

Sığırlarda Paratüberkülozun Tanısına İlişkin Problemler

Zafer MECİTOĞLU* Gülşah DEMİR**

Geliş Tarihi: 24.02.2012
Kabul Tarihi: 15.05.2012

Özet: Paratüberkülozun özellikle erken evrelerinde teşhisi oldukça güç olan ve tüm ruminantlarda granülomatöz enterit meydana getiren kronik bir enfeksiyondur. Sunulan derlemede, sığırlarda paratüberkülozun teşhisindeki problemler, bazı tanı yöntemleri ve bunların karşılaştırılması değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sığır, Paratüberküloz, Tanı.

Problems in Diagnosis of Paratuberculosis in Cattle

Abstract: Paratuberculosis is a chronic infection of ruminants, which causes granulomatous enteritis. It's almost impossible to detect the infection especially in early stages. This review present some of the diagnostic methods, their comparison and problems about diagnosis of paratuberculosis in the cattle.

Key Words: Cattle, Paratuberculosis, Diagnosis.

Giriş

Paratüberküloz, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* tarafından meydana getirilen kronik ishale karakterize bir hastalıktır. Etken ileum ve jejunum'daki fagositik hücreler tarafından alınır ve hastalığın ileri evrelerinde (2-10 yıl) bölgesel lenf yumruları ve diğer organlara yayılır. Johnes hastalığı ifadesi kilo kaybı ve ishal ile karakterize klinik hastalığı tanımlarken, paratüberküloz, etken tarafından enfekte edilmiş fakat semptom göstermeyen hastalıkları ifade etmektedir¹. Tüm dünya da görülmesine rağmen hastalığın parogenezi hakkındaki bilgi hala sınırlıdır. Bunun olası nedenleri şunlardır;

- Bakterilerin aşırı yavaş üremesi
- Taksonomi ve tanısı ile ilgili çelişkiler
- Moleküler biyoloji tekniklerini uygulamadaki sınırlı imkanlar
- Hiçbir laboratuvar modelinin uygun olmadığı aşırı uzun inkubasyon periyodu⁸.

Enfeksiyon ve Hastalığın Evreleri:

Hastalığın yayılımındaki en önemli faktör enfekte hayvanların dışkıları ile bulaşık yemlerin ve suyun tüketilmesidir. Oldukça uzun inkubasyon periyodu sebebiyle hasta hayvanlarda klinik semptomlar oluşmadan 15-18 ay önce dışkıları ile etkeni saçmaya başlayabilirler. Dondurilmaya ve antimikrobiklere karşı son derece dirençli olan etken, boğaların semenlerinden de izole edilmiştir. Son yıllarda intrauterin bulaşmanın da söz konusu olabileceği üzerinde durulmaktadır¹⁰.

Birçok hayvan hayatları boyunca klinik bulgu göstermeyebilir. Bakım, besleme hataları, gebelik ve yüksek süt verimi gibi stres faktörleri, uzun süreli uygulanan kortikosteroidler hastalığın klinik formunun oluşmasına neden olabilir¹.

Hastalığın gelişimi dört evre altında incelenmektedir:

Evre 1 (sessiz enfeksiyon dönemi):

Paratüberküloz hastalığına sahip çoğu sığır genellikle buzağı iken enfekte olmaktadır.

* Araş.Gör.Dr. U.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları A.D.

** Araş.Gör. U.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları A.D.

Etken jejenum ve ileum mukozasında yavaşça proliferer olur ve oradan bölgesel lenf yumrularına dağılır. Enfeksiyon birinci evredeki hastalarda dışkı kültürü gibi en hassas yöntemlerle bile nadiren tespit edilir. Sindirim kanalındaki etken dokuların postmortem mikroskopik incelenmesinde görülmeyebilir. Yanlıca doku kültürlerinde etken tespit edilebilir. Bu dönem 2-10 yıl gibi uzun bir süre devam edebilir¹⁰.

Evre 2 (sub-klinik hastalık):

Bu evredeki hayvanlarda kilo kaybı ve ishal görülmemektedir. Bununla birlikte T hücrelerinin M.ptb antijen cevabı ve gamma interferon seviyesinin yükselmesine bağlı olarak immun yanıtta değişimler oluşmaktadır¹². Sub-klinik evredeki bazı hastalıkların dışkı kültürü pozitif olarak bulunabilir. Hastalar dışkıları ile enfeksiyonu çevreye yayarak tüm sürünün enfekte olmasına neden olabilirler. Bu dönem enfekte hayvanın immun durumuna ve etkenin yoğunluğuna bağlı olarak birkaç yıl sürebilir¹.

