR %17.5; basit PZR %5.5). MAP'ın çevreye başlıca yayılımı dışkı yoluyla olur. Süt yoluyla etken yayılımının son derece önemli olduğu ve klinik enfekte hayvanların yaklaşık 1/3'ünün MAP'ı süt yoluyla attıkları rapor edilmiştir (Taylor ve ark., 1981). Sunulan çalışmada, pTB'nin prevalansının süt örneklerinde nispi olarak düşük olması, etkenin ana atılım yolu olan gaitaya göre süt ile yayılımın daha az olması ile ilişkili olabilir (Çetinkaya ve ark., 1999). Süt örneklerinde etken teşhisi ve zoonotik potansiyeli olan bu hastalığın insan tarafından tüketilen başlıca hayvansal ürün olan sütte belirlenmesi, pTB'nin halk sağlığı

açısından öneminin vurgulanması yönüyle de önem arz etmektedir (Çetinkaya ve ark., 1999).

Son on yıl içerisinde PZR bazlı MAP teşhis metotlarında önemli gelişmeler yaşanmıştır. Modifiye PZR metotları sensitivite yönüyle, hali hazırda bilimsel çalışmalarda altın standart olarak kabul edilen bakteriyel kültüre yaklaşmıştır. Nested PZR'nin dışkı ve süt örneklerinde MAP'ın teşhisinde kullanılabilecek basit, hızlı ve yüksek sensitiv alternatif bir metod olduğu rapor edilmiştir (Moghadam ve ark., 2010). Bununla birlikte sunulan çalışmada, dışkı ve süt bakteriyel kültür sonuçları subklinik pTB'nin prevalansını sırasıyla, %4 ve %2.5 olarak ortaya koydu. Elde edilen bu sonuçlar, Nested ve Outer PZR metotları ile ortaya konan prevalans oranlarına göre farklılık göstermektedir (Çizelge 2). Bu sonuç, PZR'nin kültür metodundan daha duyarlı olması (Çetinkaya ve ark., 1999; Gao ve ark., 2009) veya PZR'nin ölü mikroorganizmaların rezidüel DNA'larını da çoğaltma yeteneği ve çalışma örneklerindeki ölü mikroorganizma içeriği ve bu nedenle kültürde muhtemelen negatif sonuç elde edilmesi ile açıklanabilir (Çetinkaya ve ark., 1999). Yapılan bir çalışmada, PZR pozitif numunelerin %50'sinde kültürde üreme olduğu, 36 PZR negatif örnekte ise %16 oranında etken ürettiği rapor edilmiştir (Millar ve ark., 1996). Gao ve ark 2009, Nested PZR pozitif fakat kültür negatif olgularda, sığırlar tarafından yayılan MAP miktarının kültürle belirlenebilecek miktarın altında olabileceğini rapor etmiştir (Gao ve ark., 2009). Süt örneklerinde ve dışkıda MAP'ın teşhisinde Nested PZR metodu, kültürle karşılaştırıldığında, uygun ve alternatif bir metod olarak tanımlanmaktadır (Gao ve ark., 2009). Bakteriyel kültür protokolü sırasında diğer mikroorganizmaları inaktive etmek amacıyla uygulanan dekontaminat süreci ve yüksek inkübasyon ısı (37 °C) ve uzun inkübasyon süresi de daha fazla sayıda etkenin (MAP) ölmesine neden olur. Bu durum kültürde daha düşük prevalans değerleri elde edilmesinin ana sebeplerdendir (Gao ve ark., 2009). Aynı zamanda, sunulan çalışmada dışkı ve süt örneklerinde, Ziehl-Neelsen boyama ile elde edilen prevalans değerleri, PZR verileri (Dışkı; ZN %17, Nested PZR %20 ve süt; ZN %15.5, Nested PZR %17.5) ile uyumludur. Bu sonuç, çok düşük bir ihtimal de olsa, çapraz reaksiyonlar nedeniyle elde edilen muhtemel yanlış pozitifliğin de, PZR ve



kültür prevalans değerleri arasındaki farkın nedenlerinden biri olabileceğini göstermektedir.

