

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
VETERİNERLİK FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SATIŞA SUNULAN SOKAK SÜTLERİNDE
***MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* VARLIĞININ**
KONVANSİYONEL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

HAZIRLAYAN
Meral ÖZTÜRK KALIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2018
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
VETERİNERLİK FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SATIŞA SUNULAN SOKAK SÜTLERİNDE
***MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* VARLIĞININ**
KONVANSİYONEL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Meral ÖZTÜRK KALIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından
TSY-10-1089 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

Ağustos 2018
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmamdaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm metarýal ve sonuçların tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı- Soyadı: Meral ÖZTÜRK KALIN

İmza:

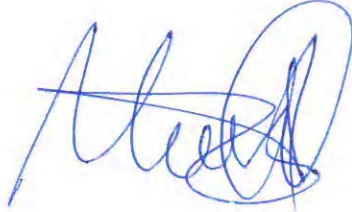


YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Satışa Sunulan Sokak Sütlerinde *Mycobacterium paratuberculosis* Varlığının Konvansiyonel ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması” adlı Yüksek Lisans tezi Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

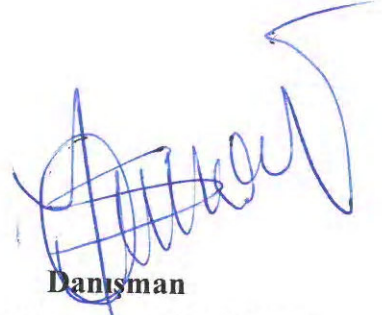
Tezi Hazırlayan

Meral ÖZTÜRK KALIN



Danışman

Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY



Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Fuat AYDIN

Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY danışmanlığında **Meral ÖZTÜRK KALIN** tarafından hazırlanan “**Kayseri İlinde Satışa Sunulan Sokak Sütlerinde *Mycobacterium paratuberculosis* Varlığının Konvansiyonel ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Veteriner Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

31./08/2018

JÜRİ :

Danışman: Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY (Erciyes Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Dalı)

(Kırıkkale Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim

Üye : Doç. Dr. Seçil ABAY
Dalı)

(Erciyes Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim

ONAY :

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulun tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../.....

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanan bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde, çalışmanın başından sonuna kadar titizlikle inceleyen, yardım ve desteğini esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY'a, katkılarıyla yol gösteren Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Fuat AYDIN'a, Sayın Doç. Dr. Seçil ABAY'a, ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Harun HIZLISOY'a ayrıca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana güç veren çok değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Meral ÖZTÜRK KALIN
Kayseri, Ağustos 2018

**SATIŞA SUNULAN SOKAK SÜTLERİNDE
MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS VARLIĞININ
KONVANSİYONEL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Meral ÖZTÜRK KALIN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2018

Danışman: Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY

ÖZET

Bu çalışmada Kayseri ilinde satışa sunulan sokak sütlerinde *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)'in varlığı konvansiyonel ve serolojik yöntemlerle araştırıldı.

Araştırmada Mayıs 2010-Ekim 2011 yılları arasında Kayseri'nin ilçelerinden farklı satıcılardan 200 çiğ inek süt örneği toplandı. Her bir süt numunesi direkt mikroskopi, kültür ve serolojik yöntem olmak üzere üç aşamada değerlendirmeye alındı.

Direkt mikroskopi yönteminde süt örneklerinden hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen boyama metodu ile boyandı. Etken izolasyonu amacıyla süt numunelerinin bakteriyolojik ekimleri gliserinli ve gliserinsiz Löwenstein-Jensen ve Watson-Reid agara yapıldı. Elde edilen *Mycobacterium paratuberculosis* şüpheli izolatların identifikasyonu için Ziehl-Neelsen boyama, katalaz, niasin, nitrat redüksiyon, pirazinamidaz ve üreaz testleri kullanıldı. Süt numunelerinin plazmalarındaki antikörlerin araştırılmasında *Mycobacterium paratuberculosis* Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kitinden yararlandı.

İncelenen 200 sokak çiğ inek sütünden uygulanan üç teşhis yöntemi sonucu sadece 1 numunede (% 0,5) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) tespit edildi.

Sonuç olarak, Kayseri ilinde satışa sunulan sokak sütlerinde paratüberkülozun yüksek bir oranda bulunmadığı görüldü. Ancak bir numunede etkenin varlığının ortaya konulması enfeksiyonun önemi göz önünde bulundurulduğunda halk sağlığı açısından önemli risk oluşturabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium paratuberculosis*, sokak sütü, izolasyon, identifikasyon, ELISA

THE INVESTIGATION OF *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* BY USING CONVENTIONAL AND SEROLOGICAL METHODS IN RAW MILKS

Meral ÖZTÜRK KALIN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Veterinary Microbiology

M.Sc. Thesis, August 2018

Supervisor: Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY

ABSTRACT

In this study, it was investigated that the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in raw milk sold in Kayseri province, by conventional and serological methods.

Between May 2010 and October 2011, 200 raw cow milk samples were taken from various sellers of the Kayseri provinces. Each milk sample was evaluated in three steps including direct microscopy, culture and serological method.

Preparations from milk samples were stained with Ziehl-Neelsen method in direct microscopy method. For the purpose of isolation, the inoculation of milk samples was carried out with and without glycerin in Löwenstein-Jensen and Watson-Reid agar. Ziehl Neelsen Staining, catalase, niacin, nitrate reduction, pyrazinamidase and urease tests were used for the identification of *Mycobacterium paratuberculosis* suspected isolates.

Mycobacterium paratuberculosis Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kit was used for the detection of antibodies in plasma of milk samples.

According to the results of the applied three diagnostic methods, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) was detected in only one sample (0.5 %) from 200 raw cow milk samples tested.

As a result, it has been understood that paratuberculosis was not found in a high rate in raw milk sold in Kayseri province. However, it has been concluded that the presence of an agent in one sample may pose a significant risk for public health when considering the importance of infection.

Key words: *Mycobacterium paratuberculosis*, raw milk, isolation, identification, ELISA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇ KAPAK.....	. i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
YÖNERGE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	xiii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe.....	6
2.2. <i>Mycobacterium Avium</i> Subsp. <i>Paratuberculosis</i> (Map).....	8
2.2.1. Taksonomi.....	8
2.2.2. Morfoloji.....	9
2.2.3. Biyokimyasal ve Biyofiziksel Özellikleri.....	11
2.2.4. Epidemiyoloji.....	12
2.2.5. Doğal Yaşam Yerleri.....	15
2.2.6. Ülkemizde ve Dünyadaki Sığırlarda Paratüberkülozun Durumu.....	16
2.2.7. Semptomlar.....	16
2.3. Mikobakteriyoloji Laboratuvarlarında Tüberküloz Tanısı.....	17
2.3.1. Örneklerin İşlenmesi Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Amaç.....	17
2.3.2. Mikroskopi	17
2.3.3. Kültürde Yöntemleri.....	17

2.3.4. Serolojik Yöntemler	19
2.3.5. Moleküler Yöntemler.....	23
2.3.6. Diğer Yöntemler	25
2.3.7. Korunma ve Kontrol Yöntemleri	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. GEREÇ.....	28
3.1.1. Süt Numuneleri.....	28
3.1.2. Dekontaminasyon Solüsyonları.....	29
3.1.2.1. Hexadecylpyridinium Chloride (HPC).....	29
3.1.2.1.Fosfat ile Tamponlanmış Solüsyon (Phosphate Buffer Solution, PBS).....	29
3.1.3. Ziehl Neelsen Boyama Seti.....	30
3.1.3.1. Kit Komponentleri.....	30
3.1.3.1.1. Karbol Fuksin Çözeltisi ZN.....	30
3.1.3.1.2. Asit- Alkol (Dekolorizasyon).....	30
3.1.3.1.3. Metilen Mavisi Çözeltisi.....	30
3.1.4. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar.....	30
3.1.4.1. Standart Suş.....	30
3.1.4.2. Tavuk Yumurtası.....	31
3.1.4.3. Lowenstein-Jensen (L-J) Medium.....	31
3.1.4.4. Watson-Reid Agar.....	32
3.1.4.5. Antibiyotik Solüsyonları.....	32
3.1.5. İdentifikasyonda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar.....	33
3.1.5.1. Dubos Broth Base.....	33
3.1.5.2. Albumin from Bovine Serum, Fraction V.....	33
3.1.5.3. Katalaz Testi Solüsyonu.....	34
3.1.5.3.1. Hydrogen Peroxide 30 %.....	34

3.1.5.3.2. Tween® 80.....	34
3.1.5.4. Niasin Testi Ayıracı.....	34
3.1.5.4.1. TB Niasin Test Strips	34
3.1.5.5. Nitrat Testi Solüsyonu.....	35
3.1.5.5.1. Natrium Nitrate.....	35
3.1.5.5.2. Hydrochloric acid.....	35
3.1.5.5.3. Sulphanilic acid.....	35
3.1.5.5.4. N-1-naphtyldiethylene-diamine dihydrochloride	36
3.1.5.6. Pirazinamidaz Testi Besiyeri ve Solüsyonu.....	36
3.1.5.6.1. Pirazinamidase Substrate Medium.....	36
3.1.5.6.2. Ammonium iron (II) sulphate hexahydrate.....	36
3.1.5.7. Üreaz Testi Besiyeri ve Solüsyonu.....	37
3.1.5.7.1. Ureaz Broth.....	37
3.1.6. Paratuberculosis ELISA kit	37
3.1.6.1. Microplate coated with purified <i>M. paratuberculosis</i> extract.....	37
3.1.6.2. Positive Control.....	38
3.1.6.3. Negative Control.....	38
3.1.6.4. Dilution buffer 6.....	38
3.1.6.5. Concentrated Conjugate (10x).....	38
3.1.6.6. Dilution buffer 3.....	38
3.1.6.7. Wash concentrate (20x).....	38
3.1.6.8. Substrate solution (TMB).....	38
3.1.6.9. Stop solution (H ₂ SO ₄ 0,5 M).....	38
3.2.YÖNTEM.....	39
3.2.1. Süt Numunelerinin Toplanması.....	39
3.2.2. Dekontaminasyon.....	39

3.2.3. Direk Mikroskopi.....	40
3.2.3.1. Süt Numunelerinden Direkt Preparat Hazırlanması.....	40
3.2.3.2. İzole Edilen Bakterilerden Preparat Hazırlanması.....	40
3.2.4. Ziehl Neelsen Boyama Yöntemi.....	40
3.2.5. Preparatın Mikroskopik Muayenesi.....	41
3.2.6. Kültür Yöntemi.....	41
3.2.6.1. Tavuk Yumurtasının Hazırlanması.....	41
3.2.6.2. Katı Besiyeri Kültür Yöntemi.....	42
3.2.6.3. Sıvı Besiyeri Kültür Yöntemi.....	42
3.2.7. İdentifikasyon Testleri.....	42
3.2.7.1. Katalaz Testi.....	42
3.2.7.2. Niasin Testi.....	43
3.2.7.3. Nitrat Redüksiyon Testi.....	43
3.2.7.4. Pirazinamidaz Testi.....	44
3.2.7.5. Üreaz Testi.....	44
3.2.8. Serolojik Analiz.....	44
3.2.8.1. Süt Numunelerinin Analize Hazırlanması.....	44
3.2.8.2. Direkt Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	44
3.2.8.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması.....	45
3.2.8.2.1.1. Yıkama Solüsyonu.....	45
3.2.8.2.1.2. Konjugat.....	45
3.2.8.2.2. Plazma Örneklerinin Hazırlanması.....	45
3.2.8.2.3. Test Prosedürü.....	45
3.2.8.2.4. Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Analiz Örneklerinin Alındığı Yerler ve İzole Edilen Suş Sayıları.....	47

4.2. Direkt Mikroskopik Muayene Sonuçları.....	48
4.3. Kültür Analiz Sonuçları.....	48
4.3.1. İzolasyon Sonuçları.....	48
4.3.1.1. Lowenstein-Jensen (L-J) Medium Base Sonuçları.....	48
4.3.1.2. Watson-Reid Agar Sonuçları.....	49
4.2.2. İdentifikasyon Test Sonuçları.....	49
4.3.2.1. Mikroskopi Sonuçları.....	50
4.3.2.2. Katalaz Testi.....	50
4.3.2.3. Niasin Testi.....	51
4.3.2.4. Nitrat Testi.....	51
4.3.2.5. Pirazinamidaz Testi.....	52
4.3.2.6. Üreaz Testi.....	52
4.4. Seroloji Analiz Sonuçları.....	53
4.4.1. Direkt Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) sonuçları.....	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
6. KAYNAKLAR.....	71
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

AGID	: Agar Gel Immundiffusion
ARB	: Acido Resitant Bacilli
ATCC	: American Type Culture Collection
BRD	: Beslenme Referans Değeri
CDC	: Centers for Disease Control
CFT	: Komplement Fikzasyon Test
CFU	: Colony Forming Unit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EZN	: Ehrlich-Ziehl-Neelsen
FAT	: Floresans Antikor Test
HPC	: Hexadecylpyridinium Chloride
IFN-γ	: İnterferon-Gamma
IGF-1	: Insulin Growth Factor-1
IMS	: Immunomagnetic Separation
IS	: Insertion Sequence
L-J	: Löwenstein Jensen
MAI	: <i>Mycobacterium avium- intracellulare</i>
MAC	: <i>Mycobacterium avium</i> Kompleks
MAP	: <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MTK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	: Real-Time PCR
rBGH	: Recombinant Bovine Growth Hormone
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
ZN	: Ziehl-Neelsen

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1. Süt ve süt alternatifleri kompozisyonu analizi, 100 gram için Küçük M, Akgül C.TÜBİTAK-BİDEB Kimya Bilim Danışmanlığı Çalıştayı 2007.....	6
Tablo 2. Kayseri ili merkez ilçelerinden alınan süt numune sayısı.....	28
Tablo 3. Süt örneklerinin ELISA S/P % değerlerine göre negatiflik ve pozitiflik kriterleri....	46
Tablo 4. <i>M.paratuberculosis</i> yönünden pozitiflik saptanan süt örneklerinin ilçelere göre dağılımı.....	47
Tablo 5. Besiyerlerine yapılan ekimler sonucu izole edilen suş sayıları.....	49
Tablo 6. İzole edilen suşa ait fenotipik özelliklerin saptanması.....	50
Tablo 7. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ile incelenen plazma örneklerine ait genel sonuçlar.....	53
Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar.....	54
Şekil 1 . L-J Mediumda izole edilen suşa ait görüntü.....	48
Şekil 2, Watson-Reid Agarda izole edilen suşa ait görüntü.....	49
Şekil 3. İzole edilen suşun katalaz testine ait görüntüsü.....	50
Şekil 4. İzole edilen suşun niasin testine ait görüntüsü.....	51
Şekil.5. İzole edilen suşun nitrat testine ait görüntüsü.....	51
Şekil 6. İzole edilen suşun pirazinamidaz testine ait görüntüsü.....	52
Şekil 7. İzole edilen suşun üreaz testine ait görüntüsü.....	52
Şekil 8. Süt plazmalarının ELISA ile incelenmesi sonucu elde edilen mikropleyt görüntüsü.....	62

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Süt için bilim adamları tarafından çeşitli tanımlar yapılmış olsa da memeli hayvanların doğum sonrasında memelerinde oluşan biyolojik sıvı olarak tanımlanır. Biz insanlar için tüketilen sütün belli niteliklere sahip olması gerekir. Sağlıklı süt, hayvanların sağılması ile elde edilen kolostrum dışında % 8,25 civarında yağsız süt kuru maddesi ayrıca % 3,25 süt yağı içeren taze meme salgısı olarak da tanımlanır (1).

Doğum sonrasında yavruların gelişimi ve immünolojik olarak korunmaları zaruri besinler dışında sütle sağlanmaktadır. Bu nedenle sütün çok önemli bir besin kaynağı olduğu söylenebilir. İnsanlar için özellikle kalsiyum, riboflavin, fosfor ve çeşitli vitaminlerle önemli bir protein kaynağıdır. Bu nedenle süt diğer besinlere göre komple olandır. Sütün bu özelliği özellikle vücudun yapısı için gerekli enerjiyi ve işleyişini sağlayan belli başlı besin unsurlarını diğer besinlere göre daha çok içermesinden kaynaklanmaktadır (1).

Yavrular diğer besinlerden faydalanıncaya kadar gelişimlerini süt ile karşılarlar. İnsanların bu gelişim sürecini uzatmak için, süt veren sağlıklı hayvanları evcilleştirmesi ile başlamıştır. Hayvanların evcilleşmesi ile medeniyetin doğuşu da aynı dönemlere denk gelmektedir (2).

Herbivor (otçul) dediğimiz süt hayvanları eşek ve kısrakın dışında ruminantlardır. İnsanların bu herbivorların sütlerini tercih etmelerinin nedeni başlıca besin kaynaklarının bitkisel olması ve saldırgan olmamalarıdır. Ülkemizde en çok inek, koyun, keçi ve manda sütleri tercih oluşturmakta ve bu herbivorlardan uzun süre süt elde edilmektedir (1)

Sütün kalitesi, büyük ölçüde, hayvanın temizliği yanı sıra ahır ve görevlilerin hijyeni ile yakından ilgilidir. Zira çiğ sütün dayanıklılığı, büyük ölçüde içerdiği bakteri sayısına,

bakterilerin çoğalma hızlarına ve bakterilerin büyüme ve çoğalmaları için geçen süreye bağlı olarak farklılık gösterir. Sütün sağıldığı andaki sıcaklık yaklaşık 35-37 °C'dir. Bu sıcaklık dereceleri birçok bakterinin gelişmesi için elverişlidir. Ayrıca sütü üretim yerlerinden işletmeye gelinceye kadar da bir süre geçmektedir. Bu bakımdan bakteriyolojik yönden iyi kalitede sütün elde edilmesi süt üretim yerlerinde başlıca; sütün bakterilerle kontaminasyonunun önlenmesi ve sütte normal olarak bulunan ve/veya sonradan bulaşan bakterilerin gelişmelerinin sınırlandırılması için gerekli önlemlerin alınmasına bağlıdır (2,3).

Türkiye'de yıl boyunca elde edilen sütün yüzde % 40'ı pazarlanmakta, pazarlanan kısmın ise % 60'ı işlem görerek tüketici ile buluşmaktadır. İşlem gören sütün % 20'si direk tüketilmekte geriye kalan kısmı da peynir, tereyağ gibi dayanıklı ürün olarak değerlendirilmektedir.

Çiğ süt, kimyasal içeriği ve fiziko-kimyasal nitelikleri bakımından, birçok mikroorganizmanın gelişmesi için ideal bir ortam oluşturduğundan mevcut besinler içinde bozulmaya en müsait besindir; diğer bir ifadeyle saprofit mikroorganizmalar elverişli koşullarda metabolik faaliyetleriyle kalitenin düşmesine, bir kısım patojen bakteri de canlılıklarını koruyarak veya çoğalarak tüketicinin hastalanmasına neden olabilir. Bu bakımdan standart ve kaliteli süt ürününün elde edilmesi çiğ sütün kalitesine bağlıdır. Çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesi, işlendiği ürünün kalitesini etkilemesi yanı sıra, sağlıklı ve güvenilir olmasıyla da yakından ilgilidir. Çiğ süt, muhtemelen içerdiği patojenlerden dolayı, doğrudan tüketime elverişsizdir. Üretimi sırasında etkin ısı işlem uygulanmamış besinlerin (örneğin peynir) yapımında da kullanılması mahsurludur. Halen çiğ süttten yapılan ürünlerde brusellozis, tüberkülozis etkenleri yanı sıra *Salmonella*, patojenik *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, bazı *Streptococcus* türleri (Lancefield grup A, B ve C), *Coxiella burnetii*, bazı patojenik virüs ve mikotik ajanların bulunması olasıdır .(3)

Kaynatılmadan çiğ olarak tüketime sunulan sütlerde, tüketiciye ulaşana dek geçen sürede bakteriler çoğalmakta bunun sonucunda ısıtma ile de, yok edilmeyen, toksin oluşumuna sebep olmaktadır. Taze süt kavramı yanlış bir algıya sahiptir. Yeni sağılmış, sokakta tüketiciye doğrudan ulaşan süt, taze olarak algılanmaktadır. Hile amaçlı olarak örneğin su, nişasta vb gibi maddeler sütün içine katılıp besin değeri azaltılmakta ve bakteri yükleri açısından da büyük bir risk oluşturmaktadır.(4)

Ülkemizde büyükbaş hayvan yetiştiriciliği eskiden beri hem ülkemizde hem de Kayseri bölgesinde önde gelen ekonomik faaliyetlerden birisi olmuştur. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre Kayseri ilinde 2014 yılı itibarıyla 286853, 2015 yılı itibarıyla 287761, 2016 yılı itibarıyla 285593 ve 2017 yılı itibarıyla 293068 baş sığır bulunmaktadır. Süt üretimi açısından bakıldığında Kayseri ilinde 2014 yılı itibarıyla 344983, 2015 itibarıyla 339292 ve 2016 yılı itibarıyla 351384 ton üretim yapılmıştır.