Evre 3 (Klinik Form):

Klinik bulguların şekillendiği bu evredeki enfekte hayvanlarda normal iştaha karşın şiddetli kilo kaybı ve ishal görülür. İntermitent ishal genellikle birkaç hafta devam eder kalp ve solunum frekansları ile beden ısısı normal sınırlar içerisinde. Bu evredeki birçok hastanın dışkı kültürü, serum ELISA ve AGID testleri pozitifdir¹.

Evre 4 (İlerlemiş klinik Form):

İlerlemiş safhadaki hastalar güçsüz ve aşırı zayıflamış durumdadırlar ve bu hayvanlarda genellikle projektal ishal görülür. Çene altı ödem bu faz için karakteristiktir. Hayvanlar ikinci fazdan dördüncü faza haftalar içinde geçebilirler. İshal şiddetlendiğinde ve hipoproteini görüldüğünde hayvanın durumu hızla kötüleşir. Ölüm şiddetli dehidrasyon ve kaşeksinin sonucu olarak meydana gelir⁸.

Paratüberküloz hastalığı ile ilişkili belirtilen patolojik değişimler hastalığa karakteristiktir fakat diagnostik değildir⁸.

Diagnostik Testlerin Değerlendirilmesi

A. Organizmanın Kültürü veya Tespiti Bakteriyolojik inceleme:

Hastalığın bulunduğu sürülerde dışkının incelenmesi, klinik semptom gösteren ve göstermeyip yüksek miktarda etken taşıyan hayvanların tanısı açısından değerli bir metottur. Dışkı kültürü günümüzde kullanılan en gerçekçi tanı kriterlerinden biridir. Testin spesifitesi ve du-

yarlılığı %100 dür. Testin en büyük avantajı klinik semptomların meydana gelmesinden 1-3 yıl önceden enfekte hayvanların tespit edilebilmesidir. Fakat uygulanan ekim yöntemleri, hem dışkı ile az miktarda etken saçan hayvanların tespitini olanaksız kılar, hem de kolonilerin oluşabilmesi için gerekli olan inkubasyon periyodu 8-16 hafta kadar uzundur. Yeni uygulanan ekim yöntemlerinde kültür ortamına büyüme faktörlerinin katılması kolonilerin görünür biçimde oluşumunu 12 haftadan 3 haftaya indirmiştir⁶. Kültür ortamına mikonazol eklenmesinin kontaminasyonu engellediği ve santrifugasyon uygulanmasının etkenin tespit edilme olasılığını arttırdığı bildirilmektedir⁸. Yeni tekniklerle bir gram dışkıdaki tek bir organizma dahi tespit edilebilmekte ve birincil tanımlama 8 hafta içerisinde yapılabilmektedir. M.paratuberculosis'in diğer mycobacteria türlerinden en önemli ayırıcı yanı üremesinin yavaş olması ve üremesi için mycobactin'e ihtiyaç duymasındır⁶. Radiometrik tekniklerle dışkı kültürü, duyarlılığı çok yüksek ve maliyeti DNA problemleri ve dışkı kültürüne nazaran oldukça düşük olan bir diğer teşhis metodudur¹.

Ziehl-Nielsen ile boyanmış dışkı frotilerinin incelenmesi:

Dışkıda asit-fast mikroorganizmaların oluşturduğu tipik kümelerin 1 saat içerisinde gözükmesi dışkı kültürü metoduna ciddi bir alternatiftir. Buna karşın mikroskopik incelemenin hassasiyeti ve spesifitesine daima şüphe ile yaklaşmaktadır. M.ptb nin dışkıda bulunan diğer asit-fast mikroorganizmalarından ayırt edilebilmesi oldukça güç olabilmektedir. Aynı zamanda birkaç farklı frotilerin hazırlanıp incelenmesi doğru teşhis açısından büyük önem taşımaktadır⁶. Enfekte hayvanların bazıları hafif (100 mikroorganizma/gr dışkı) veya yüksek oranda etkeni saçarak, klinik semptom gösterenler, yüksek oranda etken yayan gruptaki hayvanlardır. Epitel hücrelerindeki asit-fast organizma kümelerinin görülmesi tanısal açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu hücreler özellikle hastalığın diyaretik fazında dışkı ile fazlaca atılır. Genel olarak dışkı frotilerinde asit-fast bakteri kümelerinin aranması dışkı kültürüne nazaran güvenilirliği oldukça düşük olan bir metoddur. Rektal yolla rektumdan toplanan biyopsi örneklerinin incelenmesi de frotilerinden daha güvenilir bir yöntem değildir, zira etken sadece hastalığın son evrelerinde rektum mukozasında bulunur. Rektal kazıma yöntemi ile alınan biyopsi örneklerinde epitel-yum hücrelerinde ve makrofajda asit-fast bakte-

ri kümelerinin görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir¹⁰.