Avrupa ülkelerinde sığırlarda pTB'nin prevalansı %3-20 arasında değişmektedir (Nielsen ve Toft, 2009). Türkiye'de de sığırlarda paratüberkülozun yaygınlığı araştırılmış ve Elazığ yöresi süt sığırlarında enfeksiyonun prevalansı PZR tekniği ile %5 ve bakteriyolojik kültür (altın standart) ile ise %3.4 olarak tespit edilmiştir (Çetinkaya ve ark., 1999). Orta Anadolu bölgesinde komplement fikzasyon tekniği ile yürütülen bir çalışmada prevalans %2.7 ve %4.3 olarak rapor edilmiştir (Vural ve Atala, 1988). Bununla birlikte, pTB genellikle subklinik seyreden bir hastalıktır. Komplement fikzasyon tekniği (Burnham ve ark., 1978) klinik hasta hayvanların tespitinde daha faydalıdır. Subklinik enfekte vakaları belirlemede ise yetersiz kalmaktadır (Çetinkaya ve ark., 1999). Dolayısıyla ilgili çalışmada, sunulan araştırma verilerine göre daha düşük prevalans değerlerinin elde edilmiş olması normaldir. İngiltere'de gerçekleştirilen çalışmalarda klinik pTB oranı %1 olarak tespit edilmiş, herhangi bir klinik bulgu göstermeyen ve kesimhanelerden elde edilen numunelerden elde edilen veriler ise pTB'nin yaygınlığını %3.5 olarak ortaya koymuştur (Çetinkaya ve ark., 1994; Çetinkaya ve ark., 1996).

Subklinik enfekte hayvanların birçoğu yaşamları boyunca pTB'ye ilişkili bir klinik belirti göstermez. Bir sürüdeki subklinik pTB enfekte hayvanların ancak %5-10'unda klinik tablo görülür (Wilson ve ark., 1993).

Burdur yöresi süt sığırlarında pTB'nin seroprevalansını belirlemek üzere yürütülen bir başka çalışmada ise %6.2 oranında yaygınlık rapor edilmiştir (Öztürk ve ark., 2010). ELISA pTB'nin tanısında en yaygın kullanılan ucuz, kolay uygulanabilir, yüksek spesifiteye sahip bir testtir. Bununla birlikte, MAP yaymayan hayvanlarda testin sensitivitesi %15 civarındadır. Klinik semptom gösteren hayvanlar için ELISA sensitivitesi %87 olarak rapor edilmiştir (Hietala, 1992; Basse ve

Collins, 1997; Coussens, 2004). Testin sensitivitesi ve spesifitesi iki yaşından genç sığırlarda dūřüktür (Öztürk ve ark., 2010). Bu nedenlerle ELISA subklinik enfekte hayvanların ortaya konmasında yetersiz kalabilir.

Sunulan alışmada, Uşak yöresi süt sığırlarında subklinik pTB prevalansı; dışkı örneklerinde en yüksek %20 (Nested PZR) ve en düşük %4 (kültür) ve süt örneklerinde en yüksek %17.5 (Nested PZR) ve en düşük %2.5 (kültür) olarak tespit edildi.

İklim, beslenme ve barınak koşulları pTB'nin görülme sıklığında etkili olan önemli faktörlerdir (Çetinkaya, 1996). Bu nedenle pTB prevalansı Türkiye'nin değişik bölgelerinde farklılık gösterebilir.

Sunulan alışma Holştayn ırkı süt sığırlarında yürütölmüş olup, bilinen bir ırk predispozisyonu rapor edilmemiştir (Web of Science).

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sunulan çalışma sonuçları, subklinik pTB'nin ülke süt sığırları populasyonundaki varlığının ve ülke ekonomisine zararlarının ortaya konmasına yönelik ulusal düzeyde bir çalışma gerekliliğine vurgu yapmaktadır. Çalışma ile, Nested PZR tekniğinin, altın standart olarak kabul edilen ancak önemli dezavantajları olan bakteriyal kültür metodundan daha duyarlı olduğu ortaya kondu. Nested PZR tekniği, subklinik pTB enfeksiyonunun teşhisinde kültüre alternatif olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, sütçü sığırlarda subklinik pTB'nin varlığının ortaya konmasında birkaç farklı metodun kombinasyonu ile daha değerli veriler elde edilecektir. Sunulan çalışmada elde edilen sütle yüksek MAP yayılım oranı, hastalığın zoonotik potansiyeli ve etkenin pastörizasyona dayanıklılığı (Chiodini ve Hermon-Taylor, 1993; Grant ve ark., 1996) göz önünde bulundurulduğunda, halk sağlığı açısından da subklinik pTB'ye vurgu yapmaktadır. Subklinik enfekte hayvanların tespiti hastalığı sağlıklı olanlara bulaştırma eğilimlerinden dolayı da ayrıca önemlidir. Sonuç olarak, Uşak bölgesi süt sığırlarında dışkı ve süt örneklerinde, PZR teknikleri ile elde edilen prevalans değerlerinin (%20 ve %17.5) Türkiye'nin diğer bölgeleri ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu belirlendi.