Son yıllarda süt ve damızlık sığıru 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. İnfeksiyona bağılı olarak şekillenen damızlık sürülerde gebelik süresinde düzensizliklerin baş göstermesi işletme karlılığının düşmesine sebep olmaktadır.(4,5)

Bu çalışmada, Kayseri ilinde satışı sunulan sokak sütlerinde *Mycobacterium paratuberculosis*'in varlığının ortaya konulması amaçlanmıştır. *Mycobacterium paratuberculosis*'in özellikle son yıllarda insanlardaki Chrono hastalığının da etkeni olabileceğı düşünölmektedirBu bilgilerin ışığı altında Kayseri ilinde satışı sunulan sokak sütlerinde paratüberkülozun görölme sıklığı ve halk sağlığı açısından risk oluşturma potansiyeli tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Süt, meme bezlerinde oluşan bir sekresyondur. Süt denildiğinde genellikle inek sütü anlaşılır. İnek sütü isminden anlaşılacağı gibi, süt hangi hayvandan üretiliyorsa o hayvanın ismi başa getirilerek anılmaktadır. Örneğin koyundan elde ediliyorsa koyun sütü, keçiden elde ediliyorsa keçi sütü denilmektedir. Memelerde süt sekresyonu genellikle doğum sonrasında gerçekleşmektedir. Bebeklerin gelişimi ve büyümesi için gerekli olan süt, önemli gıdalar arasında yer alırken, büyükler içinde önemli gıdalar arasında yer almaktadır. Sütün mevsim şartlarına, sağım şekline, zamanına, sağım zamanı laktasyonuna ve hayvanın beslenme şekline göre (yağ, protein, laktoz, mineral, su gibi değerleri etkilediğinden) karmaşık oluşumlu bir yapıdan meydana geldiği söylenebilmektedir (6).

Uzmanlara göre sütün faydaları çoktur ve önemli bir besin kaynağıdır. Büyüme ve gelişmenin yanında, vücutta kemik gelişimi, sağlamlığına neden olup, kemik erimesine engel olmaktadır. Bunun yanı sıra mikroorganizmalardan kaynaklanan infeksiyonlara karşı vücuda direnç kazandırmakta kasların güçlenmesine ve uykuların düzenli olmasına etki etmektedir. Beynin yaşlanmasını geciktiren asetil karnitin maddesi de sütte bulunmaktadır. Hücre ve doku oluşumunu hızlandırıcı etkisi tespit edilmiştir. Cildin yaşlanmasını ve yıpranmasını engellemektedir. Yaralanma durumlarında, kanı çabuk pıhtılaştırarak hızlı iyileşmeye neden olmaktadır. Sütün diğer faydaları arasında sindirim sistemini düzenlemekte ve sindirim sistemi ile problemi olan kişiler de mide rahatsızlıklarına iyi gelmektedir. Ülserin önlenmesinde de sütün faydası büyüktür. Diş çürümelerini engellemekte ve dişleri güçlendirerek ağız sağlığına yardımcı olmaktadır. Tırnak ve saç sağlığına önemli faydaları bulunmaktadır.

Süt birçok hastalığa iyi gelmektedir. İçinde bulunan A vitamini katarakt oluşum riskini azaltırken B vitamini sinir hücrelerini korumaktadır. C vitamini kanser riskini azaltırken, D vitamini kemikleri güçlendirmekte, E vitamini hücreleri korumaktadır ve K vitamini kanın pıhtılaşmasını sağlamaktadır. Yüksek tansiyon hastalarının tansiyonunu azaltmada yağsız süt tavsiye edilmektedir. Süt, bronşit ve öksürüğe de iyi gelmektedir.(1)

Süt, içeriğinde mevcut olan kalsiyum minerali sayesinde hızlı yağ yakımına neden olmaktadır. Diyet yapanlara süt içmesi tavsiye edilmektedir. Süt içen kişinin midesinde yeterince yer kaplayacağından tokluk hissi vermektedir. Menopoz dönemindeki kadınların gerekli kalsiyum ihtiyacı da süt ürünlerinden karşılanabilmektedir. Süt düzenli içildiğinde, özellikle küçük yaşlarda günlük tüketilen bir bardak süt, çoğunlukla boy uzaması, dikkat artımı ve soyut düşünme gibi özellikleri güçlendirmektedir.(1)

Sütün faydalarının yanında zararları da mevcuttur. Süt tüketimi artışı karşılamak için genetiği değiştirilmiş (rBGH) büyüme hormonu ineklere verilmektedir. Bu insülün büyüme faktörü IGF-1 seviyeleri oranı yüksektir. Meme kanseri ve birçok kanser bu oran ile ilişkilendirilmektedir. Hayvan sütü, insan sütüne göre üç kat kadar fazla protein ihtiva etmektedir. İnek sütü vücuttaki pH dengesini asidik yönde bozarak böbrek ve idrar yolu hastalıklarına neden olmaktadır. Aşırı süt tüketimi kalsiyum fazlalığına sebep olarak kemiklerin sertleşmesine bunun sonucu olarakta kemik kırılmalarına neden olmaktadır (1).

Sütün farklı şartlara göre analiz oranları değişmektedir. Süt ve alternatif kompozisyonu (yüz gram için)Tablo 1’de gösterilmektedir.(7)

Tablo 1. Süt ve süt alternatifleri kompozisyonu analizi, 100 gram için

Bileşenler/ Brim	İnet Sütü	Keçi Sütü
Su/g	87,8	88,9
Protein/g	3,2	3,1
Yağ/g	3,2	4,1
Karbonhidrat/g	5,1	4,9
Enerji/ kcal	66	69
Enerji/ kJ	275	288
Şeker (laktoz)/g	4,8	4,4
Doymuş/g	2,4	2,7
Tek-doymamış/g	1,1	1,1
Çoklu-doymamış/g	0,1	0,1
Kolesterol/mg	14	11
Kalsiyum /BRD (%)	11,3	13,4

2.1. Tarihçe

Sığırlarda 1820'li yılların ortalarında, giderek artan sıklıkta zayıflama ile karakterize bağırsak hastalıklarının olduğu tespit edilmiştir. Hastalıkla ilgili yeterli tanımlanma yapılamamış ve nedeni ortaya konulamamıştır. Bu tarihten itibaren 70 yıl boyunca hastalığın etiyojisi tespit edilememiş olan birçok hastalıktan biri olarak kabul edildi. Ancak bu 70 yılda, tüberkül ve “kuş tüberkülü” basil tespit edilmiş ve tüberküloz, insanlarda ve sığırlarda tanıdık bir hastalık haline gelmiştir. Almanya'nın Odenberg bölgesinde 1894 yılında intestinal tüberküloz şüphesiyle ölen bir ineğin post-mortem muayenesi Dresden'deki Veteriner Patoloji Enstitüsü'nden Dr. H. A. Johne tarafından yapılmıştır. Dr. Johne ve Boston'dan Dr. L. Frothingham, hastalığın lezyonlarını tanımlamışlar ve bağırsak sisteminde bol miktarda asite dirençli basillerin bulunduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar olguyu bağırsak tüberkülozu olarak düşünmelerine rağmen, etkeni izole edememişlerdir. Ayrıca enfekte doku örneğinden hazırladıkları inokulumu,

kobaylara vermelerine rağmen kobaylarda hastalığın şekillenmediğini görmüşler ve bu nedenlerden dolayı enfeksiyonun tüberküloz olmadığı kanısına varmışlardır. Johne ve Frothingham, hastalığın, kuş tüberküloz basili tarafından meydana gelebileceğinden şüphelenmişler ve hastalığa psödötüberküloz enterit adını önermişlerdir. Araştırmacılar tarafından ruminantların bu kronik enteritisi, Johne's hastalığı (enteritis paratuberculosis specifica veya enteritis chronica hypertrophica bovis) olarak adlandırılmıştır (8,9). Johne ve Frothingham'ın açıklamasının ardından, dünyanın her yerinden gelen raporlar, hastalığın ne kadar yaygın olduğunu belgelemeye başladı. Dokuların incelenmesi sonucu tüberkül tüberkülozunun olmadığı Bang tarafından da teyit edildi. Bang, hastalığın paratüberküloz olarak adlandırılmasını önermiştir. Johne hastalığı hakkında 1910'lu yıllarda birçok bulguya rastlanmaktadır. Danimarka'da O. Bang, Johne hastalığı olan hayvanlardan alınan, tüberkül basilinden (*Mycobacterium bovis*) hazırlanan antijenlerin, intradermal enjeksiyonunda zayıf ya da hiç yanıt oluşmadığını, ancak avian tüberkülinine (*Mycobacterium avium*'dan hazırlanan antijenler) iyi yanıt oluştuğunu gözlemlemiştir. Bu gözlem temelinde Bang, kuş tüberkülinin, hayvanların teşhis testleri için kullanabileceğini belirtmiştir. Bu düşünce de bir yıl sonra İngiltere'de G.P. Male tarafından doğrulanmıştır. Bu araştırmalar sonucunda Johne hastalığına neden olan bakterinin, kanatlılarda tüberküloza neden olan bakteri ile ilişkili olduğu düşüncesi ağır basmıştır. Hastalığın Johne ve Frothingham tarafından ilk tanımlamasından sadece 20 yıl sonra, hastalık tüm Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kabul edilmiştir. Royal Veterinary College Principal'ın 1906 yılındaki raporunda J. McFadyean "Johne Hastalığı" terimini ilk olarak kullanmıştır. O zamandan günümüze yayınlanan kaynakların çoğunda, hastalığa değinirken ya Johne hastalığı ya da paratüberküloz terimleri kullanılmıştır. L Pearson 1908 yılında, Pensilvanya'da Johne hastalığının ilk raporunu yayınlamıştır.(8)

İngiliz bilim adamı F. W. Twort 1910 yılında, etkeni izole etmeyi başarmıştır. Ancak etken planlı bir laboratuvar çalışması sonucu izole edilmemiş tamamen şans eseri olarak bir laboratuvar kazası sonucun da izolasyon gerçekleştirilmiştir. Twort, etkenin *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis* johne adlandırılmasını önermiştir. H. Holth, 1912'de, Johne hastalığının etkeninin başarılı bir şekilde izole edildiğini bildirmiştir. Holth, Bang ve diğer araştırmacıların hastalık açıklamalarını kabul etmiş ve basitçe, izole ettiği organizmayı paratüberküloz basili olarak adlandırmıştır. Ancak bu başarı onun tanınırlığını çok fazla arttırmamıştır (8).

Enfeksiyöz etken laboratuvarında izole edildikten sonra tanısal testler için etkenden antijenler elde edilmiştir. Bu antijenler intradermal tüberkülin deri testi ile birlikte komplement ve aglütinasyon testlerinde serum örneklerinden antikorları saptamak için kullanılmıştır. Hastalığa ilk kez Johne hastalığı olarak atıfta bulunan kişi, tüberküloz deri testi için eşdeğer hazırlanan tüberkülin adı verilmesinden dolayı, deri testi antijeni için “johnin” terimini üretmiştir. Afrika ve Asya kıtalarındaki hayvanlarda 1920’lerde paratüberküloz gözlemlenmiştir. Vallee ve Ringard, *M. paratuberculosis*’in subkütanöz enjeksiyonunun hastalığa neden olmadığını kabul ederek, aşılamaı Johne hastalığının yayılımını kontrol etmek için bir araç olarak değerlendirmiş ve aşı üretimi üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır.

Bergey’s Manuel of Determinative Bacteriology kılavuzunun ilk baskısı 1923’de yayınlanmıştır ve Johne hastalığının etkeni *Mycobacterium paratuberculosis* olarak resmen adlandırılmıştır (8).

Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) tarafından 1939 yılında, mikobaktine gereksinim duyan *M. paratuberculosis* suşu laboratuvar suşu olarak saklanılmaya başlandı ve bu suş ATCC 12227 olarak adlandırıldı. “Suş 18” olarak da bilinen bu suş, paratüberküloz araştırmalarında yaygın olarak kullanılmıştır (8).

2.2. *Mycobacterium Avium* Subsp. *Paratuberculosis* (MAP)

2.2.1. Taksonomi

Paratüberkülozis (Johne’s Disease) *Mycobacterium avium* supsp. *paratuberculosis* (MAP) tarafından sığır, koyun ve keçi başta olmak üzere deve, manda, antilop ve geyikler gibi birçok evcil ve vahşi hayvanda meydana gelen enfeksiyöz ve bulaşıcı bir hastalıktır (10,11). Paratüberküloz veya Johne’s hastalığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde sığırlarda önemli ekonomik kayıplara yol açan infeksiyon 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. İnfekte 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 (12,13,14,15). Banche ve ark. (16) Crohn's hastalığı saptanan farklı yaş ve cinsiyetteki 19 insanın ileum ve kolonlarından 120 farklı bölgesel biyopsi numunelerini ve klinikal ve patolojik olarak teşhis konulamayan 11 hastanın 44 farklı organ biyopsisi, kan ve dışkı numunelerini MAP yönünden incelemiştir. Araştırmacılar boyama yöntemleri (Phenolic acridine orange ve Kinyoun) ile etkenleri tespit edemezken, kültür (ATCC medium ve MGIT medium) ve PCR (Polymerase Chain Reaction) (IS900 real-time ve F57) analizleri sonucu MAP varlığını ortaya koymuşlardır.

Enfeksiyona yol açan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* asido rezistans bir bakteri olup daha önceki yıllarda *Mycobacterium paratuberculosis* ve *M. johnei* olarak da isimlendirilmiştir. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* izolatlarının yapılan moleküler incelemeleri sonucu üç gruba ayrıldıkları tespit edilmiştir. Bu gruplar sığır veya Tip II, koyun veya Tip I ve orta veya Tip III olmak üzere sınıflandırılmıştır. Genel olarak bazı izolatların aşırı yavaş üremeleri gözönünde bulundurulduğunda PCR tabanlı test sonuçlarına göre sığır veya Tip II ile koyun veya Tip I / III'ten oluşan iki ana temel grubun bulunduğu bildirilmiştir (17)

2.2.2. Morfoloji

Etiyolojik ajan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 0,5 x 1-2 µm boyutlarında kısa kalın yapıda çomak ve Gram pozitif bir bakteridir. R tipi koloni yani kenarlı, düzensiz, yüzeyi pürüzlü, kuru koloniye sahiptir. İntrasellüler özelliğe sahiptir. Ziehl-Neelsen boyanma 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. Mikrobakterilerin hücre duvar kısımlarında bol miktarda lipid mevcuttur. Aside karşı dayanıklıdır ve yavaş üremektedirler. Hücre duvarında bulunan lipid ve mikolik asid, asid dayanıklılığının bir ölçüsüdür. Aside karşı dayanıklı olmaları sebebiyle zor boyanırlar, boyandıktan sonrada renksizleştirme işlemine karşı da direnç göstermektedirler.

Mikobakteri türlerinin çoğu ilk izolasyonda 37 °C'de hızlı üremektedirler. Bazı türler ise 42 °C de iyi ürerler. Üreme süreleri bakterinin cinsine göre değişiklik gösterir. *Mycobacterium tuberculosis* için ikiye bölünme zamanı 18 saattir. Koloni görüntüsüne göre mikrobakteriler S – tipi olanlar nemli, düzgün yüzeyle ve düzgün kenarlıdır. R – tipi olanlar sınırları düzgün olmayanlardır. S-R tipi olanlar hem düzgün hemde düzgün olmayan sınırlara sahip olanlardır. Filamentöz, Koloniler etrafına yayılmış ince dallanmalar şeklindedir (*M. xenopi*) Bazı türleri pigment oluşturmaktadır. Nonkromojen, pigment oluşturmamaktadır. Kromojen ise pigment oluşturmaktadır. Fotokromojense yalnızca ışıklı ortamda pigment oluşturmaktadır. Skotokromojen, hem ışıklı hem de karanlık ortamda pigment oluşturmaktadır. Mikobakterilerin hücre duvarları, diğer bakterilerin hücre duvarına kısımlarına göre oldukça kalın lipofilik bir özellik göstermektedir. Mikobakteri hücre duvarı, üç katmandan oluşmaktadır. Birinci katmanda Peptidoglikan (müreın) denilen plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabaka kısa peptid zincirleri ayrıca çapraz bağlarla sağlam yapılı uzun polisakkarit zincirlerinden oluşmaktadır, bu da hücrenin sert yapısını sağlamaktadır. İkinci tabakada ise arabinogalaktan bulunmaktadır bu da peptidoglikan tabakasının üzerinde bulunan hücre duvarı kitlesinin yaklaşık % 35'ini oluşturmaktadır ve peptidoglikan katmanına fosfodiester köprüleriyle bağlanmaktadır. Arabinogalaktanların yan zincirindeki uç arabinaz birimlerine mikolik asit diye adlandırılan, uzun zincirli bir grup yağ asiti kovalent olarak bağlanmaktadır. Mikolik asit, bakterinin hücre duvarı kalınlığı ve bakterinin aside dirençli olmasından sorumludur. Trehaloz adı verilen bir şekerle bağlanarak ip faktörü (cord factor) oluşturabilmektedirler. Üçüncü katman ise mikozidler, (en dış tabaka) heterojen peptidoglikolipidlerden genel olarak fenolik glikolipidden oluşmaktadır. Hücre duvarında bulunan ve duvar ağırlığının % 60'ını oluşturan lipidler bu katmanda bulunmaktadır. Bu mevcut lipidler tüberkülostearik asit, mikoserik asit, mikolik asitleri içermektedirler. Mikobakteriler lipofilik özellikleri nedeniyle, asit ve alkole dayanıklıdır.

2.2.3. Biyokimyasal ve Biyofiziksel Özellikleri

Mikobakterilerle ilgili tür tayini için Mycobacteriaceae ailesinde bugüne kadar 80'den fazla tür tanımlanmıştır. Bu türlerin biyofiziksel özellikleri üreme zamanı, üreme ısı, koloni yapısı ve pigment karakterlerine göre belirlenirken biyokimyasal özellikleri niasin üretimine, nitrat redüktaz aktivitesine, katalaz aktivitesine, peroksidaz aktivitesine ve Tch2 duyarlılıkları ile belirlenir. Mikobakterilerin hücre duvarlarındaki yağ tabakası asit ve alkol ile yapılacak olan renk giderme işlemine direnç göstermektedir. Anilin boyası (karbol fuksin) bu katman ile bağ oluşturarak asit ve alkol etkisine karşın yerinde kalmaktadır. Bakterinin ARB (Asido Resistant Bacilli, Aside karşı dirençli basil) son zamanlarda en sık kullanılan EZN (Ehrlich-Ziehl Neelsen) tekniği ile klinik örneklerde varlığı saptanmaktadır..