Genetik Prob:

Genetik DNA problemleri etkenin teşhisi amacıyla kullanılan yeni bir yöntemdir. M.ptb kendine özgü olan ve IS 900 olarak adlandırılan bir giriş elementine sahiptir⁵. Organizmanın keçileri etkileyen alt türlerini genetik yapısı, sığırlardakine çok yakındır³. Dışkıda IS900 ün tespiti amacıyla kullanılan ticari kitler mevcuttur ve bu kitler çalışma prensibi PCR' dayalıdır. Testin duyarlılığı ticari PCR testlerine nazaran oldukça yüksektir. Testin avantajı hızlıdır, sadece 3 günde etkeni dışkıları ile saçan hayvanların tespiti mümkündür ki bu 12 hafta süren dışkı kültüründen daha çok kısa bir zaman dilimini kapsar. Testin dezavantajı düşük duyarlılığı, yüksek maliyeti, teknik personel ve özel ekipman gerektirmesidir. Gen örneklerinin kontaminasyonuna bağlı hatalı sonuçlar sıklıkla oluşabilir¹³.

Süt Kültürü:

Organizma sub-klinik hastaların sütlerinden kültür edilebilir⁷. Dışkı ile enfeksiyonu yüksek oranda yayan hayvanlarda, süt önemli bir bulaşma kaynağıdır⁸.

Biyopsi:

İleosekal lenf nodülünden histolojik inceleme ve ekim amacıyla cerrahi yolla biyopsi alınması, oldukça hassas ve spesifik bir tanı metodudur. Enfekte hayvanların erken teşhisi bu yöntemin avantajı iken, gerekli olan cerrahi müdahale yöntemin dezavantajıdır⁹.

B. Serolojik Testler

Serolojik testler dışkı kültürüne nazaran oldukça düşük maliyetli ve hızlı teşhis metodlarıdır. Hassasiyet ve spesifiteye dayalı problemler bu testlerde olağandır¹². Yapılan çalışmada, sub-klinik enfeksiyona sahip ineklerde komplement fiksasyon (CFT), agar jel immunodifüzyon (AGID) ve ikisi enzim bağlantılı immün assay ELISA olmak üzere dört test uygulanmış ve karşılaştırılmıştır. Tüm testlerin tanısal spesifitelerin yüksek (%95-99) olduğu tespit edilmiştir. Sensitivite ise, etkeni dışkı ile yaymayanlarda %14-47, yayanlarda %40-65 olarak tespit edilmiştir ve en iyi performansı ELISA testlerinin ortaya koyduğu belirlenmiştir. Enfeksiyonun sürüdeki prevalansı arttıkça testlerin duyarlılığında artmakta, prevalans azaldıkça hassasiyette azalmaktadır. Bu nedenle serolojik testlerin yanında dışkıda etken izolasyonu gibi ek bir test

uygulanmasının faydalı olacağı belirtilmektedir³.

Komplement Fiksasyon Testi (CFT):

Günümüze kadar sığırlarda hastalığın teşhisinde en sık kullanılan test CFT idi. Birçok ülke hayvan nakilleri sırasında CFT testlerinin negatif olmasını aramaktadır. Klinik hastalıkta CFT'nin tanısal hassasiyeti %90, spesifitesi %70 olarak belirlenmiştir². CFT nin tanısal değerinin, özellikle sub-klinik enfekte hastalara uygulandığında oldukça düşük olduğu belirtilmektedir. Bir çalışmada, testin az miktarda etken yayan sub-klinik hastalardaki duyarlılığı %54 olarak saptanmıştır⁷. CFT sub-klinik enfeksiyonlu hastaların tanısında tek başına kullanılmamaktadır. Testin spesifitesi ön tanı konmasını sağlayacak kadar yüksek olmakla beraber ve pozitif sonuçlar dışkı kültürü ile birlikte değerlendirilmelidir. Sub-klinik enfeksiyona sahip olduğu dışkı kültürü ile tespit edilen bir hastada CFT ve AGID testlerinin duyarlılıkları %11 ve %19 olarak tespit edilmiştir³. Hastalık taşıdığı saptanan bir hastada CFT ve AGID testlerinin spesifitesi %97.4 ve %99.4 olarak tespit edilmiştir. CFT de yanlış pozitif sonuçlarının alınması, diğer bakterilerle çapraz reaksiyona ve erken antikor cevabına bağlı olarak gelişebileceği ifade edilmektedir¹⁰.