## ÖZET

Paratüberküloz (pTB), *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*'in (MAP) neden olduğu, ruminantların kronik, yangısal ve ölümcül bir hastalığıdır. Enfeksiyon uzun süren “subklinik” evre ile karakterizedir. Bu dönemdeki sığırlar sürüdeki diğer hayvanları enfekte edebilme kabiliyetindedir. pTB, özellikle süt sığırı işletmelerinde ekonomik kayıpların en önemli nedenlerinden biridir. MAP, insanlarda Crohn's hastalığının muhtemel etkeni olup, zoonotik potansiyeli nedeniyle ayrıca önem arz eder. Subklinik pTB'li hayvanlar hastalığı sağlıklı bireylere bulaştırma eğilimlerinden dolayı da önemlidir. Türkiye'de pTB'nin varlığı uzun yıllardır bilinmesine rağmen, hastalık ve hastalığın prevalansı üzerine yürütülmüş bilimsel çalışma sayısı oldukça azdır. Uşak yöresi süt sığırlarında hastalığın prevalansı üzerine gerçekleştirilmiş bilinen bir bilimsel rapor ise mevcut değildir. Sunulan çalışmada süt sığırı yetiştiriciliği yapılan Uşak yöresinde subklinik pTB'nin prevalansının ortaya konulması amaçlandı. MAP, dışkı ve süt örneklerinde, direk bakteriyoskopi tekniği ve Ziehl-Nelsen boyama ile pozitif bulunan numunelerde ise kültür ve PZR (Outer ve Nested) teknikleri ile belirlendi. Çalışmada hayvan materyali olarak, optimal süt verimine ve BCS'ye sahip, klinik olarak sağlıklı ve 3-7 yaşlı 200 Holştayn süt sığırı kullanıldı. Uşak yöresi süt sığırlarında subklinik pTB'nin prevalansı dışkı örneklerinde; Ziehl-Neelsen boyama ile %17, Outer PZR tekniği ile %9.5, Nested PZR tekniği ile %20, Bakteriyolojik Kültür sonuçlarına göre %4, süt örneklerinde ise; Ziehl-Neelsen boyama ile %15.5, Outer PZR tekniği ile %5.5, Nested PZR tekniği ile %17.5 ve Bakteriyolojik Kültür sonuçlarına göre %2.5 olarak tespit edildi. Sonuç olarak; Uşak bölgesi süt sığırlarında dışkı ve süt örneklerinde, PZR teknikleri ile elde edilen prevalans değerlerinin Türkiye'nin diğer bölgeleri ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu ortaya kondu.

## SUMMARY

Paratuberculosis (pTB) caused by *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* (MAP) a chronic, inflammatory and fatal disease of ruminants. The infection is characterized by chronic "subclinic" phase. Cattle in this phase is capable of infecting other animals in the herd. pTB particularly in dairy milk industry one of the causes associated with financial losses. MAP possible cause of Crohn's disease in human, is also important due to zoonotic potentials. Animals with subclinic pTB are a major concern because they tend to contaminate healthy individuals in Turkey. Although the presence of pTB is has been known, the scientific studies on the disease and the prevalence appears to be scarce. There is no scientific report on prevalence of the disease in dairy cattle in Usak region. In this study, it was aimed to determine the prevalence of subclinic pTB in dairy cattle farming in Usak region. In feces and milk samples using direct bacterioscopy technique and Ziehl-Neelsen staining and in positive samples by culturing and PCR (outer and nested). MAP was determined in the study a total of 200 holstein dairy cattle aged between 3-7 years clinically healthy with optimum milk yield and BCS were used. In Usak region in dairy cattle the prevalence of pTB was determined to be 17% by Ziehl-Neelsen 9.5% by other PCR and 20% Nested PCR in feces; 4% according to bacterologic culture results; 15.5% by Ziehl-Neelsen, 5.5% by other PCR and 17.5% by Nested PCR in milk samples and 2.5% according to Bacteriologic culture results. In conclusion; the prevalence values analyzed by PCR techniques in feces and milk samples in dairy cattle in Usak region was determined to be higher compared to those in other regions of Turkey.