Mikobakterilerde tür tayini için kültürde üreyen bakteriden pasaj yapılır. **A.** Üreme zamanına göre, bakteri steril şartlarda süspansiyon edilir. Üremenin görüldüğü gün not edilir. Öze ile sürterek veya sodyum hidroksit ile pasaj yapılmaması gerekir. Sürtme pasajlarda, vaktinden erken üreme olurken sodyum hidroksitli pasajlarda vaktinden geç üreme olmaktadır. **B.** Üreme ısı pasaj yapılan bakteri süspansiyonundan üç ayrı tüpe ekim yapılarak her bir tüp 24°C, 37°C ve 45°C'de inkübe edilir. **C.** Koloni yapısı için kolonilerin düzenli-düzensiz, ıslak-kuru, renkli-renksiz oluşları not edilmelidir. **D.** Pigment oluşturma sırasında karanlıkta ve ışıktaki pigment oluşturma özelliğine bakılır. karanlıkta pigment oluşturanlar skotokromojen, yalnız ışıktaki pigment oluşturanlar fotokromojen, hiçbir şekilde pigment oluşturmayanlar nonkromojendir. **E.** Niasin üretimi ise *M.tuberculosis*'in tanımlanmasında en önemli aşamadır. Pozitif olması, katalaz ve peroksidaz testleri yapılacaktır. **F.** Nitrat redüktaz aktivitesi *M. tuberculosis* ile *M. bovis*'i ayırt etmede ve hızlı üreyen mikobakterilerin tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. **G.** Katalaz aktivitesi oda sıcaklığında ve 68 °C'de katalaz aktivitesine bakılır ve *M. tuberculosis* oda sıcaklığında pozitif, 68 °C'de negatiftir. Her iki ısıda pozitif olması atipik mikobakteri olasılığını güçlendirmektedir. **H.** Peroksidaz aktivitesi, yapılışı ve değerlendirilmesi katalaz testi gibidir. Tch2 duyarlılığı da *M. bovis*'in ayırt edilmesinde kullanılır. Bakteri süspansiyonundan 5µg/ml tioen 2 –karboksilik asit hidrazid içeren LJ besiyerine pasaj yapılır. Üreme durumu kontrol edilir. Üreme yoksa *M. bovis* olduğu anlaşılmaktadır.

2.2.4. Epidemiyoloji

Paratüberküloz hastalığı dünyanın her tarafında özellikle ılıman iklime sahip olan İngiltere, Danimarka, Fransa, Almanya ve Hollanda gibi Avrupa ülkeleri ile Amerika, Avustralya ve Kanada'da görülmektedir. Sığır tipi suşlar en sıklıkla Avrupada görülmekte olup başlıca sığırlarda, diğer evcil ve vahşi ruminantlarda, ruminant olmayan türlerde ve keza insanlarda tespit edilmiştir. Koyun tipi suşlar çoğunlukla yavaş üremekte ve bu gruptaki suşlar (a) pigmentli ve pigmentsiz suşlar olup Fas, İskoçya, İzlanda, Güney Afrika, Avustralya ve Yeni Zelanda koyunlarından; (b) Avustralya ve İzlanda da sığırlardan; (c) Yeni Zelandadaki keçilerden izole edilmişlerdir. Orta grup Güney Afrika, Kanada ve İzlandada ki birkaç koyundan ve İspanya'daki keçilerden izole edilen suşlar olarak bildirilmiştir (17). Paratüberküloz ihbarı mecburi bir hastalık olmadığı için ve gerçek prevalansı ortaya koyacak bir teşhis metodu mevcut olmadığından, hastalığın prevalansı ile ilgili tahminler çoğunlukla kesimhanelerde toplanan materyallerin incelenmesi neticesinde elde edilmiştir. Amerika'nın değişik eyaletlerinde yapılan çalışmalar, sığırlarda hastalığın prevalansının % 1.6 ile % 18 arasında değiştiğini ortaya koymuştur. Hastalığın prevalansının Güney Avustralya'da % 0.43, Danimarka'da % 2.3 ve İngiltere'de ise % 3.5 olduğu bildirilmiştir. Hayvanlarda barsak cidarının kalınlaşması, kronik diare 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 (10,11,18,19). Süt sığırlarında süt üretiminde ve kalitesinde meydana getirdiği ekonomik kayıplar önemli bir yer tutmaktadır (5,20). İnfeksiyon birçok hayvan türünde sığır, koyun, keçi, manda da görülmektedir. (21), Ruminantlarda enfeksiyonun bulaşması başlıca fekal-oral yolla olmaktadır. Enfekte hayvanların gaitaları ile çıkardıkları büyük miktardaki organizmaların su, yem, süt ve merayı bulaştırması sonucu etken, sindirim yolu aracılığıyla vücuda girer (22). Klinik belirtilerin başlamasından önce çok uzun bir inkubasyon süresi sonunda hayvanlar gaitalarıyla 15-18 ay etkeni bulaştırırlar (23). Asemptomatik hayvanlar belirli aralıklarla etkenleri çıkarmaya devam ederler. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* kolostrum, süt, meme, erkek ve dişi genital organlarından izole edilmiştir. Gençler erginlerden daha duyarlı olup genç yaşta alınan etkenlere rağmen inkubasyon periyodunun uzunluğuna bağlı olarak klinik belirtiler 3-5 yıl sonra görülür. Bu nedenle de

sığırlarda 2-6 yaşlar arasında hastalığa rastlanılmaktadır. Yüksek süt verimli hayvanlarda infeksiyonun görülme sıklığı diğerlerine oranla daha yüksektir (24). Genç sığırlara infeksiyon dışkı materyali, kolostrum veya sütün ağız yoluyla alınması veya intra uterin aşamada bulaşabilmektedir. Özellikle yaşamın ilk haftalarında kolostrum veya kontamine sütlerin buzağılar tarafından tüketilmesi bulaşmada en önemli kaynak olarak gösterilmiştir (24). Doğal olarak infekte sığırlarda periparturient dönemde sütlerinde MAP'in düşük miktarlarda bulunduğu, buzağılamadan sonraki 1-2, günlerde kolostrumda en yüksek düzeyde etken (50 CFU/ml) bulunduğu, 5. günden sonra bu miktarın (1 CFU/ml) düştüğü ortaya konulmuştur (25). Sütün endojen yolla mı yoksa eksojen yolla mı daha yoğun bulaştığına yönelik bilgiler kıyaslandığında özellikle infekte sığırların dışkıları ile çıkarttıkları etkenlerin (10^8 CFU/gr) sütü kontamine ettiği tespit edilmiştir (25). MAP ile enfekte olmuş bir sürüde bazı hayvanlar enfekte olmamasına rağmen bunların çoğu genellikle enfekte ve sublinik olarak kabul edilmekte ve bir süre sonra bunların bir kısmı klinik belirtiler gösterebilmektedir. Prepatent dönemdeki hayvanlarda hastalık belirtisi görülmez ve etkenlerin dışkı saçılımı söz konusu değildir. Klinik olarak hayvanlarda kilo kaybı ve ishal başlıca belirtiler olarak görülmekte ve serolojik olarak kanlarında antikor tespit edilmektedir. Genellikle bu dönemde yoğun miktarda dışkı ile bakteri etrafa saçılmaktadır (26). Bu hayvanlardan günde yaklaşık olarak 5×10^{12} etkenin çıkartıldığı tespit edilmiştir (24). Yapılan birçok çalışmada MAP'ler gıda, süt, su ve etten izole edilmişlerdir (24,27,28). Berghaus ve ark. (29), California eyaletinde 23 işletmedeki toplam 1560 sığır serumundan ve mandırada bulunan çevresel örneklerden (karantinahane, barınak ve geçit yolları ile işletmedeki sığır dışkılarından ve sularından) MAP teşhis etmek amacıyla kültür ve serolojik yöntemleri kullanmışlardır. Araştırmacılar 23 su numunesinin 15 (% 65)'inden, 22 dışkı numunesinin 8 (% 36)'inden ve sağımhane çıkışındaki geçit yollarından alınan 23 örnekğin 9 (% 39)'undan etkeni izole etmişlerdir. Özellikle sulardan yüksek oranda etken izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İşletmelerdeki sığırlardan 68 (% 4,36)'ini sero pozitif olarak tespit etmişlerdir. Çevresel örneklerin kültür analizleri ile işletmelerdeki seropozitiflik arasında doğru orantının bulunduğunu ve buna bağlı olarak çevresel örneklerin incelenmesinin infeksiyonun ortaya konulmasında etkili ve ucuz bir teşhis yöntemi olduğunu vurgulamışlardır. Enfeksiyonun naklinde fomitler rol oynayabildiği gibi insektler de mekanik vektör olarak etkili olmaktadır. Sığırlar arasında infeksiyonun bulaşmasında canlı vektörlerin de risk oluşturabileceği Ficher ve ark. (30,31,32) tarafından yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Sığır

işletmelerinde bulunan solucanların mikobakterileri taşıyıp taşımadıklarını araştırmışlardır. Paratüberkülozis ile ilgili olarak hayvanat bahçesindeki keçilerin bulunduğu alandan ve diğer beşi de sığır işletmelerinden olmak üzere toplam altı noktadan numune toplamışlardır. Dışkı numunelerinin 37 (% 4.6), çevresel örneklerden (ahır ve çevresinde bulunan örümcek ağları, toz, toprak, artan yemler ve gübre) 3 (% 1.4) ve solucan örneklerinin 1 (% 3.1)'inden MAP'i IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP) tip B-C1 ile izole etmişlerdir. Solucanların infeksiyonun taşınmasında bir vektör olduğunu ve işletmelerde paratüberküloza karşı kontrol programlarının hazırlanmasında bu canlıların da göz önünde bulundurulması gerektiğini vurgulamışlardır (30). Fischer ve ark. (31) paratüberkülozlu sığır dışkılarından etkeni IS900 RFLP) tip B-C1 yöntemi ile ortaya koyarken ayrıca sığır dışkılarından topladıkları değişik gelişim aşamasındaki 1044 *Eristalis tenax* parazitinde *Mycobacterium paratuberculosis*'in bulunma sıklığını incelemişlerdir. Araştırmacılar 111 (% 21,4) *E. tenax* larvasında etkeni tespit ederken 340 pupa ve 41 yetişkinin kabuğundan etken izole edilememiştir. Elde edilen sonuçlara göre *E. tenax*'ların bağırsaklarında ve iç organlarında *M. paratuberculosis* bulunduğunu ve larvaların etkeni sığır sürüleri arasında yayabileceğini bildirmişlerdir.

2.2.5. Doğal yaşam yerleri

Paratüberküloz hem evcil hem de vahşi hayvanlarda görülebilmektedir. Yabani hayatta tavşan, maymun, tilki, gelincik ve yaban domuzundan etken izolasyonu yapılmıştır (31) 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. (33). Ancak Strickland ve ark. (34), yaklaşık 3400 baş laktasyon ve kurudaki inekte dört mevsim süresince kültürel ve serolojik olarak yaptıkları incelemede mevsimlerin infeksiyon 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 buzağular 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). Süt içerisinde eksi 70 derecede yıllarca, artı 4 derecede haftalarca, artı 60 derecede 20 dk, artı 70 derecede 5 dk dayanır. İnkubasyon periyodu 4 ay ile 15 yıl arasında değişmektedir. Sığırlarda klinik bulguları dört aşamada değerlendirmek mümkündür.

2.2.6. Ülkemizde ve Dünyadaki Sığırlarda Paratüberkülozun Durumu

Paratüberkülozun Avrupadaki seroprevalansı üzerine birçok araştırma mevcuttur. Serolojik olarak ELISA ile yapılan çalışmalarda seroprevalans, en düşük Slovenya'da % 0.4 ve en yüksek Almanya'da % 24.1 olarak kayıt edilmiştir (51). Dünyanın değişik bölgelerinde de konu ile ilgili araştırmalar mevcuttur. ABD'de Adaska ve Anderson (36), 1950 serum örneğinden 89 (% 4.6)'unda ve Hirst ve ark(31), iki yaş üzerindeki 10280 sığırdan 424 (% 4.12)'ünde pozitiflik tespit etmişlerdir. Kolombiyada Fernández-Silva ve ark. (37), % 10,1 oranında bir seroprevalans saptamışlardır. Ülkemizde Makav ve Gökçe (35), Kars yöresinde subklinik paratüberkülozun prevalansını % 3,5 bulurken Öztürk ve ark. (38) Burdur bölgesinde % 6.2 olarak bildirmişlerdir.

2.2.7. Semptomlar

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.

2.3. Mikobakteriyoloji Laboratuvarlarında Paratüberküloz Tanısı

2.3.1. Örneklerin işlenmesi homojenizasyon ve dekontaminasyon:

Klinik örnekler içerisinde bulunan mikobakteri grubunun dışındaki diğer bakterilerin (normal flora) ortadan kaldırılması ve mikobakterilerin yoğunlaştırılmasıdır. Bu amaçla dekontaminasyon işlemi amacıyla başlıca hexadecylpyridinium chloride (HPC), NaOH / oxalic acid, cetylpyridinium chloride olmak üzere kimyasalar kullanılmaktadır (39,40,41.). Glanemann ve ark. (41) dışkı örneklerinin dekontaminasyonu amacıyla NaOH / oxalic acid ve % 0,75 hexadecylpyridinium chloride metodlarını uygulamışlar ve yapılan kültürlerde sırasıyla % 17,6 ve % 21,5 oranında bir kontaminasyonla karşılaşmışlardır. Araştırmacılar NaOH / oxalic acid metodunun kontaminasyonu azaltmada diğer metoda oranla daha uygun olduğunu ayrıca % 46,8 atipik *Mycobacteria*'ler izole edilirken HPC ile muamele edilen numunelerden izole edemediklerini bildirmişlerdir.

2.3.2. Mikroskopi:

Mikrobakteriler diğer bakteri türlerine göre kimyasal ve alkalilerle muamele edildiklerinde, diğer bakteri türleri ölürken tüberküloz basili canlı kalmaktadır. EZN yöntemi en yaygın kullanılan boyama yöntemidir. Aside karşı direnç gösteren basiller mavi zeminde pembe ve kırmızı çubuklar halinde görülmektedir. Florokrom boyama yöntemi ise her gün 100 veya daha fazla yayma incelemesi yapan laboratuvarlarda hızlı ve kolay yapılabildiğinden ön tarama için yaygın olarak kullanılmaktadır. Floresans veren

auramin-rhodamine boyasıyla boyanan preparatlar floresan mikroskopta 250x veya 400x büyütmede incelenir. ARB ler siyah zeminde parlak sarı görülür.

2.3.3. Kültür Yöntemleri:

Mikrobiyolojinin temel kuramlarından birisi hastalığa yol açan etkenin kültür yöntemleri ile izole edilmesidir. Paratüberkülozda ilk tanı klinik verilerle yapılmış olsa bile kesin tanı için etkenin direkt bakış da tespiti ve kültürde üretilerek tanımlanması esastır. Bu nedenle tanıda "gold standart" kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Kültür yönteminin spesifitesi yüksek olmasına rağmen sensitivitesi düşüktür (42). Ancak MAP için kültür analizlerinde kısa sürede sonuç elde edilememesi; testin sonuçlanmasının 3 aya kadar uzaması önemli bir dezavantaj olarak görülmektedir. Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için numunede 5×10^3 - 5×10^4 ml basil bulunması gerekmektedir. Kültürde üreyen mikroorganizmaların sulandırılması ile yapılan çalışmalarda saptama sınırı 5-100 CFU arasında değişirken, gerçek klinik örneklerde duyarlılık çok daha düşük bulunmaktadır.

Özellikle son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar neticesinde kültür sonucu negatif olmasına rağmen PCR analizi ile pozitif sonucun alındığı vakalar bildirilmiştir (21). Whitlock ve ark. (42) teşhiste ELISA ve dışkı kültürü yöntemlerinin duyarlılıkları üzerine yaptıkları çalışmada ELISA'de % 15-75 bir sensitivite, dışkı kültüründe ise sensitivite ve spesifitesiyi sırasıyla % 42 ve % 99 üzeri bulmuşlardır. Collins ve ark. (43), Ridge ve ark. (44) ve McNab ve ark. (45) sığırlarda ELISA'in sensitivite ve spesifitesini sırasıyla % 45 ve % 90 üzeri tespit ederken kültür yapmamışlardır. Sockett ve ark. (46) ELISA'in sensitivitesini % 47-65 saptarken dışkı kültürünün sensitivite ve spesifitesini sırasıyla % 45-73 ve % 99 üzeri belirlemişlerdir. Sweeney ve ark. (47) ELISA'in sensitivitesini % 15-87; Neelsen ve ark. (48), ELISA'in sensitivite ve spesifitesini sırasıyla % 27-86 ve % 55-98; dışkı kültüründe ise sırasıyla %20-73 ve % 98'in üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Glanemann ve ark. (41), klinik olarak paratüberkülozdan şüphelendikleri 186 sığırdan 39 (% 20,9)'unun serumlarında ELISA ile pozitiflik tespit ederken 39 sığır içinden sadece 6 (% 15,4)'sından etken izole etmişlerdir. Serumlardan şüpheli (% 8) ve negatif (% 5,3) sığırlardan aldıkları serumları ise 2 (% 13,3)'sinden aynı şekilde kültürde pozitif sonuç tespit etmişlerdir. Sivakumar(21) paratüberküloz lezyonlu mandaların iç

organlarından histolojik boyama, kültür ve PCR analizlerini yapmışlardır. Yapılan üç analizin sensitivitesini sırasıyla % 25, % 30 ve % 70 bulmuşlardır.

Mikobakterilerin ikiye bölünmesi 16-18 saat civarındadır ve izole edilmeleri için gerekli olan besiyerlerinde uzun süre inkübe edilmesi gerekmektedir. Zorunlu aerop olan mikobakterilerin bulunduğu ortamda oksijen miktarının azalması üreme ile doğru orantılı olarak değişmektedir, ortamda oksijen miktarı azalınca üreme de azalmaktadır. Uygun sıvı ve katı besiyerlerinde 7-21 gün gibi uzun bir sürede ürerlerken, uygun üreme 35-37 °C'de gerçekleşmektedir. Kültür süreleri ise 6-8 hafta arısında değişiklik göstermektedir. Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi için kullanılan konvansiyonel besiyerleri iki tip yani sıvı ve katıdır. Katı özellikteki besiyerlerinden bahsederken yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür. Tam yumurta ya da yumurta sarısı içeren yumurta temelli besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılan Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeridir, fakat bu yöntemin dışında Petragani ve American Trudeau Society gibi besiyerleri de kullanılabilir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ayrıca daha çok üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda L-J besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Yumurta temelli besiyerleri opak görümlü olmasına karşın, agar temelli besiyerleri şeffaf görümlüdür. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelendiği zaman oluşan kolonileri görmek mümkün olmaktadır. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar temelli besiyerlerindedir. Bunun dışında kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri (L-J Gruft, Mycobactosel LJ, Mitchison selektif 7H 11) kullanılabilir. Primer izolasyon yönteminde besiyerlerinden en az birisinin selektif olması önerilmektedir. Sıvı besiyerleri sınıfında olan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlık deneyleri ve diğer in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örnekler için bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla da kullanılabilir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır.

2.3.4. Serolojik Yöntemler:

Paratüberkülozlu sürülerde kontrol programlarının gerçekleştirilmesinde en önemli konu sürü içerisinde özellikle subklinik hayvanlar başta olmak üzere dışkı ile saçılım yapan enfektif hayvanların tespitidir. Bu aşamada ülkemizde ve dünyanın pek çok ülkesinde tarama testleri ön plana çıkmaktadır. Tarama testlerinden istenilen enfeksiyonun tanımlanmasında sensitivite ve spesifitesinin yüksek olması, kısa sürede sonuç vermesi ve ekonomik olması başlıca kriterlerdir. Serolojik testler bu kriterlerin çoğuna sahip olmasına rağmen sensitivite ve spesifiteleri yönünden dezavantajlarının bulunduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Serolojik testlerden elde edilecek sonuçlar üzerine enfeksiyonun aşaması bizzat etkili olmaktadır. Genellikle subklinik ve az miktarda dışkı ile etken çıkarımının sözkonusu olduğu durumlarda serolojik testlerden negatif sonuç alınmaktadır. Bu aşamadaki birçok sığırdaki humoral antikor yanıtı tanımlanabileceği sınırların altındadır. Hayvanda enfeksiyon olmasına rağmen serolojik testlerden negatif sonuçlar alınmaktadır.