Agar Gel Immunodifüzyon (AGID):

Bu testin hastalığın teşhisindeki duyarlılığı %96 spesifitesi %94 tür. AGID testi özellikle klinik hastalığın teşhisine uygun bir test olarak görülmektedir. Testin sub-klinik enfeksiyonlar da ki hassasiyeti, dışkı kültürünün sahip olduğunun ancak üçte biri kadardır. Test hızlı ve nispeten düşük maliyetlidir. Sonuçlar 48 saat içinde elde edilebilir. Florasan antikor testi de CFT ile birlikte sub-klinik vakaların tespitinde uygulanabilir, fakat elde edilen sonuçlar güvenilir değildir³.

Enzyme-linked Immunosorbent assays (ELISA):

Birkaç farklı ELISA testi mevcuttur. Genelinde ELISA testlerinin sensitivitesi yüksek olmasına karşın spesifitesi düşüktür. Modifiye ELISA testinin dışkı kültürü pozitif hayvanda %57 hassasiyete ve %98.7 spesifiteye sahip olduğu ortaya konmuştur. Johnes absorbed ELISA olarak bilinen yeni bir ticari ELISA kitinin ise duyarlılığı %45, spesifitesinin %99 olduğu belirlenmiştir. Hassasiyet klinik semptom gösteren olgularda %87 hafif düzeyde etkeni yayan sub-klinik olgularda %15 olarak tespit

edilmiştir. Test dışı kültürü ile pozitif tespit edilen hayvanların %60'ında pozitif sonuç vermiştir. Saha çalışmalarında test hayvanların %80'ini klinik semptom göstermeden önce ve %65'ini etkeni dışı ile saçmaya başlamadan önce tespit edebilmiştir⁴. Sub-klinik enfekte hayvanların tespiti açısından diğer testlerle kıyaslandığında ELISA en güvenilir serolojik test olarak görülmektedir. Toplam test süresi iki saate kadar indirgenmiştir¹². ELISA Avustralya da kullanılan CFT ile karşılaştırılmış, CFT sub-klinik olarak enfeksiyonu yayanların %57'sini, ELISA %60'ını tespit edebilmiştir⁴. ELISA klinik vakaların %88'ini doğru tespit ederken, CFT %83'ünü tespit edebilmiştir. ELISA'nın spesifitesi %99 iken CFT'nin ki %96'dır. Nokta ELISA testi klinik semptom gösteren hayvanlarda %85 hassasiyet ve %100 spesifiteye sahiptir. Nokta ELISA testi sub-klinik enfekte hayvanların %64'ünün tespit edilebilmesini sağlayabilir¹.

C. İmmünte Testleri:

Hastalığın devresiyle ve lezyonların tipiyle ilişkili olarak enfekte hayvanlarda humoral ve hücrel yanıtlar gelişmektedir. Erken immüno-diagnostik testler, M.Paratuberculosis ekstraktları enjekte edilen hayvanlarda gecikmiş tip hipersensivite reaksiyonlarına neden olan intradermal test ile sınırlıdır. Hücre ilişkili immünte testleri olan deri ve intravenöz johne's testlerinin, düşük spesifite ve duyarlılıkları nedeni ile günümüzde kullanılması tavsiye edilmemektedir⁸.

Diagnostik Testlerin Sahada Kullanımı

Bireysel Diagnostik Testler:

Tek bir hayvanın klinik semptom göstermeksizin test edilmesinin sebebi sürüye katılmadan önce M.paratuberculosis enfekte olup olmadığının anlaşılmasıdır. Hastalık belirtileri göstermeyen bir hayvanın enfekte olup olmadığını belirlemek çok güçtür. ELISA veya dışı kültürü sonuçlarının negatif olması hayvanın enfekte olmadığı anlamına gelmez. Johnes hastalığının erken evrelerinde etkenin tespit edilmesi günümüz diagnostik testleri ile imkansız yakındır. Veteriner hekim hastalığın son 5-10 yılda ahırda ve çevrede görülüp görülmediğini araştırmalıdır. Diğer bir yöntem sürüdeki ikinci veya daha yüksek laktasyondaki 30 ineğe test uygulanmasıdır bu hayvanların negatif olması alınan hayvan üzerindeki şüpheleri azaltmaktadır. Diğer diagnostik seçenekler onarlı guruplar halinde havuzlanmış örneklerden dışı kültürü veya DNA PCR probe testleridir⁷.