**KAYNAKLAR**

- AIELLO, S.E. The Merck Veterinary Manuel 8th Edition. (1998). Paratuberculosis. 537-539.
- ALLAKER, R.P., KAPAS, S. (2003). Adrenomedullin Expression by Gastric Epithelial Cells in Response the İnfection. *Clin Diagn Lab İmmunol*, **10**:546-551.
- ALVAREZ, J., DE JUAN, L., ARANAZ, A.(2005). A survey on paratuberculosis in wildlife in Spain. In: *8thInternational Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark*: 130.
- AMBROSIO, S.R., MÁRCIA, D.E., DEUS, O.E., RODRIGUEZ, C.A.R., NETO, JSF1, AMAKU, M. (2008). Comparison of three decontamination methods for Mycobacterium bovis isolation. *Brasilian Journal of Microbiology*, **39**: 241-244.
- ANON, (2000). Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, *European Commision*, 76 pp.
- ARDA, M. (1997). Boyalar ve boyama metotları. Temel Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara, *Medisan Yayınevi*. 281-289.
- AUTSCHBACH, F., EİSOLD, S., HINZ, U., ZİNSER, S., LİNNEBACHER, M. (2005). High prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohns disease. *Gut*, **54**: 944-949.
- AYELE, W.Y., BARTOS, M., SVASTOVA, P. (2004). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in organs of natural infected bull-calves and breeding bulls. *Vet Microbiol* **103**: 209-17.
- AYELE, WY., SVASTOVA, P., ROUBAL, P., BARTOS M., PAVLIK, I. (2005). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cows milk in the Czech Republic. *Applied Environ. Microbiol*, **71**: 1210-1214.
- BANG, B., (1906). Chronische pseudotiberkulöse Darmentzündung beim Rind. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*; **22**: 759-63.
- BASSEY, E.O.E., COLLINS M.T. (1997).Study of T-lymphocyte subset of helaty and M. Paratuberculosis infected cattle. *İnfect. İmmun.*,**65**:4869- 4872.
- BAUMGARTNER, W., KHOL, J.L. (2006). Paratuberculosis (johne disease) in Ruminants ongoing story. *Slow vet res*, **43**:5-10.
- BOLTON, M.W., GROOMS, D.L., KANEENE J.B. (2005). Faecal shedding of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in calves: implication for disease control and management.In: *8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Den-mark*. 128.
- BOTTCHER, J., GANGL, A. (2005). Value of bulk- milk- serology for control of Johne's disease. In: *8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Den-mark*. 99.
- BULL, T.J.,MCMINN, E.J., SIDI-BOUMEDINE, K., SKULL, A., DURKIN, D. (2003). Detection and verification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without crohn's disease. *J. Clin. Microbiol*, **41**:2915-2923.

- BURNHAM, W.R., STANFORD, J.L. and LENNARD-JONES, J.E. (1978). Evidence for mycobacterial aetiology of Crohns disease. *Gut*, **18**: 965.
- CHIODINI, R.J., HERMON-TAYLOR, J. (1993). The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**:629-631.
- CIVELEK, T., CELIK, H.A., OZENC, E., AVCI, G., KAV, K., CINGI, C.C., YILMAZ, O. (2009). Effects of PCR-confirmed subclinical paratuberculosis on retinol and  $\beta$ -carotene levels in dairy cattle *Arch Med Vet*, **41**: 281-284.
- COLLINS, D.M., STEPHENS D.M., DE LISLE, GW. (1993). Comparison of polymerase chain reaction tests and fecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *Vet. Microbiol.*, **36**: 289-299.
- COLLINS, M.T., SOCKETT, D.C., GOODGER, W.J.(1994). Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am VetMed Assoc*, **204**:636-41.
- COLLINS, M.T., WELLS, S.J., PETRINI, K.R. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:685-92.
- COELLO, A.C., PÍNTO, M.L., SILVA S., COELLO, A.M., RODRIGUES, J., JUSTE , R.A. (2007) Seroprevalance of ovine paratuberculosisinfection in northeast of portugal. *Small Ruminant Res.* 71:298- 303.
- COUSENS, P.M. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle. *Infect. Immun.*, **72**:3089- 3096.
- CETINKAYA, B., ERGAN, K., MORGAN, K.L. (1994). A practice-based survey of the frequency of Johne's disease in southwest England. *Vet. Rec.*, **134**: 494-497.
- CETINKAYA, B. (1996). An epidemiological study of clinical and subclinical Johne's disease (Paratuberculosis) in cattle, (PhD thesis). *Dept. Vet. Clin. Sci., Univ. Bristol, England.*
- CETINKAYA, B., ERGAN, K., HARBOUR, D.A., MORGAN, K.L. (1999). An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johnes disease in adult cattle in south west England. *Epidemiol. Infect.*, **116**:373-379.
- CETINKAYA, B., MUZ, A., ERTAŞ, H.B., ÜNGÖR, H., SEZEN, İ.Y., GÜLCÜ, H.B. (2000). Süt İneklerinde Paratüberküloz Prevalansının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Saptanması. *Turk J Vet Anim Sci*, **24**: 371-379
- EDMONSON, A.J., LEAN, I.J., WEAVER, L.D., FARVER, T., WEBSTER, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci*, **72**: 68-78.
- ERGANIS, O. (1994). *Mycobacterium* cinsi. Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, 2.baskı. Konya, Sağlık Eğitim Enstitüsü Yayınları. 299-304
- FANG, Y., WU, W.H., PEPPER, J.L., LARSEN, JL., MARRAS, S.A. (2002). Comparison of realtime, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples. *J. Clin. Microbiol*, **40**: 287-291.