Sığır paratüberkülozunda subklinik enfeksiyonların teşhisinde komplement fiksasyon testi (CFT), agar jel immunodiffüzyon (AGID), interferon-gamma (IFN- γ), floresans antikor testi (FAT) ve iki farklı ticari Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) testi olmak üzere farklı serolojik testler kullanılmaktadır. Testlerin spesifiteleri % 95-99 arasında değişmekte olup yüksek bir değere sahiptir. Testlerin sensitivitesi bizzat sürüdeki enfeksiyonun prevalansındaki artışa paralel olarak artmakta bunun tam tersi olarak prevalans azaldığında ise azalmaktadır. Bundan dolayı test sensitivitesinin düşük tespit edildiği durumlarda mutlaka ikinci bir test ile sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sürülerde hastalığın diyagnostik teşhisinde kullanılan serolojik testler arasında rutin olarak uygulanan başlıca primer testtir (49). ELISA testleri materyalin temininde sıkıntı yaşanmaması, kısa sürede sonuç vermesi, test kitlerinin kolay temin edilebilmesi ve uygulanmasının pratik olması açısından tercih sebebinin oluşturmaktadır. Test materyali olarak genellikle serum olmak üzere ayrıca plazma ve sütler de testte kullanılmaktadır. En ideal şartlarda dışkılarıyla etken çıkarmayan ve çıkaran sığırların serumlarının ELISA ile incelenmesi sonucu sırasıyla % 14 - 47 ve % 40 - 88 arasında düşük bir sensitivitenin elde edildiği fekal yayılım aşamasında bu oranın en yüksek olarak % 97.9' a çıktığı bildirilmiştir (49) Farklı birçok

ELISA test yöntemi birçok araştırmacı (36,43,49,50,51,52) 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 (53).

McKenna ve ark. (49), iki farklı antijen (protoplazmik ve lipoarabinomannan) kullanarak hazırladıkları ELISA kitlerinin duyarlılığını karşılaştırmak üzere planladıkları çalışmalarında sürü büyüklüğü farklı, sekiz işletmedeki toplam 383 hayvanı kültür, PCR ve ELISA yöntemlerini kullanarak MAP yönünden incelemişlerdir. Kültür ve PCR analizleri sonucu bu hayvanlardan 104 (% 39,8)'ünün pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Kültür yönteminin pozitif sonuç verdiği 104 sığırdan 86'sının numunelerinin PCR analizi yapılmış ve bunlar içerisinde de 63 (% 16,4)'ü pozitif olarak bulunmuştur. Paratüberküloz yönünden arı iki işletmedeki toplam 116 sığırdan kültür analizleri sonucu enfeksiyon tespit edilemezken protoplazmik antijenli ELISA kiti ile 6 sığırdan ve lipoarabinomannan antijenli ELISA kiti ile de 14 sığırdan pozitiflik tespit edilmiştir. Araştırmacılar fekal kültür sonuçlarını baz alarak protoplazmik ve lipoarabinomannan antijenli ELISA kitlerinin sensitivitesini sırasıyla % 72.4 ve % 65.5; spesifitesini sırasıyla % 98,4 ve % 87,9 olarak tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada aynı şekilde lipoarabinomannan antijeni ile kaplı pleytlerde süt veya serum kullanılarak paratüberkülozun teşhisine yönelik yapılan test sonuçlarından başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Süt numunelerinin analizlerde kullanımına bağlı olarak taze veya dondurulmuş, koruyucu bir madde katılıp veya katılmamış olmasının test sonuçları üzerini önemli bir etkisinin olmadığı vurgulanmıştır (51). Hendrick ve ark. (51) 689 sığırdan 130 (% 18,9)'unun serumunda, 77 (% 11,1)'sinin sütünde ve 72 (% 10,4)'sinin dışkıında pozitiflik tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aynı sığıra ait süt ve serum numuneleri ile yapılan ELISA uygulamaları sonucu farklı sonuçlar alındığını ve korelasyon bulunmadığını bildirmişlerdir. Kit üreticisi Idexx firması dışkı kültür sonuçlarını baz alarak serum, plazma ve süt numunelerinin ELISA sensitivite – spesifite performanslarını sırasıyla % 69.1 - % 99.2, % 62.2 - % 100 ve % 81.1 - % 99.7 tespit etmiştir.

Komplement fikzasyon 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 dışkıının 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 (AGID) testi klinik paratüberküloz olgularının saptanmasında % 96'lık bir sensitivite ve % 94'lük bir spesifiteye sahiptir. Bu test özellikle klinik paratüberkülozun teşhisinde en uygun yöntem olarak değerlendirilmektedir (54). 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.

İnterferon-Gamma (IFN- γ), hücrel immun yanıtın tespitine yönelik bir test olup antijenlerle uyarılan T hücrelerinin salgıladığı IFN- γ seviyesinin ELISA yöntemi ile belirlenmesi esasına dayanır. Huda ve ark. (55), paratüberkülozun teşhisinde IFN- γ testinden elde edilen sonuçlarla serum antikor ve süt antikor ELISA test sonuçlarının benzerlik gösterdiğini ve IFN- γ 'nın paratüberkülozun teşhisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar özellikle IFN- γ testinin 1-2 yaşlı sığırlarda, serum antikor ve süt antikor ELISA testlerinin ise 3 ve üzerindeki yaşlı sığırlarda uygulanması sonucu daha duyarlı sonuçların alınabileceğini vurgulamışlardır.

Fluoresans 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.

Diğer bir serolojik yöntem olarak flow cytometer metod (FCM)'u, Eda ve ark.(15), 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.

2.3.5. Moleküler Yöntemler:

Son yıllarda özellikle canlı hayvanlarda enfeksiyonun kısa sürede teşhisi amacıyla rutin olarak moleküler analiz yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Paratüberkülozun tanısında moleküler yöntemlerin uygulanması sürekli gelişim ve ilerlemeler kaydetmektedir. Moleküler yöntemlerin avantajları yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Kültürel yöntemler 12 haftayı aşan bir sürede sonuç vermesine rağmen moleküler yöntemlerden aynı gün içerisinde sonuç elde edilmesi en önemli avantajları olarak görülmektedir. Moleküler tekniklerin rutin kullanım alanları analiz ücretlerinden dolayı sınırlı kalmaktadır. Ayrıca, sensitiviteilerinin 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 klinik izolatların spesifik tiplendirilmesi için kısa sürede sonuç veren ve güvenilir moleküler metodların geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Son yıllarda özellikle canlı hayvanlardainfeksiyon kısa sürede teşhisi amacıyla rutin olarak moleküler analiz yöntemlerinden yararlanılmaktadır.(56) Bu amaçla MAP izolatlarının tiplendirilmesinde Djønne ve ark. (57), IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP); Motiwala ve ark. (58), multiplex PCR typing; Rajeev ve ark. (59), real-time PCR; Grant ve ark. (33), O'Reilly ve ark. (60), immunomagnetic separation-PCR (IMS-PCR); Romano ve ark. (61), variable number tandem repeat (VNTR)-Mycobacteria interspersed repetitive units (MIRU) typing; Stabel ve Bannantine (62), Nested PCR; Stevenson ve ark. (63), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)'den yararlanmışlar ve kullandıkları yöntemin etkinliğini savunmuşlardır. Araştırmacılar analizlerde etkenin

saptanması amacıyla en fazla dışkı numunelerinden (26,46,48,51) yararlanılırken süt numunelerini de (14,41) analizlerde kullanmışlardır.

McFaden ve ark. subsp. 1987 yılında sığır paratüberkülozunun etkeni olan *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*'in DNA'sında spesifik insertion sekans (IS) 900'ların bulunduğunu bildirdikleri tarihten günümüze moleküler çalışmalarda ilerlemeler kaydedilmiştir (9). *M. avium* suşları arasında ayırım yapmak için moleküler tiplendirmede farklı yöntemler denenmiştir. Günümüzde en yaygın kullanılan yöntem çeşitli IS elementlerinin çeşitliliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. IS901 özellikle kanatlılardan izole edilen *M. avium* subsp. *avium* tanımlanmasında kullanılırken, IS902 *M. avium* subsp. *silvaticum* ve bazı *M. avium* subsp. *avium* suşlarının saptanmasında faydalanılmıştır. IS1311 tüm MAC suşlarında bulunurken IS1311 polimorfizimi çeşitli alt türler arasında ve içindeki farklılıkların saptanmasında kullanıldı. IS1245 *M. avium* subsp. *avium* ve alt türlerinin tiplendirilmesinde RPLP'de yaygın olarak tercih edildi (64). Polymerase Chain Reaction (PCR) ile paratüberkülozun teşhisinde etkenin genomunda bulunan *hspX* geni ve tekniği yaygın kullanım alanı bulmuştur. Özellikle RT-Real-Time PCR (RT-PCR) teşhis aracı olarak tercih oluşturmaktadır. Bu amplifikasyon tekniği diğer amplifikasyon tekniklerine oranla gerçek negatif ile hatalı negatif sonuçları birbirinden ayırması açısından ön plana çıkmıştır (65).

Buergelt ve Williams (66) subklinik MAP ile infekte sığırların kan süt, karaciğer ve dışkılarından teşhiste Nested PCR yöntemini kullanmışlardır. Araştırmacılar P90, P91 ve J1 ve J2 primerlerinde sırasıyla % 99.9 ve % 100 Araştırmacılar PZR sonuçlarını AGID ve ELISA yöntemleri ile kıyaslamışlardır. Serolojik olarak kullanılan yöntemlerin negatif veya şüpheli sonuç verdiği numunelerin PZR'da pozitif olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar etkenin DNA'sını kan, süt, karaciğer ve dışkıdan sırasıyla % 40, % 96, % 93 ve % 87 olarak saptarken özellikle karaciğerden alınacak biyopsi numunelerinin süt ve dışkı gibi kontaminasyona maruz kalmamasından dolayı teşhiste önemli yerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Sivakumar ve ark. (21), mandaların ileum mukozası ve mezenterik lenf nodüllerin kortikal kısmından aldıkları numunelerden etkenin genomik DNA'sını izole ederek IS900 spesifik PCR işlemi uygulamışlardır. Primer olarak BN1 ve BN2 ile *PvuII* restriksiyon enzimi kullanarak yaptıkları çalışmada 626 bp'de bant

elde etmişlerdir. Mandadan izole ettikleri MAP'lerin keçilerden izole edilen suşlarla % 97,8 ve daha önce IS900 ile izole edilen suşlarla da % 98,3 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar PCR teşhis yönteminin kültürden daha duyarlı olduğunu da vurgulamışlardır. Grant ve ark. (67), süt numunelerinden MAP'in gösterilmesinde IMS-PCR kullanmışlar ve testin 20 örneğe kadar tek bir kişi tarafından bir kerede kolaylıkla yapılabileceğini ve 7-8 saat içinde sonuç alınması açısından avantajlarının bulunduğunu bildirmişlerdir. Yaklaşık 50 ml süt içinde 10^3 CFU (20 CFU / ml) bakteriyi tanımlayabileceğini ifade etmişlerdir.

2.3.6. Diğer Yöntemler:

Zamanımızda birçok laboratuvarında, konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının fazla olduğu hızlı kültür sistemleri standart amaç için kullanılmaktadır. Çoğu için sıvı besiyeri kullanımıyla birlikte, bir fazik ve katı besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de mevcut olmakla birlikte ve bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması Centers for Disease Control (CDC) tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon olma şansını arttırdığı bilinmektedir. Klinik örneklerde mikobakteri tespit edilme ve tiplendirme zamanını belirgin bir biçimde azaltacağı öne sürülen manuel ve otomatik sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerden biri olan Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 sistemi tam otomatik, non-radyometrik ve 7 ml kültür tüplerini inkübe edip monitorize ederken iğne veya başka keskin herhangi bir materyal gerektirmeyen bir sistemdir. Her bir kültür tüpünün dibinde silikona emdirilmiş, floresans veren belirteç ile Modifiye Middle Brook 7H9 besiyeri bulunur. Bu bileşim besiyeri ortamındaki çözünmüş oksijene duyarlıdır. Mikroorganizmalar besiyerinde çoğaldıkça oksijeni tüketip floresansın serbestleşmesine yol açar ve ortaya çıkan floresans sistem tarafından otomatik olarak algılanır (68). Hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize Bactec 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. Bactec 12B (Middlebrook 7H12) ve Bactec 13A (Middlebrook

7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerlerinde bulunan C14 işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan 14 CO₂ nin 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Başarı ile kullanılmakla beraber, sistemde yeralan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazda yapılan rutin kontroller sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyon sorun oluşturmaktadır (69). Sistemde izolasyonun dışında, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin ayrımı yapılabilmektedir ve *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı denenmektedir. Günümüzde alternatif izolasyon sistemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar hızla sürmektedir. Myco-ESP(Extra Sensing Power) II, (Trek Diagnostics, Inc. ,Westlake, Ohio), MB/Bact T (Organon Teknika, Durham, NC), Bactec 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD) ve Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Biosciences, Sparks, MD) mikobakterilerin tanısı için yeni tam otomatize sistemlerdendir. Sistemler arasında izolasyon oranı açısından çok büyük fark gözlemlenmekle birlikte, konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek yani Bactec 460 TB sistemine göre daha düşük oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir. Mikobakterileri için, üretme süreleri açısından sistemler karşılaştırıldığımız zaman, Bactec 460 TB sisteminin, ESP II ve MB/BacT sistemlerine oranla daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. Birçok çalışmada tam otomatize sistemlerde üretme süresi ortalama ≤ 14 gün olarak saptanmış ve en yüksek izolasyon oranının Bactec 460 TB ve katı besiyeri kombinasyonu ile sağlandığı tespit edilmiştir. Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır fakat bu sistemlerde oran, Bactec 460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Myco-ESP II, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir, sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ayrıca besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenmektedir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen oleik asit-albumin-dekstrozkatalaz (OADC) ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı ilave edilmektedir. Bu sistem tüm klinik örnekler için uygunluk teşkil etmektedir. MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor

içermektedir ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi ölçen bir sistemdir. Bilgisayar yardımıyla bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altına alınmaktadır. Steril örnekler ekilmeden önce besiyerlerine reconstitution sıvısı ilave edilmekte; steril olmayan örneklerin ekiminden önce antibiyotik karışımı ilave etmek gerekmektedir. Sistem tüm örnekler için kan dışında uygundur. Bactec 9000 MB, besiyerlerindeki oksijen kullanımının fluoresans ile belirlendiği bir sistem olarak görülmektedir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılmaktadır. Bactec MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde ise Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metalkompleksi içeren silikon bulunmaktadır. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilmektedir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı fluoresans oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı fluoresans oluşmaktadır ve oluşan fluoresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, UV ışığı altında makroskopik olarak da değerlendirme yapılabildiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygun olmakla birlikte kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir. Fazla sayıda örneği aynı anda kontrol edebilen Bactec MGIT 960 (960 örnek), Bactec 9000 MB (240 örnek) , MB/BacT (240 örnek) ve ESP II (128/256/384 örnek inceleyen üç farklı cihaz) genellikle yüksek kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilmekle birlikte;daha düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlar için Septi-Chec AFB (BD Biosciences, Sparks, MD), MGIT (BD Biosciences, Sparks, MD) ve MB Redox (Biotest Diagnostics Corp., Danville, NJ) gibi manuel sistemler önerilmektedir.

2.3.7.Korunma ve Kontrol Yöntemleri

Hayvanlarda tedavi amacıyla uygulanabilecek antibiyotiklere karşı etkenin dirençlilik göstermesinden dolayı tedavi yapılmamaktadır. Halen paratüberkülozun tedavisine yönelik kemoterapotik bir ilaç bulunmamaktadır. Korunmaya yönelik rutin uygulama alanı bulan bir aşı da henüz geliştirilmemiştir. Enfeksiyonda subklinik aşama da herhangi

bir belirti görülmemesi kontrol yöntemlerinin önemini artırmaktadır. Bu aşamada özellikle sensitivitesi yüksek diyagnostik testler önem kazanmaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Süt Numuneleri

Laboratuvar analizleri yapılmak üzere 200 sokak süt numunesi Kayseri merkez de yer alan Kocasinan, Melikgazi ve Talas ilçeleri ile Hacılar, Felahiye, Develi, Özvatan, Sarız, İncesu, Pınarbaşı, Akkışla ve Yahyalı çevre ilçelerinde, mahalle aralarında satışa sunulan sokak sütlerinden toplanmıştır. Alınan süt numuneleri alındıktan sonra 4 °C'ye ayarlanmış şarızlı termoslar içerisinde Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmiştir.

Tablo 2. Kayseri ili merkez ilçelerinden alınan süt numune sayısı

İlçe Adı	Numune Sayısı
Kocasinan	20
Melikgazi	20
Talas	20
Akkışla	15
Sarız	15
İncesu	15
Yahyalı	15
Pınarbaşı	15
Hacılar	20
Felahiye	10
Develi	15
Özvatan	20

3.1.2. Dekontaminasyon Solüsyonları

3.1.2.1. Hexadecylpyridinium Chloride (HPC) (Sigma C9002)

İçerik	Miktar
---------------	---------------

Hexadecylpyridinium chloride	7,5 gr
------------------------------	--------

Distile su	100,0 ml
------------	----------

Süt numunelerinin dekontaminasyonu amacıyla hexadecylpyridinium chloride (HPC) (Sigma C9002) %0,75 oranında distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

3.1.2.1. Fosfat ile Tamponlanmış Solüsyon (Phosphate Buffer Solution, PBS)

İçerik	Miktar
---------------	---------------

NaCl	8 gr/l
------	--------

KCl	0,2 gr/l
-----	----------

Na ₂ HPO ₄	1,44 gr/l
----------------------------------	-----------

KH ₂ PO ₄	0,24 gr/l
---------------------------------	-----------

Süt numunelerinin dekontaminasyon işlemi sonucu sedimentin nötralize edilmesi ve identifikasyon testlerinde kullanılmak üzere PBS'undan faydalanıldı. Fosfat ile tamponlanmış solüsyon içerisinde yer alan her bir kimyasal hassas terazide tartılarak 800 ml distile su içinde çözündürüldü. Karışımın pH'sı $7,4 \pm 0,2$ ayarlandı ve hacim 1000 ml tamamlandı. Sterilizasyon amacıyla 121°C'da 15 dakika otoklavda bekletildi. Kullanılncaya kadar oda ısısında saklandı.

3.1.3. Ziehl Neelsen Boyama Seti (GBL 5017)

Süt numunelerinde içinde asido-rezistans bakterilerin mikroskopik muayenesi amacıyla preparatların boyanmasında Ziehl-Neelsen boyama seti (GBL 5017, Türkiye) kullanıldı.

3.1.3.1. Kit Komponentleri

3.1.3.1.1. Karbol Fuksin Çözeltisi ZN

İçerik	Miktar
---------------	---------------

Fuksin	1,0 g
--------	-------

Ethanol % 95 (v/v)	10,0 ml
Fenol	5,0 g
Distile su	100,0 ml

3.1.3.1.2. Asit-Alkol (Dekolorizasyon)

İçerik	Miktar
Konsantre HCl asit	8,0 ml
Ethanol % 95 (v/v)	10,0 ml

3.1.3.1.3. Metilen Mavisi Çözeltisi

İçerik	Miktar
Metilen mavisi	8,0 gr
Ethanol % 95 (v/v)	300,0 ml
Potasyum hidroksit	0,13 g
Distile su	1300,0 ml

3.1.4. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

3.1.4.1. Standart Suş: Araştırmada fenotipik analizlerde kullanılan pozitif kontrol suş olarak ulusal referans laboratuvarı olan Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Tüberküloz Paratüberküloz Ruam Teşhis Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.4.2. Tavuk Yumurtası: Etken izolasyonu amacıyla hazırlanacak besiyerinin zengileştirilmesi amacıyla 60 adet tavuk yumurtası Erciyes Üniversitesi Mithatpaşa çiftliğinden temin edilmiştir. Yumurtaların günlük ve temiz olmalarına dikkat edilmiştir.