Sürüye yönelik diagnostik testler:

Sürüye yönelik kullanılabilecek en ucuz metod tüm erişkin hayvanlara ELISA uygulanması ve ELISA sonucu pozitif olanlara dışı kültürü testi uygulanmasıdır. Eğer ticari ELISA kitiyle M.paratuberculosis pozitif bir hayvanın dışı kültürü de pozitif ise sürüdeki enfekte hayvan sayısı muhtemelen pozitiflerin beş katı kadardır. ELISA göreceli olarak spesifik bir test olmasına karşın hafif enfekte hayvanları ki bunlar sürüdeki enfekte hayvanların %70'ini oluşturur, tespit ihtimali %20 dolaylarındadır. DNA prob testi sürü bazında kullanmak için fazla pahalıdır. Dışı kültürü en yüksek spesifiteye sahip testtir, duyarlılığı da ELISA'dan daha yüksektir. Eğer paratuberküloz eradike edilmek isteniyorsa yılda bir veya iki kez tüm sürüye dışı kültürü testi yapılmalı ve enfekte hayvanlar sürüden çıkartılmalıdır¹³.

Sonuç

Johnes hastalığı, hasta hayvanlarda yemden yararlanmanın, süt verimini ve süt yağının azalması, canlı ağırlık kaybı, fertilitate azalması ve mastitis insidansında artış gibi birçok ekonomik olumsuzluğa neden olan sürü hastalığıdır¹¹. Johnes hastalığının erken teşhisi ve enfekte hayvanların sürüden etkeni saçmaya başlamadan ayrılması amacıyla sürüde düzenli olarak taramalar yapılması ekonomik kayıpların önlenmesi açısından çok önemlidir. Bu taramalarda kullanılması önerilen teşhis metodları yüksek spesifite ve duyarlılığa sahip ELISA ve dışı kültürü metodlarıdır. Dünya genelinde M.ptb'nin hayvanlardaki patojen rolü ve insanlardaki Crohn's hastalığı ile muhtemel ilişkisi konu üzerinde acil ve kapsamlı araştırmaların yapılmasını gerektirmektedir.

Kaynaklar

1. Andrews, A.H, 1992. Bovine Medicine: Blackwell Scientific Publication London-UK.
2. Benedictus G, Kalis C.J., 2003. Paratuberculosis eradication, control and diagnostic methods. Acta Vet Scand.,44, 231-41.
3. Botcherr J, Gangl A., 2004. Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis—combined serological testing and classification of individual animals and herds. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.,51, 443-8.
4. Jubb T.F, Sergeant E.S, Callinan A.P, Galvin J., 2004. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect johne's disease in Victorian dairy cattle herds. Aust Vet j., 82,569-73.

5. Juste R.A, Garrido J.M, Geijo M, Elguezabal N, Aduriz G, Atxaerandio R.I.,2005. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp.paratuberculosis infection in cattle and sheep. *J Vet Diagn Invest.*, 17, 354-9.
6. Muskends J, Mars M.H, Elbers A.R, Van Maanen K, Bakker A.D.,2003. The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*, 50,231-41.
7. Paolichu F.A, Zumarrage M.J, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Alito A, Romano M.,2003. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*,50,20-6.
8. Blood,D.C, Radostits O.M., Gay C.C., 2000: *Johnes Disease (Paratuberculosis)* In: *Veterinary Medicine* 9 th ed. W.B.Saunders Co, London-UK pp 920-933.
9. Schleg P.M, Buergelt C.D, Davis J.K, Williams E, Monif G.R, Davidson M.K., 2005. Attachment of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis to bovine intestinal organ cultures; method development and strain differences. *Vet Microbiol.*,108, 271-9.
10. Smith, Bradford P. 2001. *Johnes Disease In: Large Animal Internal Medicine* 3rd Ed., London-UK, pp 779-782.
11. Stratmann J, Homuth M, Gerlach G.F., 2005. Observation on the control and eradication of paratuberculosis in dairy herds, *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*,112,304-6.
12. Stricklands J, Scott H.M, Libal M.C,Jordan E.R., 2005. Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy cattle. *J.Dairy Sci.*,88, 2432-40.
13. Taddet S, Robbi C, Cesenac, Rossi I, Schiano E, Arrigoni N, Vicenzini G., 2004. samples comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method. *J Vet Diagn Invest.*,16, 503-8.