- FIRAT, G. (1978). Sığırlarda paratüberkülozun serolojik olarak teşhisi üzerinde araştırmalar. *Pendik Vet. Bak. Ser. Enst. Dergi* **x**: 18-23
- FLOROU, M., LEONTİDES, L., BILLINIS, C.(2005). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from non -ruminant wildlife in Greece. *In: 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark.* 134.
- GAO, A., ODUMERU, J., RAYMOND, M., HANDRICK, S., DUFFIED, T., MUTHARIA, L. (2009). Comparison of milk cultures, direct and nested polymerase chain reaction (PCR) with fecal culture based on samples from dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subs. *Paratuberculosis the Canadian Journal of Veterinary Research*, **73**: 58-64.
- GAO, A., MUTHARIA, L., CHEN, S., RAHN, K., ODUMERU, J. (2002). Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J. Dairy Sci*, **85**:3198-3205.
- GRANT, I.R., BALL, H.J., NEİLL, S.D., ROWE, M.T.(1996). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 631-636.
- HACKER, U., HÜTTNER, K., KONOE, M. (2004). Untersuchungen zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg- Vorpommern. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, **117**: 140-4.
- HASANOVA, L., PAVLIK, L. (2006). Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds. *A review, Vet. Med.-Czech.* **51**:193-211.
- HERMON-TAYLOR, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3446-3452.
- HERTHNEK, D. and BOLSKE, G. (2006). New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *BMC. Microbiol*, **6**: 87-87.
- HIETALA, S.K. (1992). The option in diagnosing ruminant paratuberculosis. *Vet.Med.*, **87**: 1122- 1132.
- HOLMSTRÖM, A., STENLUND, S. (2005). Control of paratuberculosis in live cattle and semen imported to Sweden 1995-2004. *In: 8th International Colloquium on paratuberculosis. Copenhagen, Denmark.* 18.
- IKIZ, S., BAĞCIGİL, A.F., AK, S., ÖZGÜR, N.Y., LOAZ, A. (2005). Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. *Medicina Vet*, **61**:881-883.
- JAKOBSEN, M.B., ALBAN, L., NIELSEN, S.S. (2000). A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. *Prev Vet Med*, **46**: 15-27.
- JOHNE, H.J., FROTHINGHAM, J. (1895) Ein eigentümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Dtsch Z Tiermed Pathol*, **21**: 438-54.
- JUDGE, J., KYRIAZAKIS, I., GREIS, A.(2005). Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl Environ Microbiol*, **71**: 6033-8.
- KALIS, C.H.J., HESSELINK, J.W., BARKEMA, H.W. (1999). Comparison of culture of individual and strategically pooled bovine faecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *In: Manning EJB, Collins MT, eds. Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Madison, Wisconsin.* 344-8.