3.1.4.3. Lowenstein-Jensen (L-J) Medium Base (Merck 1.05400, Germany)

İçerik	Miktar
Potassium dihydrogen phosphate	2,5 gr/l
Magnesium sulfate-heptahydrate	0,24 gr/l
tri-Magnesium dicitrate-14-hydrate	0,6 gr/l
L-Asparagine	3,0 gr/l

Potato flour	30,0 gr/l
Malachite gren	0,4 gr/lt

Dehidre besiyerinden 37,5 gr hassas terazide tartılarak 600 ml distile su içinde çözüldürüldü. Gliserol içerecek tüpler için hazırlanacak besiyerine 12 ml gliserol (Merck 1.04094, Germany) ilave edildi. Besiyerine 4 ml etil alkol içerisinde süspanse edilen 2 mg Mycobactin J (Allied Monitor, Inc., Fayette, MO) katılarak besiyerinin pH'sı $4,8 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. Hazırlanan besiyerlerini içeren duran bottle şişeleri otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 50 °C'a soğutuldu. Hazırlanan yumurta (sarı ve beyaz karışık) homojenizatından gliserollü ve gliserolsüz besiyerlerine 1000 ml ilave edildi. Ayrıca kontaminasyonları önlemek amacıyla besiyerine 100,000 U Penicillin G Potassium (Sigma P7794), 50 mg Amphotericin B (Sigma A4888) ve 50 mg Chloramphenicol (Sigma C0378) taksim edildi. Besiyeri hava kabarcıkları oluşmayacak şekilde iyice karıştırıldı. Kültürün yapılacağı ağzı vida kapaklı steril tüplere 7'şer ml olacak şekilde besiyeri taksim edildi. Tüpler yatık olarak pasteur fırınında 85 °C'da 45 dakika tutularak koagülasyona tabi tutuldu. Aynı işlem 24 saat sonra bir kez daha tekrarlandı. Besiyerleri gliserol ve gliserolsüz olarak işaretlendikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında 4 °C'da saklandı.

3.1.4.4. Watson-Reid Agar

İçerik	Miktar
L-Asparagin (monohydrate)	5,0 gr
Potassium dihydrogen phosphate	2,0 gr
Magnesium sulfate-heptahydrate	1,0 gr
Ammonium hydrogen citrate extra püre	2,0 gr
Natrium chloride	2,0 gr
Calcium chloride	0,02 gr
Cobalt chloride	0,002 gr
Ferric (III) ammonium citrate	0,075 gr

D (+) Glucose monohydrate	10,0 gr
Zinc Sulfate	0,01 gr
Noble agar	1 gr
Glycerin	63 cc

Merkal and Curran, bildirdiği yönteme göre hazırlandı Bu amaçla yukarıdaki karışım 1000 ml distile su içinde çözündürüldü. Besiyerine 4 ml etil alkol içerisinde süspansiyon edilen 2 mg Mycobactin J (Allied Monitor, Inc., Fayette, MO) katılarak besiyerinin pH'sı $5,5 \pm 0,2$ 'e ayarlandı. Hazırlanan besiyerini içeren duran bottle şişesi otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 50 °C ye soğutuldu. Kültürün yapılacağı ağzı vida kapaklı steril tüplere 7'şer ml olacak şekilde besiyeri taksim edildi. Besiyerleri gliserol ve gliserolsüz olarak işaretlendikten sonra kullanılmaya kadar buzdolabında 4 °C'da saklandı.

3.1.4.5. Antibiyotik Solüsyonları

Penicillin G Potassium (Sigma P7794)

Amphotericin B (Sigma A4888)

Chloramphenicol (Sigma C0378)

3.1.5. İdentifikasyon Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

3.1.5.1. Dubos Broth Base (Himedia M067, India)

İçerik	Miktar
Casein enzymic hydrolysate	0,5 gr/l
L-Asparagine	2 gr/l
Polysorbate 80	0,2 gr/l
Monopotassium phosphate	2,5 gr/l
Ferric ammonium citrate	0,05 gr/l
Magnesium sulphate	0,01 gr/l

Calcium chloride	0,0005 gr/l
Zinc sulphate	0,0001 gr/l
Copper sulphate	0,0001 gr/l

Dehidre besiyerinden 1,3 g hassas terazide tartılarak 180 ml distile su içinde çözüldürüldü. Gliserol içerecek tüpler için hazırlanacak besiyerine 10 ml gliserol (Merck 1.04094, Germany) ilave edildi. Besiyerine 4 ml etil alkol içerisinde süspanse edilen 2 mg Mycobactin J (Allied Monitor, Inc., Fayette, MO) katılarak besiyerinin pH'sı $6,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Hazırlanan besiyerlerini içeren duran bottle şişeleri otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 50 °C'ye soğutuldu. Ayrıca kontaminasyonları önlemek amacıyla besiyerine 100,000 U Penicillin G Potassium (Sigma P7794), 50 mg Amphotericin B (Sigma A4888) ve 50 mg Chloramphenicol (Sigma C0378) taksim edildi. Aseptik olarak hazırlanan sığır serum albumin V'den duran bottle şişelerine 20 ml ilave edildi. Kültürün yapılacağı ağız vida kapaklı steril tüplere 10'ar ml olacak şekilde besiyeri taksim edildi. Besiyerleri gliserol ve gliserolsüz olarak işaretlendikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında 4 °C'da saklandı.

3.1.5.2. Albumin from Bovine Serum, Fraction V (Fluka 05488, UK)

Sığır serum albümini, Dubos Broth Base (Himedia M067, India) besiyerinin zenginleştirilmesi amacıyla kullanıldı. Bu amaçla Albumin from Bovine Serum, Fraction V'dan 5 gr alınarak 100 ml steril fosfat ile tamponlanmış solüsyon (PBS)'a konuldu. Karışım çözüldürüldükten sonra sterilizasyon amacıyla 0.45 µm şırınga ucu filtre (Sartorius Stedim Biotech 16555, Germany) ile süzüldü.

3.1.5.3. Katalaz Testi Solüsyonu

3.1.5.3.1. Hydrogen Peroxide 30% (Merck 1.07209, Germany)

Katalaz testinde kullanılacak hydrogen peroxide % 30 oranında olacak şekilde kullanıldı. Bu test, bazı mikroorganizmalarca sentezlenen katalaz enzimini (hidrojenperoksid oksidoredüktase) saptamak amacıyla yapılır ve identifikasyonda kullanılır. Bu enzim ekseri sitokrom ihtiva eden aerobik bakterilerde ve bazı fakültatiflerde bulunur. Katalase

bir hemeprotein olup prostetik grubunda, her molekülde, 4 atomlu ve 3 değerli demir (Fe⁺⁺⁺) bulunur. Enzim, hidrojen peroksit'i (H₂O₂) su (H₂O) ve oksijene (O₂) ayırıştırır. Hidrojen peroksit'in ayrışmasında, bir molekülü substrate donör olarak görev yapar (19)

3.1.5.3.2. Tween® 80 (Merck 8.22187, Germany)

İçerik	Miktar
Tween 80	10,0 ml
Distile su	90,0 ml

Katalaz testinde hidrojen peroksit ile birlikte kullanılmak üzere % 10 oranında hazırlandı.

3.1.5.4. Niasin Testi Ayıracı

3.1.5.4.1. TB Niasin Test Strips (BD BBL™ Taxo™, 231741, USA)

Tüberküloz niasin test stripleri, *Mycobacterium* türlerinin niasin üretiminin tespiti amacıyla potassium thiocyanate, chloramine T, citric acid ve sodium aminosalicylate'tan oluşan kimyasalların emdirildiği kağıt şeritlerdir. Kahverengi ağzı vida kapaklı şişede 25 adet kağıt şeritin bulunduğu ambalaj kullanılıncaya kadar buzdolabında 4 °C'da saklandı.

3.1.5.5. Nitrat Testi Solüsyonu

3.1.5.5.1. Natrium Nitrate (Merck 1.06544, Germany)

İçerik	Miktar
Natrium nitrate	4,0 gr
Distile su	100,0 ml

Nitrat redüksiyon testinde kullanılacak natrium nitrate % 4 oranında olacak şekilde hazırlandı. Bazı bakteriler nitratları (NO₃) redükte ederek nitritlere (NO₂) ve hatta daha ileri basamaklara (amonyak (NH₃) ve gaz nitrojen (N₂) kadar ayırıştırabilmektedir (denitrifikasyon). Olay genellikle anaerobik koşullarda ve redüktase enzimlerinin katalitik etkisiyle sürdürülür (19)

3.1.5.5.2. Hydrochloric acid (HCl) 37 % (Merck 1.00317, Germany)

İçerik	Miktar
Hydrochloric acid (HCl)	8,281 ml
Distile su	100,0 ml

Nitrat redüksiyon testinde kullanılacak HCl 1 M olacak şekilde hazırlandı.

3.1.5.5.3. Sulphanilic acid (Merck 1.00684, Germany)

İçerik	Miktar
Sülfanilik asit	3,0 g
Distile su	70 ml
Glasiyal asetik asit	30 ml

Nitrat redüksiyon testinde kullanılacak sulphanilic acid %3 oranında olacak şekilde hazırlandı. Sülfanilik asit distile suya eklenerek karıştırıldı, eritmek için ısıtıldı. Soğutulduktan sonra asetik asit eklendi. Kullanılmaya kadar 2 – 8 °C’de saklandı.

3.1.5.5.4. N-1-naphtyldiethylene-diamine dihydrochloride (Merck 1.06237, Germany)

İçerik	Miktar
N,N dimetil- α -naftilamin	1,0 g
Distile su	70 ml
Glasiyal asetik asit	30 ml

Nitrat redüksiyon testinde kullanılacak N-1-naphtyldiethylene-diamine dihydrochloride %1 oranında olacak şekilde hazırlandı. Glasiyal asetik asit distile suya eklenerek karıştırıldı. Karışıma N,N dimetil- α -naftilamin katılarak çözüldürüldü. Kullanılmaya kadar 2 – 8 °C’de saklandı.

3.1.5.6. Pirazinamidaz Testi Besiyeri ve Solüsyonu

3.1.5.6.1. Pyrazinamidase Substrate Medium

İçerik	Miktar
Dubos broth base	6,5 gr
Pyrazinamide (PZA)	0,1 gr
Sodium pyruvate	2 gr
Agar	15 gr

Dehidre besiyerinden 6,5 gr hassas terazide tartılarak 1000 ml distile su içinde çözündürüldü. Hazırlanan besiyerlerinden 5 ml ağzı vida kapaklı tüpler taksim edildi ve tüpler otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi. Kullanılncaya kadar buzdolabında 4 °C'da saklandı.

3.1.5.6.2. Ammonium iron (II) sulphate hexahydrate (Merck 1.03792, Germany)

İçerik	Miktar
Ammonium iron (II) sulphate hexahydrate	1,0 gr
Distile su	100,0 ml

Pirazinamidaz testinde kullanılacak ammonium iron (II) sulphate hexahydrate %1 oranında olacak şekilde taze hazırlandı. Kullanılncaya kadar 2 – 8 °C'de saklandı.

3.1.5.7. Üreaz Testi Besiyeri ve Solüsyonu

3.1.5.7.1. Urea Broth (Merck 1.08483, Germany)

İçerik	Miktar
Yeast extract	0,1 gr/l
KH ₂ PO ₄	9,1 gr/l
Na ₂ HPO ₄	9,5 gr/l
Urea	20,0 gr/l
Phenol red	0,01 gr/lt

Dehidre besiyerinden 3,85 gr hassas terazide tartılarak 100 ml distile su içinde hafifçe ısıtılarak çözündürüldü. Besiyerinin pH'sı 6,8 ± 0,2 ayarlandı. Sterilizasyonu amacıyla buyyon 0,45 µm şırıngalı membran filtre (Sartorius Stedim Biotech 16555,

Germany)'den süzülerek steril tüplere 3'er ml taksime edildi. Besiyerleri kullanılmaya kadar buzdolabında 4 °C'da saklandı.

3.1.6. Paratuberculosis ELISA kit (ID Screen® Paratuberculosis Indirect, IDVet, France)

Süt numunelerinin plazmasında *Mycobacterium paratuberculosis*'e karşı şekillenen antikorların varlığının tespiti amacıyla indirekt Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) uygulandı. Bu amaçla *Mycobacterium paratuberculosis* Antikor Test Kiti (Institut Pourquier, France) kullanıldı. Kit komponentleri aşağıdaki listeden oluşmaktaydı.

3.1.6.1. Microplate coated with purified *M. paratuberculosis* extract

Lot / Ch.-B: 607-011, 4 x 96 well plates, kullanılmaya kadar 2 – 26 °C'da saklandı.

3.1.6.2. Positive Control

Lot / Ch.-B: 307-015, 1 x 1.0 ml, kullanılmaya kadar 4 °C'da saklandı.

3.1.6.3. Negative Control

Lot / Ch.-B: 21-006, 1 x 1.0 ml, kullanılmaya kadar 4 °C'da saklandı.

3.1.6.4. Dilution buffer 6

Lot / Ch.-B: 6-006, 1 x 60 ml, kullanılmaya kadar 2 – 26 °C'da saklandı.

3.1.6.5. Concentrated Conjugate (10x)

Lot / Ch.-B: 407-013, 1 x 60 ml, kullanılmaya kadar 4 °C'da saklandı.

3.1.6.6. Dilution buffer 3

Lot / Ch.-B: 3-005, 1 x 60 ml, kullanılıncaya kadar 2 – 26 °C’da saklandı.

3.1.6.7. Wash concentrate (20x)

Lot / Ch.-B: 15-003, 1 x 60 ml, kullanılıncaya kadar 2 – 26 °C’da saklandı.

3.1.6.8. Substrate solution (TMB)

Lot / Ch.-B: 7-008, 1 x 60 ml, kullanılıncaya kadar 4 °C’da saklandı.

3.1.6.9. Stop solution (H₂SO₄ 0,5 M)

Lot / Ch.-B: 10-003, 1 x 60 ml, kullanılıncaya kadar 2 – 26 °C’da saklandı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Süt Numunelerinin Toplanması

Çalışma kapsamında Kayseri ili merkez üç ilçesi ile dokuz da çevre ilçelerden olmak üzere Tablo 2’de gösterilen miktarlarda süt numuneleri Mayıs 2010 – Ekim 2011 yılları arasında toplandı. Süt numunelerinin toplanması esnasında farklı satıcılardan alınmasına dikkat edildi ve aynı satıcılardan süt numunesi tekrar alınmadı. Süt numuneleri steril poşetler içerisine 0,5 lt olacak şekilde bizzat aseptik şartlarda alınarak soğuk zincirde laboratuara getirildi. Laboratuvarda yapılacak analiz yöntemlerine göre herbir süt numunesi 3 adet 50 ml’lik steril falkon içerisine direkt mikroskopi, kültür ve serolojik analizleri yapılmak üzere taksim edildi. Numunelerin direkt mikroskopi ve kültür analizleri yapılıncaya kadar 4 °C’de bekletildi. Serolojik analizler için tüm numuneler toplanıp analize alınıncaya kadar – 20 °C’de saklandı.

3.2.2. Dekontaminasyon

Mikobakterilerin araştırılması amacıyla laboratuvara getirilen örnekler, kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarlar ile birlikte bu mikroorganizmaların çoğunluğunun etrafını sararak çevre şartlarına dirençli hale gelmelerine neden olan lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntıları da içerir. Kontaminasyona neden olan bu mikroorganizmalar çok daha kısa sürede üreyebildikleri için besiyerlerinde mikobakterilerin üremesini baskılamaktadır. Bu nedenle numuneler direkt mikroskopi ve kültürel analize tabi tutulmadan önce dekontaminasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla Dundee ve ark. (11)'nin bildirdiği yöntemle göre 50 ml'lik steril burgulu kapaklı tüplere (Falkon tüpü) alınan süt numuneleri 2500 devirde 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra pellet kısmına %0,75 hexadecylpyridinium chloride (HPC) (Sigma C9002)'den 10 ml ilave edilerek oda ısısında 5 saat bekletildi. Süre sonunda numuneler tekrar 2500 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Kalan sediment 0,067 M fosfat tamponu (pH 6,8)'ndan 1 ml ilave edilerek nötralizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3. Direkt Mikroskopi

Mikroskobik bakıda hazırlanan preparatlarda asido-rezistans bakterilerin aranması amacıyla Ziehl-Neelsen boyama yöntemi uygulandı.

3.2.3.1. Süt Numunelerinden Direkt Preparat Hazırlanması: Dekontaminasyona tabi tutulan herbir süt numunesinden öze dolusu alınarak ikişer adet temiz lam üzerine ince tabaka olacak şekilde yayıldı. Lamalar kurutulmak üzere oda ısısında bekletildi. Preparatlar bek alevinde geçirilerek fiziksel tespit işlemi gerçekleştirildi.

3.2.3.2. İzole Edilen Bakterilerden Preparat Hazırlanması: Kültür de izole edilen tipik koloni morfolojisi gözlenen kolonilerden boyama yapmak üzere preparat hazırlandı. Bu amaçla ikişer adet temiz lam alındı ve 0,1 ml PBS damlatıldı. Koloniden dikkatli bir şekilde bir öze yardımıyla alınarak PBS içerisinde homojenize edilerek lam üzerine

yayıldı. Lamalar kurutulmak üzere oda ısısında bekletildi. Preparatlar bek alevinde geçirilerek fiziksel tespit işlemi gerçekleştirildi.

3.2.4. Ziehl Neelsen Boyama Yöntemi

Aside dirençli bakteriler diğer boyama yöntemleri ile kolay boyanmazlar. Boyanmaları için fenollü ve yoğun boya eriyiklerinin uzun süre ya da sıcaklık etkisi ile uygulanması gerekir. Bu şekilde boyanan bakteriler bir kez boyandıktan sonra asit, asitli alkol ve diğer renk gidericilerle boyalarını bırakmazlar. Aside dirençli bakterilerin hücre yapısında diğer bakterilere göre çok fazla lipid bulunur. Fenollü fuksin boyası lipid ortamda, alkol ve su ortamına göre daha kolay eridiğinden bakteri lipidlerini kolayca geçer ve bakteriyi boyar. Hem süt numunelerinden direkt hazırlanan preparatların hem de kültürlerden izole edilen kolonilerin boyanması amacıyla Ziehl Neelsen Boyama Seti (GBL 5017) kullanıldı. Boyama prosedürü üretici firmanın bildirdiği yöntemine göre yapıldı.

1. Preparat karbol fuksin çözeltisi ZN ile örtüldü.
2. Alttan 5 dakikadan az olmamak şartıyla ısıtıldı.
3. Distile su ile 15 saniye yıkandı.
4. Preparat asit- alkol çözeltisi ile yıkandı ve 15 saniye sonra lam silkelenerek ayıraç uzaklaştırıldı.
5. Distile su ile 15 saniye yıkandı.
6. Preparat metilen mavisi çözeltisi ile örtüldü ve 30 saniye sonra lam silkelenerek ayıraç uzaklaştırıldı.
7. Distile su ile 15 saniye yıkandı.
8. Preparat havada kurutuldu.

3.2.5. Preparatın Mikroskopik Muayenesi

Boyaması yapılan preparat üzerinde incelenecek bölgeye bir damla immersiyon yağı damlatıldı. Mikroskopta immersiyon objektifi (100x) ile incelendi.. Aside dirençli bakterilerin koyu parlak kırmızı renkte boyandıkları görüldü. Zemini oluşturan hücreler ve diğer bakterilerin mavi renkte boyandıkları görüldü.

3.2.6. Kültür Yöntemi

3.2.6.1. Tavuk Yumurtasının Hazırlanması

Yumurtalar kırılmadan önce temizlik işlemine tabi tutuldu. Ilık su altında iyice yıkandıktan sonra kurutma kağıdında kurutuldu. Dezenfeksiyon amacıyla % 70'lik etil alkol içeren beher glass içine batırılarak 20 sn bekletildi. Yumurtalar kurutma kağıdında kurutuldu. Hazırlanacak gliserollü ve gliserolsüz besiyerlerinin herbiri için 30 adet tavuk yumurtası asepsi kurallarına uyularak steril beher içerisine kırıldı. Yumurtanın sarı ve beyazını homojen hale getirmek için mikser yardımıyla karıştırıldı. Elde edilen homojenizat steril sargı bezinden süzüldü. Besiyerine katılmadan hemen önce pH'sı $4,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı.

3.2.6.2. Katı Besiyeri Kültür Yöntemi

Ekim ncesi kültürü yapılacak süt numunelerine ait bilgiler besiyeri tüplerinin üzerine kayıt edildi. Dekontaminasyon işlemi uygulanan süt örneklerinden bir öze dolusu ekim materyali alınarak gliserinli ve gliserinsiz hazırlanan Lowenstein-Jensen (L-J) Medium Base (Merck, 1.05400, Germany) besiyeri ile aynı Şekilde gliserinli ve gliserinsiz hazırlanan Watson-Reid agara ekimleri yapıldı. Kültürler aerobik koşullarda 37 °C'de inkubasyona bırakılarak 2-6 hafta üreme yönünden incelendi. Besiyerlerinin kontrolü amacıyla Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Tüberküloz Paratüberküloz Ruam Teşhis Laboratuvarı'ndan temin edilen pozitif suş kullanıldı.

3.2.6.3. Sıvı Besiyeri Kültür Yöntemi

Katı besi yerlerinden elde edilen izolatların identifikasyonu amacıyla sıvı besiyerine pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Pasajı yapılacak kültürlere ait bilgiler sıvı besiyeri

tüplerinin üzerine kayıt edildi. Şüpheli kültürden bir öze yardımıyla alınan suşlar gliserinli ve gliserinsiz hazırlanan Dubos Broth Base (Himedia, M067, India) besiyerine ekimleri yapıldı. Kültürler %5-10 CO₂ içeren ortamlarda 37 °C'de inkubasyona bırakılarak 2-6 hafta süresince üreme yönünden takip edildi. Aynı şekilde sıvı besiyerlerinin kontrolü amacıyla Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Tüberküloz - Paratüberküloz Ruam Teşhis Laboratuvarı'ndan temin edilen pozitif suşun da sıvı besiyerine ekimleri gerçekleştirildi.

3.2.7. İdentifikasyon Testleri

Elde edilen izolatların identifikasyonu amacıyla katalaz, niasin, nitrat, redüksiyon, pirazinamidaz, üreaz ve serolojik testlerden yararlanıldı.

3.2.7.1. Katalaz Testi

Steril iki eppendorf (2 ml) tüpü alınarak içlerine pH'sı 6,8 ayarlanmış 0,067 M PBS'dan 0,5 ml ilave edildi. Lowenstein-Jensen Medium'da üreyen kolonilerden bir öze alınarak her iki eppendorf içerisindeki PBS ile homojenize edildi. Eppendoflardan birisi su banyosunda 68 °C'de 20 dakika bekletilirken diğeri aynı süre oda ısısında muhafaza edildi. Hidrojen peroksit % 30 (Merck, 1.07209, Germany) ve % 10 Tween 80 (Merck, 8.22187, Germany)'den eşit hacimde alınarak karıştırıldı ve bu karışım test ayırıcı olarak kullanıldı. Ayıraç eppendorflara 0,5 ml damlatıldı. Eppendorflar çalkalamaksızın oda ısısında 20 dakika bekletildi. Her iki tüpün gözlemlenmesi sonucu su banyosunda bekletilen eppendorf içerisinde kabarcıkların oluşması pozitif olarak değerlendirildi (18)

3.2.7.2. Niasin Testi

Lowenstein-Jensen Medium'da üreyen kolonilerin bulunduğu tüplere 1 ml distile su ilave edilerek bir öze yardımıyla yüzeydeki kolonilerin distile su ile homojen olması sağlandı. Tüpler oda ısısında 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda ağzı vida kapaklı steril tüplere (5 ml) Lowenstein-Jensen Medium'dan 0,6 ml homojenizat alınarak konuldu. Tüplerin herbirine bir adet TB Niacin Test Strips (BD BBL™ Taxo™, 231741, USA) şeriti daldırıldı. Tüpler belirli aralıklarla çalkalanarak oda ısısında 20 dakika bekletildi.

Tüplerde sarı rengin meydana gelmesi testin pozitif olduğunu renksizliğin görülmesi ise negatif olduğunu gösterdi (18)

3.2.7.3. Nitrat Redüksiyon Testi

Ağız vida kapaklı steril tüplere (5 ml) Dubos Broth Base'den 2 ml taksim edildi. Sıvı besiyerinde üretilen bakteriyel süspansiyondan 50 µl alınarak tüplere inokule edildi. Tüpler 37 °C'de 5 – 18 gün inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplere % 4 sodyum nitrattan 50 µl ilave edilerek 36 °C'de dört saat bekletildi. Ortamı asitleştirmek üzere 3 damla 1 M HCl damlatıldı. Bu aşamada 50 µl % 3 sulphanilic acid + 50 µl % 1 N-1-naphtyldiethylene-diamine dihydrochloride oluşan Griess-Ilosvay ayıracından ilave edildi. Tüplerde kırmızı rengin meydana gelmesi reaksiyonun pozitif olduğunu renk değişiminin gözlemlenmesi ise negatif olduğunu gösterdi. Bu aşamada renk meydana gelmeyen tüplere çinko tozu ilave edildi. Kırmızı rengin meydana gelmesi çinko tozunun nitratları nitritlere redükte ettiği için kırmızı renk oluşanlar tüplerdeki bakteriler negatif olarak kabul edildi. Şayet çinko tozu ilavesinden sonra herhangi bir renk oluşumunun görülmemesi bakterinin nitratı nitrite indirgelediği, ancak renksiz tuzlara çevirmesinden dolayı test pozitif olarak kabul edildi (18)

3.2.7.4. Pirazinamidaz Testi

Lowenstein-Jensen Medium'da üreyen kolonilerden bir öze yardımıyla alınarak PBS içerisinde yoğun bakteri olacak şekilde iyice homojenize edildi. Karışımdan 0,5 ml alınarak Pyrazinamidase Substrate Medium içeren ikişer tüpe inokule edildi. Tüplerden biri 36 °C'de dört gün ve diğeri de yedi gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda taze hazırlanmış % 1 ammonium iron (II) sulphate hexahydrate'dan 1 ml ağız vida kapaklı steril tüpe konuldu. Tüp oda ısısında 30 dakika bekletildi. Tüpte pembe rengin meydana gelmesi testin pozitif olduğunu gösterdi. Negatif tüpler dört saat 4 °C'de bekletildi. Renk değişimi pozitif olarak değerlendirildi. Şayet negatiflik devam ediyorsa inkübasyona bırakılan 7. gündeki ikinci tüpe aynı işlemler uygulandı (18)

3.2.7.5. Üreaz Testi

Şüpheli kültürden bir öze yardımıyla alınan koloniler Urea Broth içeren tüpler içinde emülsifiye edildi. Tüpler 37 °C'de 5 gün inkübe edildi. Üreli besiyerinde koyu bir pembeden kırmızıya kadar renk değişikliğinin görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (18)

3.2.8. Serolojik Analiz

3.2.8.1. Süt Numunelerinin Analize Hazırlanması: Laboratuvara getirilen süt örnekleri serolojik analizlerde kullanılmak üzere 50 ml'lik steril falkon tüp içine alındı. Sütlerle ait bilgiler tüp üzerine kaydedildi. Falkon tüpler soğutmali santrifüjde 4000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmında bulunan krema kısmı uzaklaştırıldıktan sonra orta kısmındaki plazma kısmı, alt kısımdaki hücresel kısma dokunulmadan bir pipet yardımıyla steril 2 ml'lik ependorflara alındı. Plazmalar serolojik analiz yapılncaya kadar - 20 °C'de saklandı.

3.2.8.2. Direkt Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA): Testin yapılışı kiti üreten firmanın bildirdiği prosedüre göre gerçekleştirildi. Serolojik analize tabi tutulacak -20°C'de saklanan plazmalar ile +2 - +8 °C'deki buzdolabında depolanan *Mycobacterium paratuberculosis* Antikor Test Kiti (ID Screen® Paratuberculosis Indirect, IDVet, France)'ne ait reaktifler çalışmadan en az 2 saat önce dışarı çıkarılarak oda derecesinde bekletildi. Kullanılmadan önce bütün reaktifler ters çevrilerek homojenize edildi. Araştırmada testin uygulanmasında üretici firmanın bildirdiği iki yoldan birisi olan kısa test protokol yöntemi uygulandı.

3.2.8.2.1. Reaktiflerin hazırlanması: Testte kullanılacak reaktiflerden yıkama solüsyonu ve konjugatın sulandırılmaları teste başlamadan önce yapıldı.

3.2.8.2.1.1. Yıkama solüsyonu: Yıkama solüsyonu, Wash Concentrate (20x) reaktifi ile steril distile suyun 1:20 oranında sulandırılması ile hazırlandı. Kullanılacak yıkama solüsyonu toplam miktarı analize alınacak serum sayısı göz önünde bulundurarak tespit edildi.

3.2.8.2.1.2. Konjugat: Araştırmada kısa test protokol yöntemine göre Concentrated Conjugate (10x) reaktifi ile Dilution Buffer 3 reaktifinin 1:10 oranında sulandırılmasıyla hazırlandı. Konjugat mikropleytlere damlatılmaya başlanmadan önceki kısa bir sürede hazırlanmasına dikkat edildi.

3.2.8.2.2. Plazma örneklerinin hazırlanması: Analizleri yapılacak süt plazmaları ile testte kullanılacak negatif ve pozitif kontrol reaktiflerin MAP antijen kaplı ana mikropleyte damlatılmadan önce ön sulandırma işlemleri yapıldı. Bu amaçla normal 96 gözlü bir mikropleyt içerisinde Dilution Buffer 6 ile süt plazmaları 1/2 ve kontrol reaktifleri ise 1/12 oranında sulandırıldı. Bu amaçla 10 µl Negative Control ve 110 µl Dilution Buffer 6 mikropleytin A1 ve B1 gözleri içerisinde sulandırıldı. Aynı işlem C1 ve D1 gözünde Positive Control için gerçekleştirildi. Plazmalar 80 µl olacak şekilde alındı ve 80 µl Dilution Buffer 6 içinde mikropleytin E1 gözünden başlamak üzere sulandırıldı. Negatif kontrol için iki göz kullanılırken pozitif kontrol için ise bir göz ayrıldı. Ön sulandırması yapılan plazmaların ve kontrollerin bulunduğu mikropleyt içeriğinin homojen karışması amacıyla karıştırıcıda çalkalanmıştır. Mikropleyt oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

3.2.8.2.3. Test Prosedürü: Ön sulandırması yapılarak inkübasyonda bekletilen kontrol ve plazmaların pozisyonları kayıt edildi. İnkübasyon sonrası sulandırma mikropleytinden MAP antijen kaplı ana mikropleyte 100'er µl transfer edildi. Kısa test protokolü uygulamasına bağlı olarak mikropleyt oda ısısında 45 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda mikropleytin içindeki sıvı bir küvete boşaltıldı ve kuyucuklar üç kere hazırlanan 300 µl yıkama solüsyonu ile ELx50 Washer (BioTek® Instruments, Inc., United States) cihazı kullanılarak yıkandı. Her kuyucuğa 100'er µl hazırlanan konjugat ilave edilip mikropleyt 30 dk oda ısısında inkübasyonda bekletildi. Mikropleytin içindeki sıvı bir küvete boşaltıldı ve yıkama işlemleri yukarıda belirtildiği gibi tekrarlandı. Mikropleytin her çukurcuğuna hazır Substrate Solution'dan 100'er µl ilave edilerek 15 dk oda ısısında karanlıkta bekletildi. Mikropleytin her kuyucuğuna 100'er µl hazır Stop Solution ilave edildi. Renk değişimi 450 nm'de ELx808 ELISA okuyucu (BioTek® Instruments, Inc. United States) ile ölçüldü ve optikal dansite değerleri kaydedildi.

3.2.8.2.4. Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Plazma örneklerinin ve kontrol numunelerinin değerlendirilmesinde KCjunior™ software (BioTek® Instruments, Inc., United States) programı kullanıldı. Test sonuçlarının geçerliliği açısından OD_{PC} (Pozitif Kontrol Ortalaması) > 0,350 ve OD_{PC}÷OD_{NC} (Negatif Kontrol Ortalaması) > 3 olması kriteri göz önünde bulunduruldu. Manuel hesaplamada aşağıdaki formülden yararlandı.

$$S/P = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{NC}}}{OD_{\text{PC}} - OD_{\text{NC}}} \times 100$$

Analiz sonuçlarının incelenmesi sonucu elde edilen S/P (Sample/Positive) % değerine göre sığırların paratüberküloz enfeksiyonuna karşı plazmalarındaki antikor düzeylerinin negatiflik ve pozitiflik kriteri saptandı (Tablo-3)

Tablo 3. Süt örneklerinin ELISA S/P % değerlerine göre negatiflik ve pozitiflik kriterleri

Sonuç	Durum
S/P % ≤ 15 %	NEGATİF
S/P % >15 %	POZİTİF

4. BULGULAR

4.1. Analiz örneklerinin alındığı yerler ve izole edilen suş sayıları

Çalışmada, 11 ilçeden toplanan sokak sütleri laboratuvar analizleri sonucunda, *M.paratuberculosis* yönünden negatif bulundu. Kayseri Talas ilçesinde alınan 1 (%0,5) sokak sütü konvansyonel testler sonucunda *M.paratuberculosis* yönünden pozitiflik saptandı. Süt örneklerinin çalışmanın materyalinin toplandığı yerler, numune sayıları ve izolasyonun yapıldığı ilçeye ait bilgiler Tablo 4.'de gösterildi.

Tablo 4. *M.paratuberculosis* yönünden pozitiflik saptanan süt örneklerinin ilçelere göre dağılımı

Alındığı İlçeler	Numune Sayısı	Pozitif Numune Sayısı (%)
Kocasinan	20	0
Melikgazi	20	0
Talas	20	1 (0,5)
Akkışla	15	0
Sarız	15	0
İncesu	15	0
Yahyalı	15	0
Pınarbaşı	15	0
Hacılar	20	0
Felahiye	10	0
Develi	15	0
Özvatan	20	0
Toplam	200	1 (0,5)

4.2. DİREKT MİKROSKOBİK MUAYENE SONUÇLARI

Laboratuvara getirilen ve dekontaminasyona tabi tutulan 200 çiğ inek sütünden hazırlanan preparatların direkt Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanması sonucu 1 (% 0,5) preparatta asido-rezistans bakteriler görüldü

4.3. KÜLTÜR ANALİZ SONUÇLARI

4.3.1. İzolasyon Sonuçları

4.3.1.1. Lowenstein-Jensen (L-J) Medium Base Sonuçları

Dekontaminasyon işlemi sonucu 200 çiğ inek sütünün L-J Medium yapılan ekimlerinde gliserin içeren 1 (%0,5) besiyerinde 6. haftada sarımsı renkte yaygın koloniler tespit edildi (Şekil 1). Aynı numuneye ait gliserinsiz besiyerinde ise üreme görülmedi.(Tablo 5)
Şekil 1 . L-J Mediumda elde edilen izolata ait görüntü.



4.3.1.2. Watson-Reid Agar Sonuçları

Dekontaminasyon işlemi sonucu 200 çiğ inek sütünün Watson-Reid agara yapılan ekimlerinde gliserin içeren 1 (%0,5) besiyerinde 7. haftada beyazımsı renkte yaygın

koloniler tespit edildi (Şekil 2). Aynı numuneye ait gliserinsiz besiyerinde ise üreme görülmedi (Tablo5)(5)

Şekil 2, Watson-Reid Agarda izole edilen suşa ait görüntü.



Tablo 5. Besiyerlerine yapılan ekimler sonucu elde edilen izolat sayıları

Numune Sayısı	Besiyerleri			
	L-J Medium		Watson-Reid Agar	
	Gliserinli	Gliserinsiz	Gliserinli	Gliserinsiz
200	1	-	1	-

4.3.2. İdentifikasyon Test Sonuçları

Gliserinli L-J besiyeri ve Watson-Reid agarda 1 (%0,5) numuneden izole elde edilen izolatın fenotipik özelliklerinin ortaya konulması amacıyla direkt mikroskopi, katalaz testi, niasin testi, nitrat testi, pirazinamidaz testi ve üreaz testine ait sonuçlar Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. İzole edilen suşa ait fenotipik özelliklerin saptanması.

Testler	L-J Medium (Gliserinli)	Watson-Reid Agar (Gliserinli)
Mikroskopi	+	+
Katalaz	+	+
Niasin	-	-
Nitrat	-	-
Pirazinamidaz	-	-
Üreaz	-	-

4.3.2.1. Mikroskopi Sonuçları

Analize alınan 200 çığ sokak sütünden izole elde edilen tek izolattan hazırlanan preparatın Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanması sonucu asido-rezistans bakteriler görüldü.

4.3.2.2. Katalaz Testi

Her iki besiyerinden izole edilen suşun katalaz testi uygulaması sonucu su banyosunda bekletilen eppendorflar içerisinde 45 mm yüksekliği geçen hava kabarcıklarının oluştuğu gözlemlendi (Şekil 3). Oda ısısında bekletilen eppendorflar içerisinde bir değişiklik görülmedi.

Şekil 3. İzole edilen suşun katalaz testine ait görüntüsü.



4.3.2.3. Niasin Testi

Sokak çiğ inek sütlerinden bir numuneden izole edilen tek suşun TB Niasin Test Strips ile muamele edilmesi sonucu herhangi bir renk değişimi görülmedi (Şekil 4).

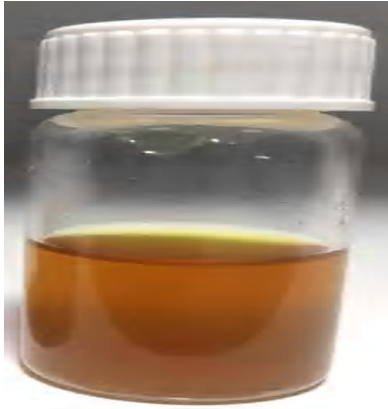
Şekil 4. İzole edilen suşun niasin testine ait görüntüsü.



4.3.2.4. Nitrat Testi

Süt numunelerinden izole edilen tek suşa yapılan nitrat testi sonucu bakterinin bulunduğu tüpte herhangi bir renk oluşumu görülmedi. Bu tüpe çinko tozu ilave edildi. Tüpte kırmızı rengin meydana geldiği görüldü. Bu sonuca göre suşun nitrat testi negatif olarak kabul edildi.

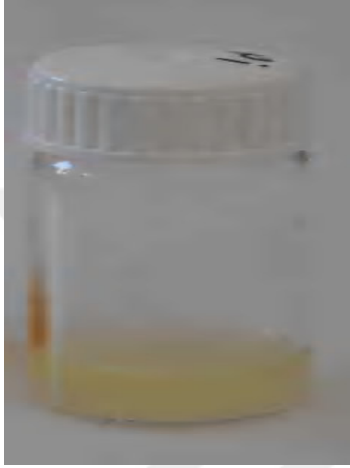
Şekil.5. İzole edilen suşun nitrat testine ait görüntüsü.



4.3.2.5. Pirazinamidaz Testi

Lowenstein-Jensen Medium ve Watson-Reid agarda'da üreyen kolonilere yapılan pirazinamidaz testi sonucu tüplerde renk değişimi gözlenmedi (şekil 6).

şekil 6. İzole edilen suşun pirazinamidaz testine ait görüntüsü.