- KHARE, S., FICHT, T.A., SANTOS, R.L., ROMANO, J., FICHT, A.R. (2004). 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.* **42**: 1075-1081.
- KHOL, J.L., DAMOSER, J., BAUMGARTNER, W. (2005). Hygienemaßnahmen zur Bekämpfung der Ausbreitung von Paratuberkulose in Rinderbetrieben. *Klauentierpraxis*, **13**: 137-8.
- KLEE, W., (2004). Paratuberkulose (Johnesche Krankheit). In: Dirksen HD, Stöber M, eds *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. 4 Aufl. Berlin: Blackwell.* 586-91.
- LISBY, G., ANDERSEN, J., ENGBAEK K., BINDER, V. (1994). *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scand. J. Gastroenterol.* **29**: 923-929.
- MACHACKOVA, M., SVASTOVA, P., LAMKA, J. (2004). Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic. *Vet Microbiol.* **101**: 225-34.
- MEADUS, W.J., GILL, C.O., DUFF, P., BADONI, M., SAUCIER, L. (2008). Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* DNA. *Int. J. Food Microbiol.* **124**: 291-294.
- MILLAR, D., FORD, J., SANDERSON, J., WITHEY, S., TIZARD, M., DORAN, T., WILSON, D.J., ROSSITER, C., HAN, H.R., SEARS, P.M. (1993). Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decrease milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, **54**: 1851-1857.
- MOGHADAM, M.T., SARV, S., MOOSAKHANI, F., BADIIE, A. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Milk and fecal Samples in Dairy Cattle by PCR and Nested-PCR. *Journal of Animal Veterinary Advances*, **9(24)**: 3055-3061.
- NAKASE, H., NISHIO, A., TAMAKI, H., (2006). Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, **12**: 62-9.
- NIELSEN, S.S., NIELSEN, K.K., HUDA, A. (2001). Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bull Int Dairy Fed*, **362**: 5-15.
- NIELSEN, S.S., TOFT, N. A (2009). Review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet Med.* **88**: 1-14.
- OZTURK, D., PEHLIVANOĞLU, F., TOK, A.A., GUNLU, S., GULDALI, Y., TURUTOĞLU H. (2010). Seroprevalance of paratuberculosis in the Burdur province ( Turkey ) in dairy cattle using the Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, **65**: 2.
- PALOMINO, J.C., PORTAELS, F. (1998). Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *J Clin Microbiol.* **36(2)**: 402-408.
- PETROFF S.A. (1915). A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J Exp Med.* **21**: 38-42.
- PHILPOTT, M. (1993). The danger of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br Vet J*, **149**: 339-69.
- PICKUP, R.W., RHODES, G., ARNOTT, S., (2004). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the catchment area and water of the river Taff in 11. South Wales, United

Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease in the city of Cardiff. *Appl Environ Microbiol*. **71**: 2130-9.

PINEDO, P.J., RAE, D.O., WILLIAMS, J.E., DONOVAN, G.A., MELENDEZ, P., BUERGELT, C.D. (2008). Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of Paratuberculosis in dairy cows. *Transbound. Emer. Dis*, **55**: 125-133.

RYAN, P., BENNETT, M.W., AARON, S., LEE G., COLLINS, J.K. (2002). PCR detection of Mycobacterium paratuberculosis in Crohns disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut*, **51**: 665-670.

SELBITZ, H.J. (2002). Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle M, Mayr A, eds. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 562-3.

SIVAKUMAR, P., TRIPATHI, B.N., SINGH, N. (2005). Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (Bubalis bubalis) by PCR and bacterial culture. *Vet Microbiol*, **108**: 263-70.

TASARA, T., STEPHAN, R. (2005). Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk. *Applied Environ. Microbiol*, **71**: 5957-5968.

TAYLOR, T.K., WILKS, C.R., MCQUEEN, D.S. (1981). Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the milk of a cow with Johnes disease. *Vet. Rec*, **109**: 532-533.

VAN LEEUWEN, J.A., KEEFE, G.P., TREMBLAY, R. (2001). Seroprevalence of infection with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus and bovine viral diarrhoea virus in Maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J*, **42**: 193-8.

VURAL, B., ATALA, N., (1988). Serological study on bovine paratuberculosis in central Anatolia using the microcomplement fixation and tube complement fixation tests. *Etlik Vet. Mikrobiol Derg*, **6**: 87-97.

WEBER, M.F., KOGUT, K., DE BREE, J. (2005). Evidence for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis shedding in young stock. In: *8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark*. 126.

WHITLOCK, R. (1996). Johnes's disease. In: Smith BP, ed. Large animal internal medicine. 2nd ed. St. Louis: Mosby. 899-904.

WHITLOCK, R.H., SWEENEY, R.W., FYOCK, T.L. (2005). MAP Super shedders: another factor in the control of Johnes's disease. In: *8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark*. 42.