4.3.2.6. Üreaz Testi

Besiyerlerinden izole edilen şüpheli suşa yapılan üreaz testi sonucu tüplerde herhangi bir renk değişimi tespit edilmedi (şekil 7).

şekil 7. İzole edilen suşun üreaz testine ait görüntüsü.



4.4. SEROLOJİ ANALİZ SONUÇLARI

4.4.1. Direkt Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) sonuçları

Mycobacterium paratuberculosis antikor test kiti ile yapılan serolojik analizler sonucu testte kullanılan pozitif kontrol numunesinin OD'si ortalama 2,206 ve negatif kontrol numunesinin OD'si ortalama 0,038 olarak belirlendi. Analize alınan 200 adet sokak sütü plazmasından 1 (% 0,5)'i pozitif olarak bulunurken 199 (% 99,5) negatif olarak tespit edildi (Tablo 7). Plazma antikor titrelerine ait okunan değerler Tablo 'de sunuldu.

Tablo 7. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ile incelenen plazma örneklerine ait genel sonuçlar

Numune Sayısı	ELISA	
	Pozitif (%)	Negatif (%)
200	1 (% 0,5)	199 (% 99,5)
Toplam	1 (% 0,5)	199 (% 99,5)

Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar.

SIRA NO	DİREKT MİKROSKOPİ	KÜLTÜR	SEROLOJİ (ELISA OD)
1.	-	-	Negatif (0,140)
2.	-	-	Negatif (0,057)
3.	-	-	Negatif (0,059)
4.	-	-	Negatif (0,046)
5.	-	-	Negatif (0,054)
6.	-	-	Negatif (0,060)
7.	-	-	Negatif (0,040)
8.	-	-	Negatif (0,037)
9.	-	-	Negatif (0,244)
10.	-	-	Negatif (0,041)
11.	-	-	Negatif (0,046)
12.	-	-	Negatif (0,018)
13.	-	-	Negatif (0,068)
14.	-	-	Negatif (0,046)
15.	-	-	Negatif (0,046)
16.	-	-	Negatif (0,043)
17.	-	-	Negatif (0,045)
18.	-	-	Negatif (0,045)
19.	-	-	Negatif (0,019)
20.	-	-	Negatif (0,227)
21.	-	-	Negatif (0,049)
22.	-	-	Negatif (0,240)
23.	-	-	Negatif (0,030)
24.	-	-	Negatif (0,029)
25.	-	-	Negatif (0,027)

Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı).

SIRA NO	DİREKT MİKROSKOPİ	KÜLTÜR	SEROLOJİ (ELISA OD)
26.	-	-	Negatif (0,030)
27.	-	-	Negatif (0,050)
28.	-	-	Negatif (0,041)
29.	-	-	Negatif (0,054)
30.	-	-	Negatif (0,109)
31.	-	-	Negatif (0,153)
32.	-	-	Negatif (0,317)
33.	-	-	Negatif (0,021)
34.	-	-	Negatif (0,046)
35.	-	-	Negatif (0,021)
36.	-	-	Negatif (0,120)
37.	-	-	Negatif (0,032)
38.	-	-	Negatif (0,041)
39.	-	-	Negatif (0,018)
40.	-	-	Negatif (0,019)
41.	-	-	Negatif (0,019)
42.	-	-	Negatif (0,025)
43.	-	-	Negatif (0,028)
44.	-	-	Negatif (0,034)
45.	-	-	Negatif (0,046)
46.	-	-	Negatif (0,081)
47.	-	-	Negatif (0,055)
48.	-	-	Negatif (0,023)
49.	-	-	Negatif (0,019)
50.	-	-	Negatif (0,219)

Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı).

SIRA NO	DİREKT MİKROSKOPİ	KÜLTÜR	SEROLOJİ (ELISA OD)
51.	-	-	Negatif (0,039)
52.	-	-	Negatif (0,018)
53.	-	-	Negatif(0,042)
54.	-	-	Negatif (0,043)
55.	-	-	Negatif (0,026)
56.	-	-	Negatif (0,121)
57.	-	-	Negatif (0,036)
58.	-	-	Negatif (0,020)
59.	-	-	Negatif (0,059)
60.	-	-	Negatif (0,329)
61.	-	-	Negatif (0,227)
62.	-	-	Negatif (0,037)
63.	-	-	Negatif (0,021)
64.	-	-	Negatif (0,234)
65.	-	-	Negatif (0,101)
66.	-	-	Negatif (0,080)
67.	-	-	Negatif (0,132)
68.	-	-	Negatif (0,022)
69.	-	-	Negatif (0,019)
70.	-	-	Negatif (0,096)
71.	-	-	Negatif (0,088)
72.	-	-	Negatif (0,029)
73.	-	-	Negatif (0,041)
74.	-	-	Negatif (0,036)
75.	-	-	Negatif (0,048)

Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı).

SIRA NO	DİREKT MİKROSKOPİ	KÜLTÜR	SEROLOJİ (ELISA OD)
76.	-	-	Negatif (0,038)
77.	-	-	Negatif (0,045)
78.	-	-	Negatif (0,054)
79.	-	-	Negatif (0,044)
80.	-	-	Negatif (0,042)
81.	-	-	Negatif (0,045)
82.	-	-	Negatif (0,238)
83.	-	-	Negatif (0,047)
84.	-	-	Negatif (0,039)
85.	-	-	Negatif (0,036)
86.	-	-	Negatif (0,049)
87.	-	-	Negatif (0,044)
88.	-	-	Negatif (0,049)
89.	-	-	Negatif (0,250)
90.	-	-	Negatif (0,057)
91.	-	-	Negatif (0,060)
92.	-	-	Negatif (0,059)
93.	-	-	Negatif (0,072)
94.	-	-	Negatif (0,047)
95.	-	-	Negatif (0,041)
96.	-	-	Negatif (0,245)
97.	-	-	Negatif (0,050)
98.	-	-	Negatif (0,048)
99.	-	-	Negatif (0,059)
100.	-	-	Negatif (0,043)

Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı).

SIRA NO	DİREKT MİKROSKOPİ	KÜLTÜR	SEROLOJİ (ELISA OD)
101.	-	-	Negatif (0,043)
102.	-	-	Negatif (0,036)
103.	-	-	Negatif (0,030)
104.	-	-	Negatif (0,037)
105.	-	-	Negatif (0,234)
106.	-	-	Negatif (0,050)
107.	-	-	Negatif (0,059)
108.	-	-	Negatif (0,045)
109.	-	-	Negatif (0,236)
110.	-	-	Negatif (0,039)
111.	-	-	Negatif (0,036)
112.	-	-	Negatif (0,039)
113.	-	-	Negatif (0,035)
114.	-	-	Negatif (0,099)
115.	-	-	Negatif (0,054)
116.	-	-	Negatif (0,042)
117.	-	-	Negatif (0,037)
118.	-	-	Negatif (0,032)
119.	-	-	Negatif (0,230)
120.	-	-	Negatif (0,044)
121.	-	-	Negatif (0,025)
122.	-	-	Negatif (0,043)
123.	-	-	Negatif (0,047)
124.	-	-	Negatif (0,032)
125.	-	-	Negatif (0,083)

Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı).

SIRA NO	DİREKT MİKROSKOPİ	KÜLTÜR	SEROLOJİ (ELISA OD)
126.	-	-	Negatif (0,023)
127.	-	-	Negatif (0,025)
128.	-	-	Negatif (0,035)
129.	-	-	Negatif (0,027)
130.	-	-	Negatif (0,042)
131.	-	-	Negatif (0,045)
132.	-	-	Negatif (0,046)
133.	+	+	Pozitif (1,225)
134.	-	-	Negatif (0,023)
135.	-	-	Negatif (0,028)
136.	-	-	Negatif (0,024)
137.	-	-	Negatif (0,038)
138.	-	-	Negatif (0,047)
139.	-	-	Negatif (0,038)
140.	-	-	Negatif (0,047)
141.	-	-	Negatif (0,028)
142.	-	-	Negatif (0,040)
143.	-	-	Negatif (0,027)
144.	-	-	Negatif (0,210)
145.	-	-	Negatif (0,025)
146.	-	-	Negatif (0,229)
147.	-	-	Negatif (0,037)
148.	-	-	Negatif (0,037)
149.	-	-	Negatif (0,047)
150.	-	-	Negatif (0,031)

Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı).

SIRA NO	DİREKT MİKROSKOPİ	KÜLTÜR	SEROLOJİ (ELISA OD)
151.	-	-	Negatif (0,024)
152.	-	-	Negatif (0,064)
153.	-	-	Negatif (0,044)
154.	-	-	Negatif (0,046)
155.	-	-	Negatif (0,061)
156.	-	-	Negatif (0,049)
157.	-	-	Negatif (0,048)
158.	-	-	Negatif (0,043)
159.	-	-	Negatif (0,044)
160.	-	-	Negatif (0,043)
161.	-	-	Negatif (0,042)
162.	-	-	Negatif (0,053)
163.	-	-	Negatif (0,067)
164.	-	-	Negatif (0,055)
165.	-	-	Negatif (0,153)
166.	-	-	Negatif (0,061)
167.	-	-	Negatif (0,041)
168.	-	-	Negatif (0,044)
169.	-	-	Negatif (0,042)
170.	-	-	Negatif (0,051)
171.	-	-	Negatif (0,068)
172.	-	-	Negatif (0,062)
173.	-	-	Negatif (0,053)
174.	-	-	Negatif (0,045)
175.	-	-	Negatif (0,198)

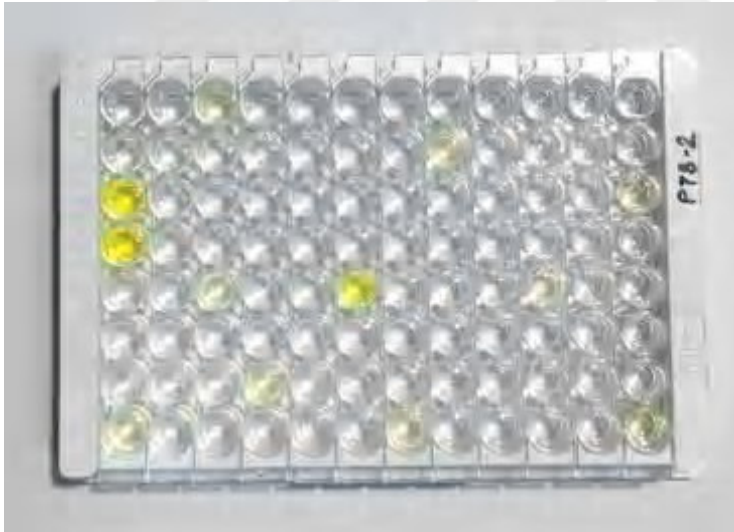
Tablo 8. Süt numunelerinin konvansiyonel ve serolojik testlerle incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar (devamı).

SIRA NO	DİREKT MİKROSKOPİ	KÜLTÜR	SEROLOJİ (ELISA OD)
176.	-	-	Negatif (0,051)
177.	-	-	Negatif (0,047)
178.	-	-	Negatif (0,055)
179.	-	-	Negatif (0,264)
180.	-	-	Negatif (0,054)
181.	-	-	Negatif (0,046)
182.	-	-	Negatif (0,044)
183.	-	-	Negatif (0,045)
184.	-	-	Negatif (0,251)
185.	-	-	Negatif (0,089)
186.	-	-	Negatif (0,260)
187.	-	-	Negatif (0,067)
188.	-	-	Negatif (0,051)
189.	-	-	Negatif (0,116)
190.	-	-	Negatif (0,082)
191.	-	-	Negatif (0,057)
192.	-	-	Negatif (0,048)
193.	-	-	Negatif (0,065)
194.	-	-	Negatif (0,103)
195.	-	-	Negatif (0,049)
196.	-	-	Negatif (0,051)
197.	-	-	Negatif (0,177)
198.	-	-	Negatif (0,057)
199.	-	-	Negatif (0,189)
200.	-	-	Negatif (0,051)

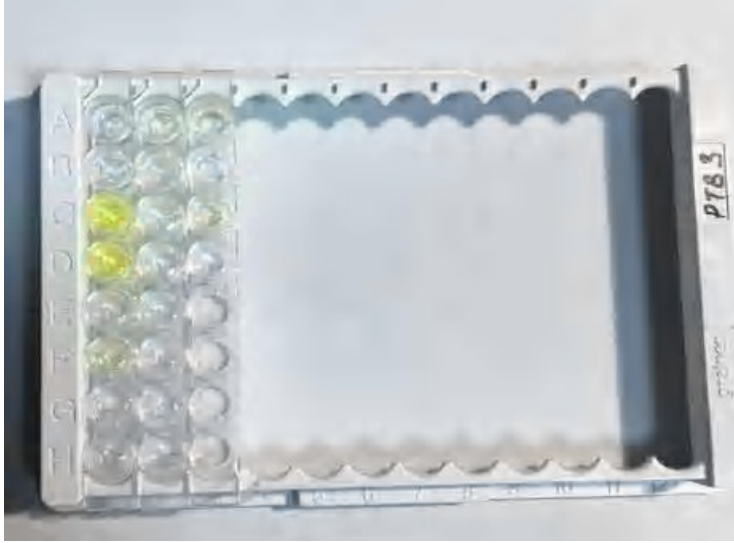
Şekil 8. Süt plazmalarının ELISA ile incelenmesi sonucu elde edilen mikropleyt görüntüsü.



Şekil 8. devamı Süt plazmalarının ELISA ile incelenmesi sonucu elde edilen mikropleyt görüntüsü (devamı).



Şekil 8. devamı Süt plazmalarının ELISA ile incelenmesi sonucu elde edilen mikropleyt görüntüsü (devamı).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Endemik hastalıklar, hayvancılık sektöründe üretimin her aşamasında büyük kayıplara yol açmakta ve kaynak israfı oluşturmaktadır. Özellikle süt çiftliklerinde, en yaygın hastalıklardan biri Paratüberkülozis (Johne's disease) olup ruminantlarda başlıca bağırsaklarında kronik dejeneratif granulomatöz enteritis ile karakterize enfeksiyonlar meydana getirmektedir. Bunun dışında *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ile enfekte olmuş hayvanlar arasında klinik mastitis riskini artırdığı da düşünülmektedir. Bu durum süt üretimini etkilediği için doğrudan ekonomik maliyetlere neden olmakta ve başta hayvansal ürünlerin tüketimine bağlı olarak insan sağlığını da tehdit etmektedir. Enfeksiyöz etkenin morfolojik yapısına bağlı olarak bölgesel epidemilerin yaygınlık gösterdiği ve birçok işletmenin infeksiyondan etkilendiği bildirilmektedir (20,70)

Amerika Birleşik Devletlerinde 1996 yılı resmi kayıtlarına göre süt sığırlarının % 20 - 40 oranında MAP ile infekte oldukları ve her yıl için 1.5 milyar dolar bir ekonomik kaybın şekillendiği tespit edilmiştir (20). MAP tespit edilen süt sığırlarının yaklaşık % 33'ünde süt üretiminde, reproduktif performansta ve kondüsyonlarında düşüklüğün şekillendiğini bildirilmiştir (25,43). Batı Avrupa ve Kuzey Amerika da MAP sürü prevalansının % 21-70 oranlarında bulunduğu saptanmıştır (54) Ülkemizde infeksiyonun varlığına yönelik yapılan çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Makav ve Gökçe (35), Kars yöresinde subklinik paratüberkülozun prevalansını % 3.5 bulurken, Öztürk ve ark. (38) Burdur bölgesinde % 6.2 olarak bildirmişlerdir. Gümüşsoy ve ark. (71) Kayseri bölgesinde % 12.24 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. İkiz ve ark. (72) ile Özpınar ve ark. (73),

Trakya bölgesinde pozitiflik tespit edememişlerdir. Yıldırım (74) Uşak bölgesinde % 4 ve Çetinkaya ve ark. (75) Elazığ yöresinde % 3.4 pozitiflik bildirmişlerdir. Mevcut çalışmalarda incelenen numune ve laboratuvar yöntemi farklılıklarına bağlı değişik sonuçlar alınmıştır. Özpınar ve ark. (73) enfeksiyonu tespit edemezken Gümüşsoy ve ark. (71) %12,24'lük bir oranla en yüksek miktarda bulmuşlardır. Genel olarak değerlendirildiğinde ülkemizde Avrupa ülkelerindeki rakamları ile karşılaştırıldığında paratüberkülozun prevalansının düşük olduğu görülmektedir. Ancak ülkemizde yapılan çalışmalarda en fazla numune olarak 500 sığırdaki Çetinkaya ve ark. (75)'lerinin inceleme yaptığı göz önünde bulundurulduğunda prevalansın düşüklüğünün sebeplerinden biri olduğu görülmektedir. Trakyada enfeksiyon saptanamamış olup Burdur dışında batı bölgelerinde enfeksiyon ile ilgili bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Paratüberkülozlu sürüler insan sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır. İnsanlar arasında farklı yaş grupları tarafından tüketilen süt ve süt ürünleri toplumda MAP'in yayılmasında önemli bir faktördür. Çiğ sütlerin ısı işlem görmemesi ve bu sütlerin özellikle genç ve yaşlı insanlar tarafından tüketilmesi besinsel yayılımının en önemli unsurudur. Paratüberküloza bağlı meydana gelen mastitislerin değerlendirilmesine yönelik çok az sayıda araştırma bulunmaktadır (71). Mevcut çalışmalar daha çok enfeksiyonun süt verimi üzerindeki etkilerinin ortaya konulduğu çalışmalardır (76). *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). Sweeney ve ark. (47), % 12 oranında subklinik infekte sığırların 50 ml sütleri içerisinde yaklaşık 2-8 CFU miktarda etkenin bulunduğu ve enfeksiyöz etkenlerin süt ile çevreyi bulaştırabileceklerini ortaya koymuşlardır. Laboratuvarında bu sütlerin analizleri sonucu etkenlerin izole edilememesinin bir sebebinin de süt içerisindeki bakteri yükü ile alakalı olduğunu belirtmişlerdir.

Sütlerin ısı işlem görmesi sonucu sütlerden etkenlerin izolasyonu ile farklı çalışma sonuçları bulunmaktadır. Pastörizasyon işlemi uygulanmış çiğ sütlerde MAP'in canlı kaldığı laboratuvar çalışmaları sonucu tespit edilmiştir (77,78).

Ayele ve ark. (40), üç işletmeden topladıkları 200 pastörize süt ile perakende satışa sunulan 244 pastörize sütü ZN boyama, kültür ve PCR ile incelemişlerdir. Araştırmacılar iki işletme tarafından pastörize edilen iki sütte kültür haricinde pozitiflik elde ederken ticari olarak pastörizasyonu yapılan perakende satışa sunulan sütlerden dördünde hem boyamada hem de PCR'da pozitiflik elde etmişlerdir. Ancak bu dört sütün sadece ikisinde kültürde pozitiflik görmüşlerdir. Pastörize edilen sütlerde de MAP'in bulunabileceğini ve böyle sütlerin insan sağlığı açısından risk oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Araştırmamızda da ZN boyama, kültür ve serolojik yöntem kullanılarak MAP'in varlığının tespitine gidilmiştir. Ayele ve ark. (40) analize alınacak sütlerin dekontaminasyon aşaması da dahil izolasyonda hemen hemen aynı metodları kullanmışlardır. Araştırmacılar farklı olarak PCR tekniğini uygularken seroloji yapmamışlardır. Kültürden elde edilen sonuçlar çalışmamız ile aynı doğrultudadır. Araştırmacılar sütlerin analiz öncesi santrifüj edilerek pelet kısmının analize alındığını krema kısmının ise atılmasının bir handikap oluşturabileceğini vurgulamışlardır. Krema kısmında da bakteri bulunabileceğini göz önünde bulundurduğumuzda aynı görüşü paylaşmaktayız. Laboratuvar çalışmalarında MAP ile infekte makrofajların sütün yağ tabakasındaki yağ damlacıklarında buldukları tespit edilmiştir (79). İnfeksiyöz etkenlerinin süt içerisinde yayılmasına yönelik açıklayıcı bilgiler şu an için yeterli değildir. Muhtelemen hematojen ve lenfatik yolla süte ulaştıkları düşünülmektedir. Birçok araştırmacı süt ineklerinin MAP ile infekte olduklarını ve etkenlerin süte bulaştıklarını göstermişlerdir (23,80) Paratüberküloza yönelik klinik belirti gösteren sığırlar sütleri ile etkenleri çevreye bulaştırmaları söz konusu iken bazı hayvanlar hiçbir belirti göstermeksizin etkenleri sütlerinde taşımaktadır. Bu hayvanlardan elde edilen sütler tanklarda toplanmakta ve pastörizasyon işlemi uygulanmaktadır.

Paratüberkülozun serolojik olarak teşhisinde kan serumları üzerine yapılan çalışmaların yoğunluğu dikkat çekmektedir. Hendrick ve ark. (81), laktasyondaki 689 sığırdan kan, süt ve dışkı numuneleri toplamışlar ve paratüberkülozun süt üretimi ve süt kalitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar dışkı örneklerine kültür, kan ve süt numunelerine serolojik analiz yapmışlardır. Yapılan ELISA testleri sonucu 130 (% 18,9) serum ve 77 (% 11,2) süt numunesinin pozitif olduğu bulunurken kültürleri yapılan dışkı

örneklerinden 72 (% 10,4)'sinden etken izole edilmiştir. Kültür sonuçlarını baz alarak süt ELISA testinin sensitivite ve spesifitesini sırasıyla % 21,2 ve % 98,6 olarak belirlemişler ve süt ELISA testinin serum ELISA testine oranla kültür testine alternatif olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca paratüberkülozun somatik hücre sayısı olarak süt kalitesi üzerinde bir etkisinin olmadığını diğer parametrelerden ortalama protein ve yağ yüzdelerinde ise azalmanın görüldüğünü ancak bunun paratüberkülozla direkt ilişkilendirilemeyeceğini çünkü bu hayvanlarda ayak hastalıkları, metabolik hastalıklar ve klinik mastitis ile ilgili bilgilerin yetersiz olduğunu açıklamışlardır. Paratüberkülozun süt üretimini azalttığı ve yaşamsal süreyi kısalttığı sonucuna varmışlardır. Ross ve ark. (82) MAP ile enfekte olan ineklerin, klinik mastitise yakalanma olasılığının yüksek olduğunu ve MAP yönünden sürü bazında tüm hayvanların kontrolünün yapılmasının göz ardı edilemez faydalı etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Hendrick ve ark. (81), paratüberkülozun serolojik teşhisi amacıyla ELISA testini kullanmışlar ve test materyali olarak süt ve serumdan elde edilen sonuçların kıyaslamasını yapmışlardır. Araştırmacılar süt ELISA sonuçları pozitif olan hayvanların daha yüksek yüzdede dışkıları ile etkenleri dışarı çıkarttıklarını ifade etmişlerdir. Süt ve serum ELISA uygulamaları sonucu testlerin sensitivite ve spesifitesini sırasıyla en az bir sığira ait numunelerin analizi yapılmış ise % 91,9 ve % 65,5 ile % 88,9 ve % 42,8 en az iki sığırın numuneleri incelenmesi sonucu % 86,9 ve % 93,4 ile % 82,8 ve % 79,5 olarak tespit etmişlerdir. Numune seçiminde sütün seruma oranla tercih edilebileceğini ve paratüberküloz yönünden yapılacak değerlendirmede tek bir sığır yerine sürü içerisinde birden fazla hayvanın numunesinin incelenmesinin uygun olacağını bildirmişlerdir. Ancak diğer araştırmacılar paratüberküloz etkenine karşı oluşan antikorların tespitinde kullanılan süt ve serum ELISA sonuçları arasında korelasyon bulunmadığını bildirmişlerdir (83).

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

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 immun yanıt etkenin vücuttan çıkarılmaya başlamasından sonra etkisini göstermektedir. Çevresel *Mycobacterium* türlerine karşı ortaya çıkan kros reaksiyonlar serolojik testlerin spesifitesini azaltmaktadır.

Bu çalışmada Kayseri ilinde mahalle aralarında satışa sunulan sütlerin ELISA yöntemi ile incelenmesi sonucu 200 süt numunesinden sadece 1 (% 0,5) numunede pozitiflik saptanmıştır. Sütler rastgele mahalle arasında satılan sütlerden aynı satıcıdan bir kere alınmak suretiyle yapılmıştır. Süt toplayıcılar birçok aile işletmesinden topladıkları sütleri bir tankta toplamakta ve bunları mahalle aralarında satışa sunmaktadır. Satışa sunulan sütlerin hiçbiri soğuk zincirde deponlanmadığı ve gün boyunca perakende olarak satılıncaya kadar sürekli çevresel ısıya maruz kaldıkları görülmüştür.

Hendrick ve ark. (81), süt numunelerinden paratüberkoluzun teşhisinde ELISA yöntemini kullanmışlar ve 77 (% 11,2) numunede pozitiflik saptamışlardır. Araştırmamızda kullanılan teşhis yöntemi ve kit araştırmacıları ile aynı olmasına rağmen sadece bir süt numunesinde pozitiflik tespit edilmiştir. Bu durum numune sayısının aynı olmaması ve numunelerin bireysel olarak değil tank sütünden alınarak analiz yapmamızdan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Araştırmacılar numuneleri 9 sürüden toplam 689 sığırdan toplamışlar ve sürü tespiti seçiminde paratüberküloz yönünden en az bir klinik semptom gösteren sığırın olmasına dikkat etmişlerdir.

Çetinkaya ve ark. (39), Elazığ merkeze ve ilçelere bağlı köylerden 78 farklı lokalizasyondan 500 adet süt numunesi toplamışlardır. Numuneleri sağlıklı görünüşe sahip 1,5 – 2 yaşın üstündeki ineklerden rastgele almışlardır. Araştırmacılar etkenin izolasyonu amacıyla başlıca PCR yöntemini kullanırken pozitif sonuç aldıkları süt numunelerine kültür yapmışlardır. Süt numunelerini dekontaminasyon amacıyla

cetylpyridinium chloride muamele etmişlerdir. Kültür amacıyla mikobaktin içeren Middlebrook 7H11 + OADC vasatını kullanmışlardır. Sütlerden ekstrakte edilen DNA'ların PCR'da amplifiye edilmesi ve agaroz jelde koşturulması sonucunda 25 (% 5) numunede pozitif bantlar elde etmişlerdir. Pozitif sonuç alınan süt numunelerinin 17 (% 68)'sinden kültürel yoklamalar sonucu etken izolasyonu yapmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları mini anket çalışması sonucu paratüberküloz görülen 20 (% 5,5) ineğin tohumlanmasında boğa kullanıldığını, 4 (% 3,3) inekte suni tohumlama ve 1 (% 6,3) inekte ise hem boğa hem de suni tohumlama yapıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca ineklerin ırk ve yaş gruplarına göre enfeksiyonun görülme sıklığını değiştini ifade etmişlerdir. Araştırmamızda bizzat sokak sütleri satıcılardan toplandığı için süt numunelerinin alındığı sığır ve işletmeye ait bilgiler elimizde bulunmamaktadır. Çetinkaya ve ark. (39)'nın bildirdikleri rakamın altında pozitiflik bulmamızın nedeni araştırmacıların da ifade ettikleri gibi enfeksiyon üzerine birçok faktörün etkili olabileceği ve paratüberkülozun artış gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Başlıca faktörler arasında iklim, beslenme, ırk, yaş, dölleme tipi ve barınak koşulları bulunmaktadır.

Sonuç olarak, Kayseri bölgesinde yapılan süt sığırcılığında paratüberkülozun yüksek bir oranda da olmasada bulunduğu görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan serolojik yöntem sonucu elde edilen verilerin gold standart olan kültür yöntemi ile aynı sonuç vermesi hala ELISA'in rutin uygulamalar için duyarlı, pratik ve ucuz bir test yöntemi olduğunu göstermiştir. Teşhiste kullanılacak laboratuvar yöntemlerinin enfeksiyonun seyrine göre hastalığın varlığının ortaya konulmasında önemli bir faktör olabileceği kanaatine varılmıştır.

Ülkemiz açısından değerlendirildiğinde ekonomik, politik veya işletmelerden kaynaklanan sebeplere bağlı olarak MAP'nin eradike edilememesi halinde, özellikle enfeksiyonun kontrolünü sağlayacak aşı uygulamaları ile ilgili yoğun çalışmaların yapılması ve tüketime sunulan gıda ürünlerinde mikrobiyal kontaminasyonu durdurabilecek stratejilerin geliştirilmesi B planı olarak üzerinde durulması gereken önemli konulardır. Subklinik enfekte sığırların kısa sürede belirlenmesi sağlayabilecek rutin teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi de paratüberkülozun sağlık problemi oluşturma özelliğini ortadan kaldıracaktır. Ayrıca bu sadece ülkemizin sorunu olmak dışında dünyada ruminant yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerin problemi olarak düşünülmelidir. Bu bağlamda

paratüberkölözün önemi vurgulayacak organizasyonlar düzenlenmeli ve enfeksiyonun eradikasyonuna yönelik ülkeler arası işbirliği gerçekleştirilmelidir.



6. KAYNAKLAR

- 1 Alıntı:<http://www.yazete.com/saglik/sut>)
- 2 Uzun M. Tüberküloz tanı yöntemleri LJ besiyeri ile antitüberküloz duyarlılık testi, 21 yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun 286-289
- 3 Seber E. Tüberküloz tanı yöntemleri LJ besiyeri ile antitüberküloz duyarlılık testi, 21 yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun 467-472
- Grant IR, Foddai ACG, Tarrant JC, et al. Viable *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* isolated from calf milk replacer. J Dairy Sci 2017; 100: 9723-9735
- 4 Wilson DJ, Rossiter C, Han HR, Sears PM. Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. Am J Vet Res 1993; 54: 1851-1857
- 5 Johnson YJ, Kaneene JB., Gardiner JC, et al. The Effect of Subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* Infection on Milk Production in Michigan Dairy Cows. J Dairy Sci 2001; 84: 2188-2194
- 6 Tekinşen OC, Tekinşen KK. Süt ve Süt Ürünleri. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2005: 1-10.
- 7 Küçük M, Akgül C. TÜBİTAK-BİDEB Kimya Bilim Danışmanlığı Çalıştayı 2007
- 8 Chiodini RJ. The history of paratuberculosis. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, p: 1-4, 14-18 August 2005, Copenhagen, Denmark
- 9 Pavlas M. New findings of pathogenesis, diagnostics and control of paratuberculosis in cattle. Acta Vet Brno 2005; 74: 73-79
- 10 Merkal RS, Curran BJ. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl Microbiol 1974; 28: 276-279

- 11 Dundee L, Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 173-177
- 12 McNees AL, Markesich D, Zayyani NR, Graham DY. *Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 9: 1523-1534
- 13 Oken HA, Saleeb PG, Redfield RR, Schimpff SC. Is *Mycobacterium avium paratuberculosis* the trigger in the Crohn's Disease spectrum. *Open Forum Infect Dis* 2017; 4: 1-3
- 14 Corti S, Stephan R. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol* 2002; 2: 15
- 15 Pierce ES. Could *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease, ulcerative colitis and colorectal cancer? *Infect Agent Cancer* 2018; 13:1
- 16 Banche G, Allizond V, Sostegni R, et al. Application of multiple laboratory tests for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in Crohn's disease patient specimens. *New Microbiol* 2015; 38: 357-367
- 17 de Juan L, Alvarez J, Aranaz A, et al. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet Microbiol* 2006; 115: 102-110
- 18 Drobniowski FA, Uttley AHC. Mycobacterial speciation. In: Parish T, Stoker NG (eds). *Mycobacteria Protocols*, Humana Press Inc, Towata, 1998: p 323-347
- 19 Arda M. Temel Mikrobiyoloji (4. baskı), Medisan Yayinevi, Ankara, 2011: 235-254
- 20 Patel A, Shah N. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*-incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. *J Microbiol Immun Infect* 2011; 44: 473-479
- 21 Sivakumar P, Tripathi BN, Singh N. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet Microbiol*.2005; 108: 263-270
- 22 Hermon-Taylor J, Quirke P. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut* 2001; 49: 755-760
- 23 Florou M, Leontides L, Kostoulas P, et al. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol Infect* 2008; 136: 644-652

- 24 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: 4244-4250
- 25 Stabel JR, Steadham EM, Bolin CA. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl Environ Microbiol 1997; 63: 4975-4977
- 26 Eda S, Elliott B, Scott MC, et al. New method of serological testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Johne's Disease) by flow cytometry. Foodborne Pathog Dis 2005; 2: 250-262
- 27 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: 283-306
- 28 Robertson RE, Cerf O, Condrón RJ, et al. Review of the controversy over whether or not *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* poses a food safety risk with pasteurised dairy products. Int Dairy J 2017; 73: 10-18
- 29 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; 89:963-970
- 30 Fischer OA, Matlova L, Bartl J, et al. Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria. Vet Microbiol 2003; 91: 325-338
- 31 Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, et al. Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. Med Vet Entomol 2005; 19: 360-366
- 32 Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, et al. Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. Med Vet Entomol 2003; 17: 145-150
- 33 Grant IR, Rowe MT, Dundee L, Hitchings E. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. Int J Dairy Tech 2001; 54: 2-13
- 34 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.
- 35 Makav V, Gökçe E. Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19: 913-916

- 36 Adaska JM, Anderson RJ. Seroprevalence of Johne's-disease infection in dairy cattle in California, USA. *Prev Vet Med* 2003; 60: 255-61
- 37 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.
- 38 Ozturk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, ve ark. Seroprevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Israel J Vet Med* 2010; 65: 53-57
- 39 Çetinkaya B, Muz A, Ertaş HB, ve ark. Süt ineklerinde paratüberkülozun prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Tr J Vet Anim Sci* 2000; 24: 371-379
- 40 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: 1210-1214
- 41 Glanemann B, Hoelzle LE, Bögli-Stuber K, Jemmi T, Wittenbrink MM. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2004; 146: 409-415
- 42 Whitlocka RH, Wellsb SJ, Sweeneya RW, Van Tiem J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 2000; 77: 387-398
- 43 Collins MT, Sockett DC, Ridge S, Cox JC. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbant assay for Johne's disease. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 272-276
- 44 Ridge SE, Morgan IR, Sockett DC, et al. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 1991; 68: 253-257
- 45 McNabb WB, Meek AH, Duncan JR, et al An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can J Vet Res* 1991; 55: 252-259
- 46 Sockett DC, Conrad TA, Thomas CB, Collins MT. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1134-1139
- 47 Sweeney RW, Whitlock RH, Hamir AN, Rosenberger AE, Herr SA. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation of uninfected cattle. *Am J Vet Res* 1992; 53: 1312-1314
- 48 Nielsen SS, Grønæk C, Agger JF, Houe H. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev Vet Med* 2002; 53: 191-204

- 49 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: 105-111
- 50 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: 569-73
- 51 Hendrick S, Duffield T, Leslie K, et al. The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. *Can Vet J* 2005c; 46: 1126-1129
- 52 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: 372-377
- 53 Eda S, Bannantine JP, Waters WR, et al. 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
- 54 Buergelt CD, Layton AW, Ginn PE, et al. The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (*Bison bison*). *Vet Pathol* 2000; 37: 428-38
- 55 Huda A, Jungersen G, Lind P. Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2004; 104: 43-53
- 56 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.
- 57 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.
- 58 Motiwala AS, Strother M, Amonsin A, Byrum B, et al. 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.

- 59 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.
- 60 O'Reilly CE, O'Connor L, Anderson W, et al. 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
- 61 Romano MI, Amadio A, Bigi F, Klepp L, et al. 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.
- 62 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.
- 63 Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, et al. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5): 1798-804.
- 64 Olsena I, Bjordal Johansena T, Billman-Jacobeb H, Fredsvold Nilsena S, Djønne B. A novel IS element, ISMpa1, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2004; 98: 297-306
- 65 Brey BJ, Radcliff RP, Clark Jr DL, Ellingson JLE. Design and development of an internal control plasmid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 2006; 20: 51-59
- 66 Buergelt CD, Williams JE. Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust Vet J* 2004; 82: 497-503
- 67 Grant IR, Pope CM, O'Riordan LM, Ball HJ, Rowe MT. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet Microbiol* 2000; 77: 369-378
- 68 Sesli Çetin E, Aynali A, Öztürk T, Özseven AG, Kaya S. Mikobakterilerin klinik örneklerden izolasyonunda Löwenstein-Jensen besiyeri kültürü ve Bactec *Mycobacterium* Growth Indicator Tube 960 sisteminin değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fak. Derg* 2012; 19: 12-16

- 69 Uzun M. Örneklerin işlemlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003.
- 70 Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med* 2002; 55: 137-153
- 71 Gümüşsoy KS, İca T, Abay S, Aydın F, Hızlısoy H. Serological and molecular diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Turkish J Vet Anim Sci* 2015; 39: 147-153
- 72 İkız S, Bağcıgil AF, Ak S, Ozgur NY, İlğaz A. Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. *Medycna Wet* 2005; 61: 881-883
- 73 Özpınar H, Tekiner İH, Karaman O, Kurt Y. Türkiye Trakya bölgesindeki süt işletmelerinden toplanan fekal ve çiğ süt örneklerinde *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) incelemesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2015; 21: 247-252
- 74 Yıldırım D, Civelek T. Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2013; 19: 121-126
- 75 Çetinkaya B, Muz A, Ertaş HB, ve ark. Süt ineklerinde paratüberkülozun prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Tr J Vet Anim Sci* 2000; 24: 371-379
- 76 Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, et al. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *JAVMA* 2005a; 227: 1302-1308
- 77 Anzabi Y, Hanifian S. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pasteurized milk by IS900 PCR and culture method. *African J Microbiol Res* 2012; 6: 1453-1456
- 78 Carvalho IA, Pietralonga PAG, Schwarz DGG, Faria ACS, Moreira MAS. Short communication: recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from retail pasteurized whole milk in Brazil. *J Dairy Sci* 2012; 95: 6946-6948
- 79 Koenig GJ, Hoffsis GF, Shulaw WP, et al. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1441-1445
- 80 Grant IR, Kirk RB, Hitchings E, Rowe MT. Comparative evaluation of the MGITTM and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 196-201

- 81 Hendrick SH, Duffield TF, Kelton DF, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *JAVMA* 2005b; 226: 424-428
- 82 Rossi G, Grohn YT, Schukken YH, Smith RL. The effect of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. *J Dairy Sci* 2017; 100: 1-9
- 83 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: 171-178



SATIŞA SUNULAN SOKAK SÜTLERİNDE MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS VARLIĞININ KONVANSİYONEL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%**25**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**24**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.klimik.org.tr

İnternet Kaynağı

%**10**

2

slideplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

%**4**

3

biyologlar.com

İnternet Kaynağı

%**3**

4

www.tuberkuloz.gen.tr

İnternet Kaynağı

%**2**

5

library.cu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

6

www.biyologlar.com

İnternet Kaynağı

%**1**

7

tr.wikipedia.org

İnternet Kaynağı

%**1**

8

megep.meb.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Meral ÖZTÜRK KALIN 1982 yılında Kayseri’de doğdu. İlkokulu 1988-1993 yılında Ahmet Eski Yapan İlköğretim okulunda, Ortaokulu 1993-1996 yılında Ergenekon okulunda, Lise Öğrenimini 1996-1999 yılında Atatürk lisesinde okudu. 2000-2004 yılında Yüzüncüyıl Üniversitesi Hemşirelik Bölümünü bitirerek 2004-2005 yılında Sevgi Hastanesinde Hemşire olarak çalışmış. Daha sonra 2005 yılında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesinin sınavlarını kazanmış ve burada göreve başlamıştır, halen Erciyes Üniversitesinde görevine devam etmektedir. Evli ve iki çocuk annesidir.

